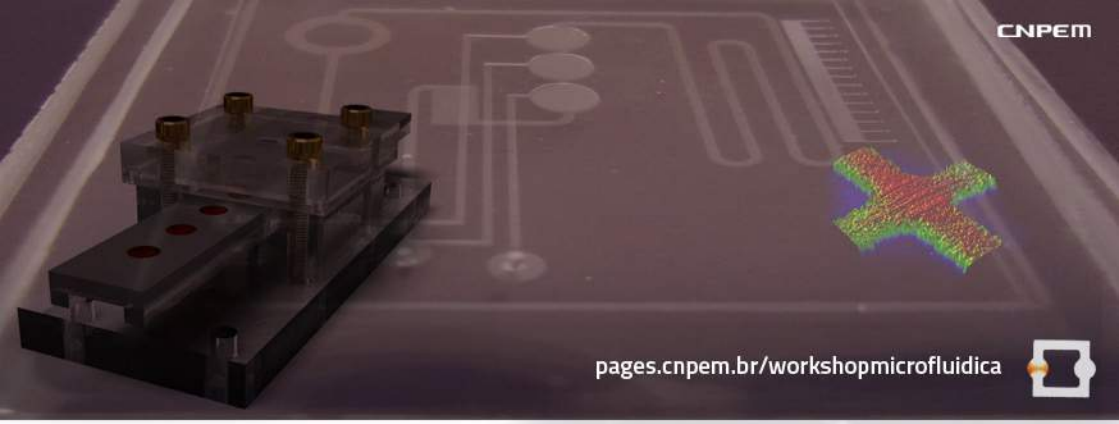


V Workshop em Microfluídica

23 e 24 de julho de 2015

Campinas, São Paulo

Livro de Resumos

Patrocínio

Metrohm Pensalab

M&M Vácuo

Apoio

Royal Society of Chemistry

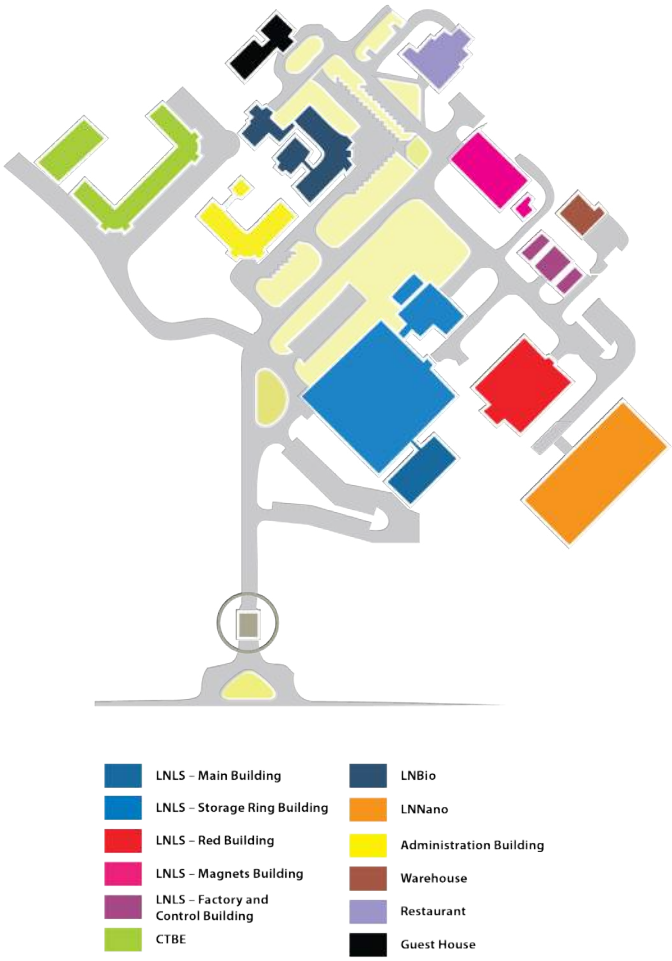
inct bioanalítica

UFG PROEC

Organização

LNNano

CNPEM



The lectures are going to be held in the LNNano Auditorium at the LNNano.

Apresentação 05
Programação 07
Resumos 09

Microfluídica

A microfluídica pode ser definida como a ciência e engenharia de sistemas com dimensões micrométricas, na qual o comportamento dos fluídos difere da teoria tradicional para domínios macroscópicos. A microfluídica pode ser explorada para uma variedade de aplicações científicas e tecnológicas e, por esse motivo, há a necessidade de maior discussão sobre os efeitos desse escalonamento.

O desenvolvimento de microssensores de fluxo, microbombas e microválvulas no final dos anos 80 dominou os primeiros estágios da área de microfluídica. Durante este período, as principais plataformas exploradas para a fabricação de microssistemas eram baseadas em vidro, quartzo e silício. No entanto, desde a década de 1990 plataformas de menor custo e fácil acesso estão sendo cada vez mais empregadas em microfluídica, incluindo polímeros elastoméricos (PDMS, por exemplo) e materiais descartáveis como papel e filmes de transparência. Atualmente, sistemas microfluídicos podem ser utilizados em diferentes áreas incluindo química, biologia, medicina, dentre outras. Alguns exemplos de aplicações destes dispositivos incluem determinação de pH, monitoramento de cinética de reações, interações biomoleculares, separações eletroforéticas, imunoensaios, citometria de fluxo, manipulação de células, além de análises proteômicas, metabolômicas, de DNA e várias outras aplicações.

O uso de tais dispositivos apresenta uma série de vantagens bastante atrativas do ponto de vista econômico e tecnológico. Primeiro, porque o volume de fluídos no interior destes sistemas é muito pequeno (nano litros a micro litros). Isto é especialmente significativo para reagentes caros, ou em situações onde a quantidade de amostra é reduzida. Além disso, várias técnicas de fabricação são relativamente baratas, permitindo a produção em larga escala, bem como a integração de múltiplas etapas químicas em um único dispositivo. Em consequência do tamanho reduzido dos dispositivos, é possível, por exemplo, realizar uma análise química em um intervalo de tempo da ordem de segundos.

A microfluídica começou a ser desenvolvida no Brasil no início dos anos 2000. Atualmente, já existem alguns grupos de pesquisa dedicados integralmente a esta linha de pesquisa. Neste contexto, o V Workshop em Microfluídica será importante para acompanhar os avanços nessa área.

O Workshop

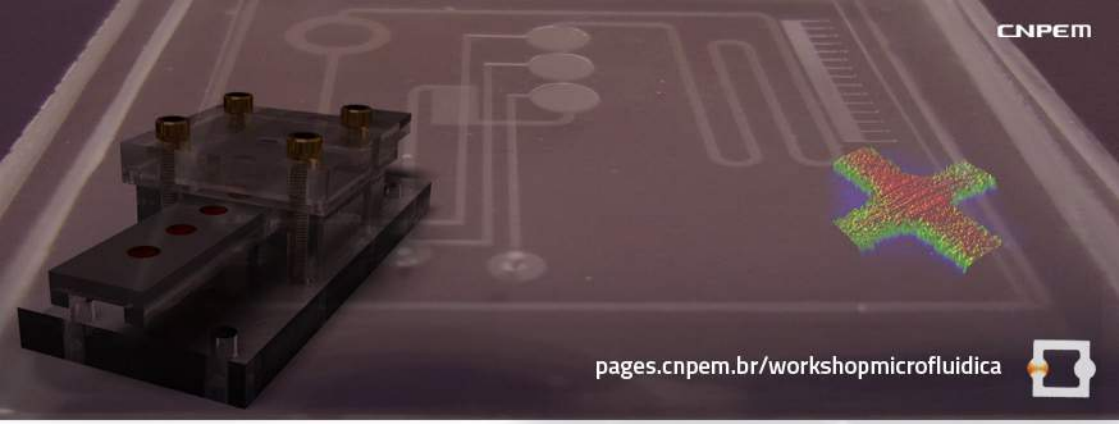
O V Workshop em Microfluídica 2015 foi realizado nos dias 23 e 24 de julho de 2015, no auditório do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), no campus do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Mantendo a tradição dos últimos anos, o workshop foi realizado em dois dias de modo a expandir as apresentações em diversas áreas do conhecimento e promover o intercâmbio entre alunos e pesquisadores de diferentes instituições e/ou empresas.

A quinta edição do evento contou com 8 palestrantes convidados e mais 8 apresentações orais de trabalhos de estudantes selecionados. Além disso, houve uma sessão de pôsteres com 40 trabalhos apresentados.

Programação

23 de Julho - 2015	
09:00 - 09:40	**Abertura** Boas-vindas e Informações Gerais
09:40 - 10:30	**Palestra 1. "Emerging Applications of Porous Microfluidic Devices"** Prof. Dr. Charles S. Henry (Colorado State University, EUA)
10:30 - 11:00	**Coffee break**
11:00 - 11:50	**Palestra 2. "Uso de visualização de informação para sensores e biossensores"** Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior (IFSC/USP)
11:50 - 12:40	**Palestra 3. "Microcontroladores Pneumáticos para Lab-on-a-Chip"** Prof. Dr. Luiz Otávio Saraiva Ferreira (DMC/FEM/UNICAMP)
13:00 - 14:30	**Almoço**
14:30 - 15:20	**Palestra 4. "Microfluidic fabrication of conductive networks on paper"** Dr. Murilo Santhiago (CNPEM)
15:20 - 15:40	**Seminário 1. Reversible Single Particle Trapping in Microchannels** Jaione Tirapu Azpiroz (IBM Research)
15:40 - 16:00	**Seminário 2. Interaction of lipid membanes and microfluidics devices** Marcos Masukawa (USP)
16:00 - 16:20	**Seminário 3. Estudo preliminar da extração de cobalto utilizando sistema aquoso bifásico em microfluídica** Anne Caroline Guimarães Veloso (UFV, USP-IQSC)
16:20 - 16:40	**Seminário 4. 3D focalization LTCC microfluidic device for nanoparticle synthesis by nanoprecipitation** Houari Cobas Gomez (IPT)
16:40 - 18:00	**Coffee Break** Com Apresentação de Painéis

24 de Julho - 2015	
08:30 - 09:20	**Palestra 5. "Estratégias para detecção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células: Eletroforese em Microchips com Detecção Eletroquímica e por Fluorescência"** Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva (IQ/UNICAMP)
09:20 - 10:10	**Palestra 6. "Bioeletrônica e Biodispositivos Implantáveis"** Prof. Dr. Frank Nelson Crespilho (IQSC/USP)
10:10 - 10:50	**Coffee Break**
10:50 - 11:40	**Palestra 7. "Desenvolvimento de sensores e biossensores para uso em sistema de língua eletrônica"** Prof. Dr. Flavio Makoto Shimizu (IFSC/USP)
11:40 - 12:30	**Palestra 8. "Sistemas microfluídicos de altas vazões para síntese e encapsulamento de fármacos com vistas a aplicações industriais"** Dra. Juliana de Novais Schianti (IPT)
12:30 - 12:50	**Seminário 5. Pore-scale analysis of oil displacement by polymer solution** Nicolle Lima (PUC-Rio)
13:00 - 14:30	**Almoço**
14:30 - 14:50	**Seminário 6. SENSOR CALORIMÉTRICO PARA MEDIÇÃO DE VAZÃO EM SISTEMAS MICROFLUÍDICOS** Guilherme Augusto Dalri (UFPR)
14:50 - 15:10	**Seminário 7. Detecção de gliadina em alimentos através de dispositivo "língua eletrônica" microfluídica** Cristiane Margarete Daikuzono (IFGW-CNPEM-EMBRAPA-IFSC)
15:10 - 15:30	**Seminário 8. Physicochemical, structural and biological evaluation of microfluidic-assembled lipoplexes for gene delivery** Tiago A. Balbino (FEQ-UNICAMP)
15:30 - 17:00	**Coffee Break** Com Apresentação de Painéis
17:00 - 17:30	**Encerramento. Discussão do VI Workshop**



V Workshop em Microfluídica

23 e 24 de julho de 2015

Campinas, São Paulo

Resumos

Patrocínio

Metrohm Pensalab

M&M Vácuo

Apoio

Royal Society of Chemistry

inct

UFG PROEC

Organização

LNNano

CNPEM

Microeletrodo para detecção de anticorpos do core da hepatite B (Anti-HBc)

Erika C.L.Soares; Diego R. Leite; Diego G.A. Cabral, Cayo E.L. Menezes;*Rosa F. Dutra

erikinhalima@gmail.com; rickardo.2@hotmail.com;*rosa.dutra@ufpe.br

Resumo: *Hepatite significa inflamação do fígado e pode se desenvolver por doenças autoimunes, metabólicas, medicamentos, fatores genéticos, uso abusivo de álcool, substâncias tóxicas e microrganismos como os vírus. Várias técnicas são empregadas no diagnóstico da sorologia, contudo, as mais utilizadas são os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e a quimioluminescência. Na busca de novas técnicas diagnósticas mais prática, econômicas e rápidas, os imunossensores são desejados. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de imunoeletrodo nanoestruturado empregando nanotubos de carbono para. A técnica de fotolitografia foi utilizada para confeccionar um tip sensor em filme de ouro (~60 nm) modificado por filme polimérico de náfion e nanotubos de carbono funcionalizados, no qual foram imobilizados antígenos recombinantes específicos para captura de anticorpos do core da hepatite B. A proposta apresenta-se com sensibilidade e limite de detecção relevantes para o manuseio clínico permitindo a detecção da hepatite B em amostras sanguíneas.*

***Palavras-Chaves*:** Imunoeletrodo, Hepatite B, teste rápido.

Introdução: A hepatite B é um problema de saúde pública com chance de cronificação e altos índices de morbi-mortalidade. O vírus, da família Hepadnaviridae, é DNA de fita dupla e produz amplo espectro clínico, desde hepatite aguda até o carcinoma hepatocelular [1]. Apesar dos avanços na busca do diagnóstico rápido e preciso, o ELISA e a detecção do DNA viral no soro, ainda são as técnicas mais utilizadas, porém são onerosas e o diagnóstico é demorado [2]. Biossensores surgem como alternativa, por detectarem um evento biológico e o transduzir num sinal elétrico quantificável; na elaboração destes, utilizar filmes poliméricos associados com nanomateriais tem aumentado perspectivas, por possibilitar sensores com alto desempenho, baixa corrente de fundo e transferência eletrônica melhorada. Assim, buscar por diagnósticos mais rápidos, precisos e miniaturizáveis, torna-se fundamental na elucidação de enfermidades de alta morbimortalidade.

Procedimento experimental: Os eletrodos ouro consistindo de um sistema tri-eletródico foram confeccionados por fotolitografia no Laboratório de Microfabricação do CNPEM (Campinas-SP). Em seguida, sobre o eletrodo de trabalho foi depositado um filme de náfion com nanotubos de carbono carboxilados, seguido ativação dos grupos carboxílicos e incubação com solução de HBc-Ag. Após a imobilização do HBc-Ag, para bloqueio de ligações não específicas, foi utilizada uma solução de albumina sérica humana (Figura 1). A construção da matriz de imobilização foi acompanhada pelas técnicas de voltametria cíclica e de onda quadrada através de conexão em um potenciostato Autolab (Methrom) controlado por software GPES.

Resultados e Discussão: A incorporação de nanotubos de carbono ao filme polimérico promoveu aumento significativo da área eletroativa. A adição de antígeno do core da hepatite B (HBc-Ag) resultou em diminuição dos picos de corrente redox pela natureza isolante da proteína, bem como das sucessivas etapas de bloqueio e resposta analítica (Figura 2). . A resposta analítica foi avaliada com a incubação de solução contendo anticorpos anti-HBc. O imunossensor apresentou resposta linear de corrente entre 1 a 5 ng/mL e limite de detecção real de aproximadamente 0,2 ng/mL, semelhante aos níveis de detecção encontrados os imunoensaios enzimáticos.

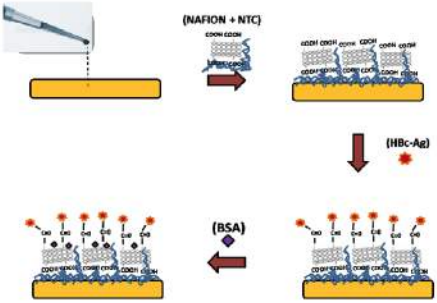


Figura 1 – Representação esquemática das etapas de construção do imunosensor.

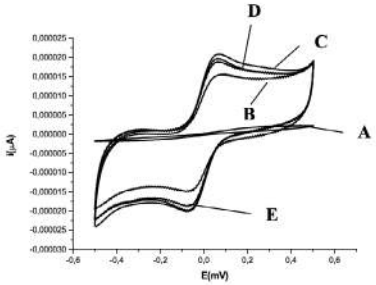


Figura 2 – Voltamogramas cíclicos mostrando cada etapa do processo de confecção do imunoeletrodo em sonda redox de $K_3Fe(CN)_6$/ $K_4Fe(CN)_6$ – 5Mmol L^{-1}; (**A**): eletrodo não modificado, (**B**): modificação de náfion/NTC-COOH, (**C**): Imobilização do HBc-Ag, (**D**): Solução de BSA, (**E**): Anti-HBc (1ng/ml).

Conclusões: O imunossensor apresenta-se como potencial ferramenta de auxílio no diagnóstico da hepatite B.

Referências e Agradecimentos

[1] Monjezi, R.; Tan,S.W.; Tey,B.T.; Sieo,C.C.; Tan,W.S.. **Journal of Virological Methods** 187 : 121-126 (2013).

[2] Changotra,H; Sehajpal,P.K. **Archives Virology** 34: 15-21 (2005).

Agradecimentos a Maria Helena de Oliveira Piazetta e Angelo Luiz Gobbi do Laboratório de Microfabricação/LNNano do CNPEM, Campinas, Brasil pela confecção dos eletrodos, e ao CNPq e FACEPE pelo suporte financeiro.

Determinação simultânea de ácido úrico e creatinina utilizando μPAD com detecção por imagem digital

Eduardo Luiz Rossini, Maria Izabel Milani, Leonardo Pezza, Helena Redigolo Pezza
eduardoluizrossini@hotmail.com; bel.milani@hotmail.com; pezza@iq.unesp.br; hrpezza@iq.unesp.br

Resumo: *O presente trabalho apresenta uma nova metodologia colorimétrica para análise simultânea de creatinina e ácido úrico em urina utilizando dispositivo analítico microfluídico em papel (μPAD). O μPAD é um dispositivo de grande importância para análises clínicas por ser um método rápido, simples, de baixo custo, não invasivo e ambientalmente amigável. A análise de creatinina se baseia no método de Jaffé e o do ácido úrico na determinação indireta de Fe^{2+} por complexação com a 1,10-fenantrolina, ambos com detecção colorimétrica por imagem digital. Após a otimização das condições experimentais realizadas com auxílio de ferramentas estatísticas, foram construídas as curvas analíticas para os analitos, as quais apresentaram faixa linear de trabalho de 50 a 600 mg L^{-1} para creatinina e de 50 a 500 mg L^{-1} para ácido úrico.*
Palavras-Chaves*: Dispositivo analítico em papel; Creatinina; Ácido úrico; Colorimetria.*

Introdução

Os rins têm funções que podem ser classificadas como excretora, reguladora e endócrina. Quando os rins perdem a sua função caracteriza-se a insuficiência renal, podendo ser aguda ou crônica. A insuficiência renal crônica (IRC) é um problema importante de saúde pública, sua incidência tem aumentado de maneira acelerada nas últimas décadas e o tratamento é a hemodiálise que é um procedimento de alto custo e complexidade. A IRC é uma doença silenciosa que não causa sintomas, sendo que a única forma de saber se os rins estão funcionando é através da dosagem de biomarcadores. Nesse sentido, a determinação de creatinina e ácido úrico em urina pode fornecer informações importantes sobre a função renal e várias doenças que afetam os seres humanos .

A creatinina (CRN) é proveniente da reação não enzimática de desidratação da creatina ou da desfosforilação da fosfocreatina durante o processo de contração muscular; sua concentração é utilizada como marcador clínico para avaliar a função renal . A reação de Jaffé é a metodologia mais utilizada por ser simples, rápida, barata e de fácil execução. Através dessa reação, o picrato alcalino reage com a creatinina produzindo um produto de coloração alaranjada . O ácido úrico (AU) é formado a partir do metabolismo das bases purínicas, por ser um composto pouco solúvel, sua deposição nas juntas das extremidades ou em outros tecidos moles gera o caso clínico conhecido como gota . O ácido úrico tem capacidade de reduzir íons Fe^{3+} a Fe^{2+} e este pode ser determinado pela reação colorimétrica com 1,10–fenantrolina.

Dada a importância da dosagem de creatinina e ácido úrico o presente trabalho contribui com o desenvolvimento de dispositivos analíticos microfluídicos em papel (μPAD) para determinação desses analitos, os quais apresentam diversas vantagens, dentre elas pode-se citar baixo custo, fácil obtenção, portabilidade, é compatível com amostras biológicas, requerem pequeno volume de amostra, biodegradável, de fácil incineração e ambientalmente amigável. Essas vantagens, aliadas à possibilidade de integrar diversos procedimentos analíticos no mesmo dispositivo aumentam o interesse no desenvolvimento de novas metodologias[4].

Procedimento experimental

A fabricação dos μPAD e dos *spot-test* com barreiras hidrofóbicas foi realizada com auxílio de uma impressora à cera com posterior aquecimento a 120 ºC por 2 minutos em estufa. Para a otimização das condições experimentais foi utilizado o planejamento fatorial do tipo 2 e posteriormente, o planejamento de superfície de resposta, com auxílio do *software* Statistica 7. Os fatores utilizados no planejamento para a reação com a creatinina foram: [ácido pícrico], [OH^-] e tempo de aquecimento; para a reação do ácido úrico foram: [Fe^{3+}] (em H_2SO_4 0,25 mol L^{-1}), [1,10–fenantrolina] (em NaOAc 0,529 mol L^{-1}) e tempo de aquecimento. Para o aquecimento do meio reacional foi utilizado um secador de cabelos. Os dois fatores de maior influência foram utilizados no planejamento de superfície de resposta. Com as condições experimentais ótimas para os dois analitos foram construídas suas respectivas curvas analíticas. Transferiu-se 10 μL da solução de padrão para uma placa de petri, o dispositivo analítico foi colocado em contato com a solução e, após o preenchimento dos canais hidrofílicos, o dispositivo foi aquecido por 50 s. Depois de 10 minutos foi digitalizado no scanner da impressora multifuncional HP F2050. As imagens digitalizadas foram tratadas, com auxílio do *software* livre ImageJ, utilizando o canal verde do histograma RGB.

Resultados e discussão

O planejamento fatorial do tipo 2 mostrou que para a reação de Jaffé para determinação da creatinina os dois fatores que mais influenciam na reação são, em ordem crescente, concentração de OH^- e tempo de aquecimento, sendo que a concentração de ácido pícrico teve menor influência e foi mantida no nível de maior resposta (0,02 mol L^{-1}). A curva de nível obtida dos dois fatores de maior influência está ilustrada na figura 1a. Os valores ótimos obtidos de concentração de OH^- e tempo de aquecimento pela superfície foram 0,437 mol L^{-1} e 53,3s. O mesmo tipo de planejamento para a reação de quantificação do ácido úrico mostrou que os dois fatores de maior influência para a reação são tempo de aquecimento e concentração de Fe^{3+}, respectivamente, enquanto que a concentração de 1,10–fenantrolina teve a menor influência sendo mantida no valor de maior resposta (0,06 mol L^{-1}). A curva de nível obtida dos dois fatores de maior influência está ilustrada na figura 1b. Os valores ótimos obtidos de tempo de aquecimento e C_{Fe}^{3+} pela superfície foram de 0,0448 mol L^{-1} e 46,7 s.

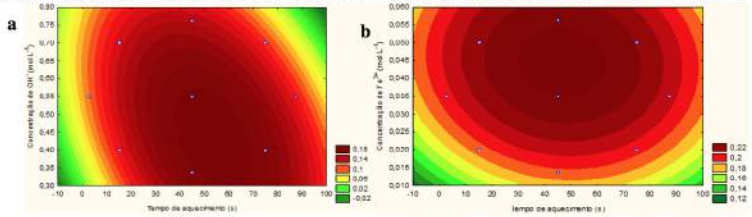


Figura 1 – Curvas de nível para a creatinina (a) e ácido úrico (b). n = 3 e canal de cor utilizado = verde.

Com as condições experimentais otimizadas foi determinado o volume ótimo de reagente e a zona de cada reagente para obtenção de coloração mais homogênea. Para os dois analitos obteve-se o volume de 2 µL em cada zona do µPAD. Para a determinação do ácido úrico a 1,10–fenantrolina em meio de NaOAc foi impregnada na zona de captação e o Fe^{3+} em meio de H_2SO_4 na zona de detecção; para a creatinina o ácido pícrico em meio de OH^- foi impregnado na zona de captação. Porém, ao invés de utilizar a concentração de OH^- do planejamento (0,437 mol L^{-1}) foi utilizado de 1,00 mol L^{-1}, pois parte do OH^- após a secagem não estava disponível no meio, diminuindo a cinética da reação e necessitando de concentração maior. O tempo de aquecimento utilizado foi de 50 s nos dois experimentos. A figura 2 ilustra o *layout* otimizado do µPAD desenvolvido e a determinação de uma solução contendo os dois analitos em concentração de 400 mg L^{-1}. A curva analítica para a creatinina foi repetitiva, apresentando faixa linear de trabalho de 50 a 600 mg L^{-1}, com equação de reta $A = -0{,}02229 + 0{,}0004010\ C_{CRN}$, coeficiente de determinação (R) igual a 0,998, limite de detecção igual a 15,7 mg L^{-1} e limite de quantificação igual a 52,4 mg L^{-1}. A curva analítica para o ácido úrico também apresentou repetitividade, apresentando faixa linear de trabalho de 50 a 500 mg L^{-1}, com equação de reta igual a $A = 0{,}01651 + 0{,}0003864\ C_{AU}$, coeficiente de determinação (R) igual a 0,997, limite de detecção igual a 16,5 mg L^{-1} e limite de quantificação igual a 54,9 mg L^{-1}.

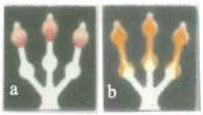


Figura 2 – Dispositivo analítico utilizado para determinação de ácido úrico (a) e de creatinina (b). C = 400 mg L^{-1}.

Conclusões

O µPAD projetado e as reações estudadas neste trabalho viabilizaram a determinação simultânea dos analitos com detecção por imagem digital. O novo método desenvolvido para determinação de ácido úrico e creatinina apresentou figuras de mérito promissoras para aplicação em amostras de urina.

Referências e agradecimentos:

L. D. P. Chaves, Revista Escola Enfermagem USP, **36**,2 (2002);
V.T. Motta, Bioquímica Clínica: princípios e interpretações, **15** (2003);
S. Narayanan, Clinical Chemistry, **26**, 8 (1980);
[4] A.W. Martinez, Analytical Chemistry, **82**, 1 (2010).

Agradecimentos: Instituto de Química – UNESP, FAPESP (Processo nº 2014/17749-7) e CNPq pelas instalações e auxílio financeiro e ao Prof. Emanuel Carrilho (IQSC/USP) pelo apoio e suporte na confecção dos µPAD.

Desenvolvimento de Testes Rápidos Imunocromatográficos Para Detecção de Cinomose Canina

Julia Pereira Postigo, Beatriz Cutilak Bianchi, Regiane F. Travensolo, Thiago Pinotti Segato, Emanuel Carrilho.

postigojp@gmail.com, beatrizbianchi@yahoo.com.br, rtravensolo@yahoo.com.br, scgato22@yahoo.com.br, cmanucl@iqsc.usp.br

Resumo: *A Cinomose é causada pelo vírus CDV, sendo considerada uma grave doença que acomete diversos mamíferos, afetando principalmente os cães. É uma enfermidade neuro degenerativa e altamente contagiosa, podendo levar a óbito o animal que não for precocemente tratado. Este trabalho visa o desenvolvimento de um teste rápido de fluxo lateral e colorimétrico, utilizando a interação antígeno-anticorpo para a detecção precoce da cinomose em cães, dispensando o uso de equipamentos de alto custo e também de mão de obra especializada. Para atingir tal grau de simplicidade, é necessário o desenvolvimento de: síntese e análise de nanopartículas de ouro (AuNPs), preparo do conjugado de AuNPs com anticorpo, tratamento dos papéis utilizados, bem como ensaios que mostrem a viabilidade do teste rápido como a sensibilidade e a especificidade.*

Palavras-Chaves: *Cinomose, Teste Imunocromatográfico, Nanopartículas de ouro (AuNPs).*

Introdução:

A Cinomose é causada pelo *Canine Distemper Virus-CDV*, que afeta diversos mamíferos, mais comumente os cães. Pertencente à Família *Paramyxoviridae* e ao Gênero *Morbillivirus*, a cinomose é considerada uma doença neuro degenerativa, altamente contagiosa, podendo levar a óbito o animal que não for precocemente tratado[i]. Uma das formas de aumentar o índice de diagnóstico precoce é através da utilização de testes rápidos e baratos, como os imunoensaios de fluxo lateral.

Os imunoensaios de fluxo lateral ganharam popularidade a partir dos anos 1980 devido à sua simplicidade e, atualmente, pela sua capacidade de fornecer informações corretas e claras, sem a necessidade da utilização de instrumentação ou reagentes adicionais. No geral, basta introduzir a amostra no dispositivo e o teste é realizado sem dificuldades, podendo em um mesmo ensaio ser testados um ou mais analitos[ii].

Esses testes são compostos de vários tipos de papel em diferentes regiões da plataforma. Devido às propriedades do papel e a função por ele exercida em cada região, é necessário variar os tratamentos para que haja um desempenho máximo de cada zona com função específica.

Para realizar o teste, a amostra é adicionada no papel (região denominada *sample pad*), migrando por capilaridade até o papel do conjugado (*conjugate pad*), que de um modo geral, é constituído por AuNPs, conjugadas com um antígeno ou anticorpo específico[ii].

Procedimento experimental:

O principal fator que afeta a migração dos conjugados é a propriedade do papel, que está intimamente ligada ao tipo de pré-tratamento o qual o papel é submetido antes da deposição da solução do conjugado. Dessa forma, utilizou-se três tipos de papéis com três diferentes tipos de tratamentos para composição do *conjugate pad*, sendo eles:

1. Imersão em uma solução de sacarose e secagem a 25 °C.
2. Imersão em uma solução contendo: KH_2PO_4/ K_2HPO_4, NaCl e NaN_3, e secagem em estufa a 37 °C por 2 h.
3. Imersão em solução contendo Tris-HCl, caseína e Triton X-100 em pH 7,4 e secagem em estufa a 37 °C por 2 h.

Após os tratamentos, os conjugados foram avaliados em três diferentes pH, onde cerca de 7 µL dos conjugados foram depositados em cada *conjugate pad* e secos por 72h. A membrana de nitrocelulose foi tratada antes da adição dos antígenos através da imersão em solução Tris-HCl e glicerol por 15 min e seca em estufa a 37 °C por 20 h. Posteriormente, a membrana foi cortada em tiras de 25 x 4 mm e imobilizou-se 1 µL de uma solução de anticorpo (24,12 mg mL^{-1}) em PBS 1x e etanol. Em seguida, foi bloqueada pela imersão das tiras em

solução Tris-HCl pH 7,6 contendo caseína, por 15 min, lavada 3x com solução Na_2HPO_4 pH 7,5 e secas em estufa a 37 °C durante 2 h.

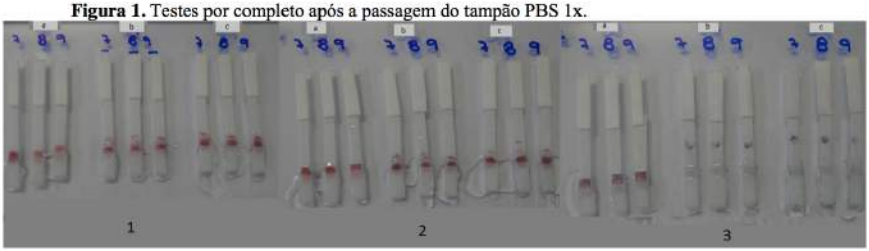
Os testes foram montados em uma placa de vidro com o auxílio de fita dupla face, sendo aplicados 100 µL de tampão PBS 1x no *sample pad*.

Resultados e discussão:

Os tratamentos da região *conjugate pad* são necessários para alterar suas propriedades, como pH e hidrofobicidade. Esses tratamentos são avaliados de acordo com a eficiência no processo de migração do conjugado e na ausência de agregação das AuNPs.

O *conjugate pad* é o mais determinante na variação dos testes de fluxo lateral, podendo haver absorção inconsistente, desestabilização do conjugado, baixa taxa de liberação ou forte interação do conjugado com a fibra do papel impossibilitando seu desprendimento[ii]. Dessa forma, o pré-tratamento do *conjugate pad* deve ser escolhido com cautela e otimizado para evitar a ocorrência desse tipo de efeito. Esses tratamentos geralmente são feitos a partir da imersão do *conjugate pad* em soluções que contenham proteínas, surfactantes, sais, ou até mesmo algum polímero, sendo secos logo em seguida em temperatura ambiente ou em altas temperaturas. Todas as etapas devem ser bem controladas, inclusive a concentração e tipos de reagentes utilizados, para que não haja variação de um teste para outro[ii]. A figura 1 mostra os resultados obtidos com os diferentes conjugados, em diferentes papéis e pH.

Figura 1. Testes por completo após a passagem do tampão PBS 1x.



Para os *conjugate pads*, é possível observar que o tratamento 3 permitiu uma migração eficiente dos conjugados até a região teste, no entanto houve alteração de cor do conjugado, de vermelho para preto, devido à agregação. Esses testes serão repetidos com AuNPs menores, a fim de diminuir o tamanho do conjugado e observar os padrões de migração nos demais tratamentos utilizados.

Conclusões:

Com esses testes, foi possível observar que os papéis B e C no tratamento 3 foram os que apresentaram melhor migração. Mesmo apresentando agregação, foi possível verificar a interação entre AuNPs e anticorpo secundário, visto que a sinalização ocorreu. Também observou-se na faixa de pH de 7 a 9 que não há diferença na migração do conjugado em um mesmo tipo de papel.

Referências e agradecimentos:

i- KOUTINAS A.F.; POLIZOPOULOU Z.S.; BAUMGAERTNER W.; LEKKAS S. & KONTOS. **Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis.** J. Comp. Pathol 2002 v. 126 p. 47-56

ii- Wong, C. R., Tse, H. Y. **Lateral Flow Immunoassay**. Springer 2009

Pré-concentração em fase sólida em microdispositivo fluídico à base de uretano-acrilato.

Laiz de Oliveira Magalhães, Alexandre Fonseca

laizdeoliveiramagalhaes@gmail.com; afonseca@unb.br

Resumo: *Este trabalho descreve o desenvolvimento de um microdispositivo à base de uretana-acrilato com coluna integrada para pré-concentração em microesferas de resina de troca aniônica, as quais foram empacotadas manualmente em um mini-reservatório com dimensões de 20x1,5x1,0 mm. Ensaios indicaram a inexistência de vazamentos e/ou entupimentos dos microcanais e a possibilidade de uso do microssistema com vazões elevadas (2,0 mL min^{-1}), usualmente necessárias para o gerenciamento de maiores volumes de amostra. Empregando-se a detecção fotométrica in-chip com correção do efeito Schlieren, avaliou-se o desempenho do dispositivo na pré-concentração e recuperação de íons nitrito em águas naturais, estimando-se um fator de concentração de aproximadamente 5 vezes e um limite de detecção de 40 µg L^{-1} utilizando 3,8 mL de amostra para a pré-concentração. Adicionalmente, recuperações variando entre 95% e 101% foram alcançadas demonstrando o desempenho adequado do microssistema fluídico para a referida determinação.*

Palavras-Chaves: *Extração em fase sólida; Troca Iônica; Pré-concentração; Nitrito.*

Introdução: A integração de mini-colunas com material sólido para extração e pré-concentração *in chip* é um dos grandes desafios no desenvolvimento de microssistemas fluídicos de análise. Parte desta dificuldade está relacionada ao próprio processo de fabricação dos dispositivos, o qual exige muitos cuidados para se evitar a selagem ineficiente das estruturas ou o entupimento dos microcanais com o material particulado da coluna. Recentemente, foi demonstrado que a técnica de fotolitografia profunda pode ser utilizada com sucesso para a construção de microdispositivos fluídicos em uretano-acrilato com colunas empacotadas com cádmio finamente dividido, permitindo a redução *on-column* de espécies químicas [1]. Partindo-se deste estudo, propôs-se no presente trabalho o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos com colunas integradas para a extração e pré-concentração em fase sólida baseadas em uma resina de troca aniônica (Dowex 1X8), com o objetivo de potencializar a seletividade e sensibilidade analítica dos procedimentos baseados em microssistemas fluídicos para determinações de ânions como o nitrito.

Procedimento experimental: O microssistema fluídico foi construído a partir do procedimento descrito por Fonseca e colaboradores [2] utilizando-se o layout apresentado na Figura 1, contendo um arranjo de canais em "cruz" para comutação das soluções de trabalho, um reservatório para empacotamento da coluna (*20x1,5x1,0 mm*), uma bobina de reação, um canal para adição de solução de reagente cromogênico e uma célula fotométrica com caminho óptico de 5 mm. As microesferas de resina Dowex 1X8 *(50 a 100 mesh)* foram inseridas na coluna, previamente a selagem, com o auxílio de uma espátula. Para a detecção fotométrica, utilizou-se um LED (LZ4-00MA10, LedEngin) emitindo em 520 nm e 620 nm (para correção do efeito Schlieren) e fibras ópticas plásticas com 250 µm de diâmetro para guiar a radiação do LED ao dispositivo e deste até o detector (fotodiodo OPT-101).

Utilizando a configuração de fluxo apresentada na Figura 1, avaliou-se o desempenho do dispositivo para a extração e pré-concentração de íons nitrito em águas naturais. Cerca de 3,8 mL de soluções padrão do analito (50 a 200 µg L^{-1}) ou de amostras fortificadas foram impelidas pela coluna através da válvula 2 por 200 segundos a uma vazão de 1,2 mL min^{-1}. Em seguida, água destilada foi utilizada para lavagem da coluna, sendo bombeada através da válvula 3 durante 100 segundos a uma vazão de 0,4 mL min^{-1}. Por fim, os íons nitrito foram eluídos com uma solução 1,0 mol L^{-1} de HCl através da válvula 1 à vazão de 0,4 mL min^{-1} e confluídos com a solução do reagente cromóforo (Griess) NED/SAM seguindo até a célula de detecção.

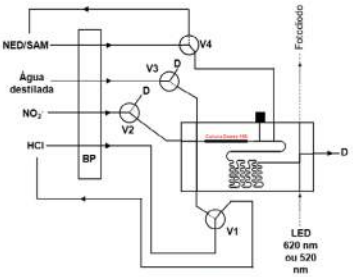


Figura 1: Configuração de fluxo utilizada na pré-concentração de íons nitrito utilizando um microdispositivo com coluna de troca iônica integrada (BP – bomba peristáltica; V1 a V4 – válvulas solenoides; D – descarte).

Resultados e discussão: Imagens de microscopia óptica (Figura 2A e 2B) mostraram que as microesferas foram distribuídas uniformemente na coluna, sem caminhos preferenciais, e que uma pequena esponja de poliuretano, alojada em uma das extremidades do reservatório, impediu a passagem das partículas para os canais adjacentes. Não foram observados vazamentos ou entupimentos no sistema sob vazões de até 2,0 mL min^{-1}, o que possibilitou o bombeamento de volumes maiores de amostra através da coluna em um intervalo de tempo reduzido, permitindo maiores fatores de pré-concentração do analito. Baseada na altura dos sinais analíticos transientes (Figura 2C), obteve-se uma curva analítica com coeficiente de correlação linear (R) de 0,994, sendo determinado um limite de detecção de 40 µg L^{-1}, valor que é cerca de 80 vezes menor que o limite máximo de nitrito permitido para águas naturais pela legislação brasileira [3]. A precisão das medidas foi estimada em 5,4% a partir de 4 injeções sucessivas de um padrão com concentração de 100 µg L^{-1} e as recuperações para três amostras de água superficiais coletadas em diferentes pontos do lago Paranoá (Brasília-DF) e posteriormente fortificadas a 120 µg L^{-1} com o analito, situaram-se entre 95 % e 101 %.

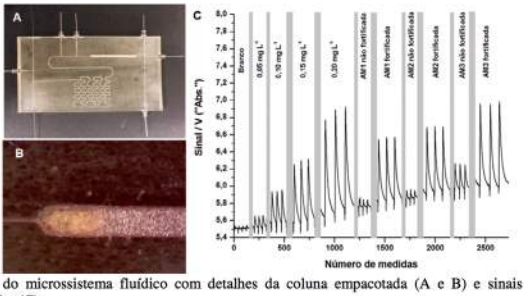


Figura 2: Imagens do microssistema fluídico com detalhes da coluna empacotada (A e B) e sinais transientes para a determinação de nitrito (C).

Conclusões: A integração de uma coluna de troca aniônica em um microssistema fluídico de uretano-acrilato foi realizada de forma eficiente e a determinação fotométrica de íons nitrito a partir do dispositivo proposto demonstrou um desempenho analítico adequado.

Referências e agradecimentos:

Referências: [1] L. N. N. Nóbrega, L. O. Magalhães and A. Fonseca. Microchemical Journal **110**, 553 (2013). [2] A. Fonseca, I. M. Raimundo Jr, L. O. S. Ferreira and J. J. R. Rohwedder, Anal. Chim. Acta **603**, 159 (2007). [3] Resolução CONAMA 357.

Ao CnPq pelo suporte, ao INCTAA e ao IQ-UnB (PPGQ).

Sensor Microfluídico de Umidade baseado em Filme Biopolimérico Funcionalizado com Nanopartículas de Prata

Vitor Neodini Remedio, Rafael Yano Makiguza, Murilo M. Baesso, Clóvis Fischer.

vitor.remedio@usp.br, rafael.makiguza@usp.br, baesso@usp.br, cfischer@usp.br

Resumo: *Sensores de umidade são de grande importância em processos industriais e aplicações em agricultura, particularmente na agricultura de precisão. Um sistema microfluídico para análise de umidade em ar foi desenvolvido com o intuito de se determinar a umidade do solo por meio de uma sonda bombeando o ar deste. A unidade sensora é constituída por eletrodos interdigitados sobre os quais foi aplicado um filme biopolimérico baseado em gelatina e plastificado com sorbitol, no qual foram crescidas nanopartículas de prata (NP-Ag) com as finalidades de aumentar a condutividade elétrica deste filme e de aumentar a vida útil deste filme com relação à ação de microorganismos, devido às propriedades antibacterianas destas nanopartículas. Resultados preliminares revelam resposta rápida à variação de umidade e ausência de histerese.*

Palavras-Chaves: *Sensores, Microfluídica, Biopolímeros, Nanopartículas de Prata*

Introdução: Com o crescimento populacional decorre a necessidade de aumento na produção de alimentos, materiais e combustíveis de forma sustentável. Uma alternativa para produção destes produtos é a agricultura, onde surge a aplicação de novas tecnologias para uso mais racional das áreas agricultu̇ráveis, resultando no que se define agricultura de precisão, onde sensores e instrumentação são de importância fundamental. O uso incorreto da água em sistemas de irrigação, de defensivos agrícolas e de insumos resultam em impactos negativos ao meio ambiente e progressiva degradação do solo [1]. Este trabalho tem como proposta o desenvolvimento de um sensor eletrônico do tipo planar com eletrodos interdigitados [2, 3] e elemento sensor composto por filme biopolimérico de gelatina plastificado com sorbitol e funcionalizado com nanopartículas de prata. As nanopartículas de prata (NP-Ag) tem as funções de aumentar a condutividade elétrica do conjunto sensor (eletrodos interdigitados e biopolímero) bem como aumentar a vida útil do biopolímero devido às propriedades bactericidas [4]. A este sensor, amostras de gases serão conduzidas por meio de um sistema microfluídico e de bombeamento, resultando em um dispositivo final composto por elemento sensor em uma lâmina de vidro inferior e microfluídica em uma lâmina de vidro superior, unidos por PDMS (Polydimethylsiloxane), como ilustrado na Figura 1.

Procedimento experimental: Os eletrodos foram confeccionados utilizando técnicas de microfabricação sobre lâminas de vidro BK7 medindo 25x25 mm e com 1 mm de espessura, envolvendo fotolitografia, deposição metálica de tungstênio (20 nm) e ouro (100 nm) e remoção por "lift-off". Os micro canais foram fabricados em lâminas de vidro BK7 medindo 14x25 mm e com 1 mm de espessura, e obtidos por corrosão com solução BHF (Buffer de Ácido Fluorídrico). As geometrias dos canais foram definidas por processo fotolitográfico. Ambas máscaras para os eletrodos e para os micro canais estão ilustrados na Figura 2. A solução filmogênica para obtenção do filme biopolimérico foi elaborado dissolvendo-se 2 g de gelatina de pele de porco em 40 ml de H_2O DI (ρ > 18 MΩ.cm), 0,2 g de sorbitol (agente plastificador) e 0,340 mg de $AgNO_3$ dissolvidos em 10 ml de H_2O DI (ρ > 18 MΩ.cm) resultando em uma solução de concentração 0,2 M nos 10 ml de solução e finalmente adicionados à solução de gelatina + sorbitol totalizando em um volume final de 50 ml. O processo de redução da prata em nanopartículas de prata foi ativada expondo-se a micro ondas (f = 2,45 GHz, P = 1000W) por 20 s, utilizando-se um reator de PTFE. A formação do filme de biopolímero sobre os eletrodos interdigitados foi realizada pelo processo "casting". A solução filmogênica foi diluída na proporção 1:10 em H_2O DI (ρ > 18 MΩ.cm) e 0,5 µl foi aplicado com micropipeta sobre a região dos eletrodos e colocado para secar em estufa à 50 ^{0}C por 10 min, resultando em um filme com espessura aproximadamente 5 µm.

Resultados e discussão: Os dispositivos ainda estão sendo elaborados e a técnica de união entre a lâmina de vidro contendo os canais microfluídicos e a lâmina de vidro contendo os eletrodos foi realizada com sucesso, não apresentando vazamentos. Um teste preliminar em uma lâmina com eletrodos e filme biopolimérico com NP-Ag em aberto e aplicando-se um fluxo de ar contendo umidade com concentração desconhecida apresentou variação da impedância. Estas medidas foram realizadas empregando-se um potenciômetro (R = 107 kΩ) em série com os eletrodos + biopolímero funcionalizado, um gerador de funções (onda senoidal) com amplitude de 10 V e

f = 1 kHz. Os sinais foram analisados com osciloscópio, resultando em uma amplitude de 400 mV no sensor, a qual variou para 600 mV após a aplicação do fluxo de ar úmido.

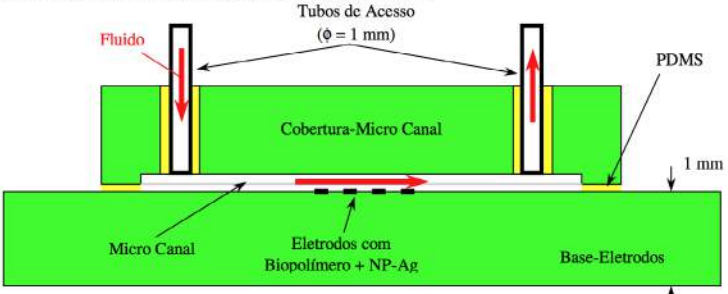


Figura 1. Ilustração em corte do Dispositivo Microfluídico Sensor de Gases.

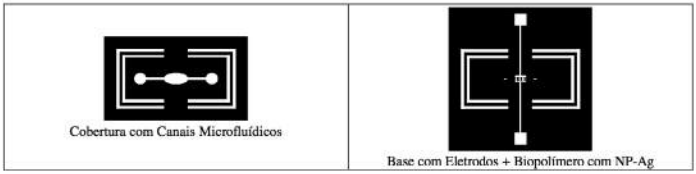


Figura 2. Fotomáscaras para confecção dos eletrodos e dos canais microfluídicos.

Conclusões: Um dispositivo microfluídico para sensoriamento de umidade em gases foi desenvolvido. A união entre a base com os eletrodos e a cobertura com os canais microfluídicos foi realizada com sucesso e sem apresentar vazamentos. Em uma base com eletrodos, foi aplicado fluxo de ar com umidade variável, e foi observada variação da impedância apresentada pelo sistema eletrodos+biopolímero funcionalizado com NP-Ag.

Referências:

[1] L. M. Rabello, EMBRAPA - DOCUMENTOS **No.43.** Condutividade elétrica do solo, tópicos e equipamentos, (2009).

[2] J. S. Costa, A. Flacker, F. Fruett. ECS Transactions **23 (1)** (2009)

[3] R. N. Dean, A. K. Rane, M. E. Baginski, J. Richard, Z. Hartzog, D. Elton. IEEE Trans. Inst. Meas. **61 (4)** (2012).

[4] M. Valodkar, A. Bhadoria, J. Pohnerkar, M. Mohan, S. Thakore. Carbohydrate Research **345** (2010).

[5] J. G. Borges, M. Tagliamento, A. G. Silva, P. J. A. Sobral, R. A. de Carvalho. Ciência e Tecnologia de Alimentos 33 (1) (2013).

Agradecimentos:

Agradecemos à Pro-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo pelo Programa de Iniciação Científica PIBIC-RUSP, ao Laboratório de Microfabricação (LMF) do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), ao Laboratório Multiusuário de Análise de Alimentos da FZEA-USP e ao Departamento de Medicina Veterinária da FZEA-USP.

Desenvolvimento de um teste rápido microfluídico para detecção de sulfonamidas em leite a partir de ensaios colorimétricos

Ana Carolina Rafanhin Sousa, Emanuel Carrilho

carolrafanhin@gmail.com, emanuel@iqsc.usp.br

Resumo: *As sulfonamidas são antibióticos que apresentam diferentes atividades, como antibacteriana, antiparasitária, além de ser muito utilizada como estimulante para o crescimento animal. Devido sua utilização inadequada, torna-se comum a presença de resíduos desses antibióticos em alimentos, incluindo o leite, fator preocupante para a saúde, pois as sulfonamidas podem provocar resistência bacteriana, reações alérgicas, intoxicações e até mesmo tumores de tireóide. Algumas isoformas das metaloenzimas anidrases carbônicas são bastante utilizadas na detecção de sulfonamidas. Assim, este trabalho consiste no desenvolvimento de um método simples, rápido, portátil e de baixo custo, para detecção de sulfonamidas em leite bovino, por meio da inibição da anidrase carbônica pelas sulfonamidas, através de um dispositivo microfluídico de papel com detecção colorimétrica.*

Palavras-Chaves: *sulfonamidas, anidrase carbônica, microfluídica, colorimétrico.*

Introdução: As sulfonamidas são antibióticos bacteriostáticos inibidores da síntese de ácido fólico e muitas delas apresentam atividade antimicrobiana.[1,2] Elas são bastante utilizadas para prevernir e controlar uma série de doenças em práticas veterinárias, tais como infecções respiratórias e gastrointestinais. Elas são administradas por via oral ou misturadas em alimentos para animais, com fins terapêuticos ou profiláctico, devido ao seu largo espectro de actividade e os seus baixos custos.[1]

Algumas vezes as sulfonamidas são adicionadas à ração animal para evitar a proliferação de bactérias e infecções em animais produtores de alimentos. No entanto, por vezes, tratamentos baseados em antibióticos são aplicados sem respeitar as recomendações de segurança. Quando tratamentos inadequados à base de antibióticos são utilizados no tratamento de doenças bovinas, os resíduos indesejáveis podem permanecer em ambos os tecidos dos animais e nos fluidos biológicos, incluindo leite.[1,2] Estes resíduos são de grande preocupação em saúde pública, devido ao risco de desenvolver bactérias resistentes a antibióticos, o que leva à ineficácia do medicamento para o uso terapêutico.[3,4]

Anidrases carbônicas são metaloenzimas, usualmente contendo um íon zinco (II) no sítio ativo, que catalizam a hidratação reversível entre dióxido de carbono e água, para gerar bicarbonato e prótons, uma reação de fundamental importância em muitos organismos.[5-9] Elevadas quantidades dessas enzimas são encontradas em diferentes células e tecidos dos organismos mais investigados.[6] Descobertas há cerca de oitenta anos, as anidrases carbônicas foram muito investigadas, principalmente devido às aplicações biomédicas apresentadas pelos seus inibidores. Medicamentos a base de sulfonamidas os quais interferem na atividade das anidrases carbônicas são clinicamente usados há quase 60 anos. A inibição da anidrase carbônica possui aplicações farmacológicas em diversos campos, tais como agentes e ferramentas de diagnóstico antiglaucoma, anticonvulsivo, antiobesidade e anticancerígeno.[5,6]

Os primeiros indícios para o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos em papel ocorreram a partir de 1940, época em que a cromatografia em papel foi utilizada a fim de separar clorofila a partir de folhas de plantas. Müller e seus colaboradores foram os primeiros a dar origem a canais confinados em superfícies de papel por meio da infusão de papel de filtro com parafina, em 1949. Assim, usaram um molde de metal quente para impregnar a parafina no papel de forma a criar barreiras hidrofóbicas as quais mantinham o fluxo do fluido confinado.[10] Sensores fabricados em papel em microescala apresentam-se como uma nova alternativa de tecnologia, pois são dispositivos simples, de fácil e rápida fabricação, requerem uma mínima infraestrutura, são portáteis, descartáveis, biodegradáveis e apresentam baixo custo.

Procedimento experimental: Para detecção das sulfonamidas em leite bovino, são utilizados dispositivos microfluídicos de papel. Assim, algum *layouts* de microdispositivos foram desenhados com auxílio do CorelDRAW® X6. Em seguida, vários dispositivos correspondentes a cada *layout* foram impressos em folhas distintas de diferentes tipos de papel, através de uma impressora à cera.

Com os microdispositivos já impressos, cada folha contendo um *layout* de chip foi submetida a 150 °C durante 2 minutos, por meio de uma chapa de aquecimento. Esta etapa tem como finalidade fazer com que a cera atravesse as fibras do papel e forme canais capilares em ambos os lados do mesmo.
O princípio fundamental da técnica de fabricação dos μPADs consiste no contraste entre hidrofilicidade e hidrofobicidade sobre uma folha de papel, a fim de criar canais capilares em micro escala.[18] Já o processo de introdução de soluções nos μPADs é facilmente realizado, sem a necessidade de sistema de bombeamento externo. A modificação química da superfície do papel com os reagentes apropriados permite que os μPADs sejam desenvolvidos de maneira simples e rápida para detecção colorimétrica de diversos analitos, no caso, as sulfonamidas.

Resultados e discussão: Os dispositivos microfluídicos de papel são constituídos basicamente por duas zonas: de reação e de detecção. Estas zonas podem ser as mesmas ou então separadas. Quando a solução de amostra atinge a zona de reação, ocorre reação química entre o composto de interesse e os demais reagentes, de forma a se desenvolver, ou não, uma cor, a qual é observada na zona de detecção. A intensidade da cor originada pode ser usada para análises qualitativas e quantitativas.
A anidrase carbônica em contato com ésteres, por exemplo, acetato de 4-nitrofenila, produz acetato e nitrofenolato, que ionizam formando ânions de coloração amarelo brilhante. Na presença do inibidor, essa reação não ocorre, não havendo então o aparecimento da cor amarela. Assim o dispositivo de papel é composto por duas áreas de reação. Em contato com o dispositivo, a matriz encontra a primeira área contendo anidrase carbônica, segue para a segunda área e, ao entrar em contato com o éster, caso a sulfonamida esteja presente na matriz, a anidrase carbônica é inibida, impedindo a hidrólise do 4-nitrofenil e, conseqüentemente, impede o aparecimento da coloração amarelo brilhante.

Conclusões: Foi possível desenvolver um protótico de um teste rápido para detecção de sulfonamidas em leite bovino, a partir da inibição da metaloenzima anidrase carbônica, a partir de uma plataforma em papel que, comparado aos testes de análises convencionais, apresenta vantagens como o uso de pequeno volume de amostras, pouco tempo requerido na fabricação dos dispositivos quanto na realização dos ensaios, apresenta baixo custo e é totalmente portátil, o que torna possível a análise do leite no campo.

Referências e agradecimentos:
Referências: [1] SANTOS, B.; LISTA, A.; SIMONET, B. M.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. Screening and analytical confirmation of sulfonamide residues in milk by capillary electrophoresis-mass espectrometry. Electrophoresis, 26, p. 1567,1575, 2005.
[2] REEVES, V. B. Confirmation of multiple sulfonamide residues in bovine milk by gas chromatography-positive chemical ionization mass espectrometry. Journal of Chromatography B, 723, p. 127-137, 1999.
[3] WEN, Y.; ZHANG, M.; ZHAO, Q.; FENG, Y-Q. Monitoring of five sulfonamide antibacterial residues in milk by in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, p. 8468-8473, 2005.
[4] BRADY, M. S.; KATZ, S. E. Antibiotic/Antimocrobial residues in milk. Journal of Food Protection, 51, p. 8-11, 1988.
[5] Editorial. Carbonic anhydrases. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 21, p. 1377-1378, 2013.
[6] SYRJÄNEN, L.; PARKKILA, S.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C. T. Sulfonamide inhibiton studies of the beta carbonic anhydrase from *Drosophyla melanogaster*. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 24, p. 2797-2801, 2014.
[7] HASSAN, M. I.; SHAJEE, B.; WAHEED, A.; AHMAD, F.; SLY, W. S. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 21, p. 1570-1582, 2013.
[8] MILLER, W. H.; DESSERT, A. M.; ROBLIN JR, R. O. Heterocyclic sulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors. Contribution from the Chemotherapy Division, Stamford Research Laboratories, American Cyanamid Company, 72, p. 4893-4896, 1950.
[9] SUPURAN, C. T.; SCOZZAFAVA, A.; CASINI, A. Carbonic anhydrase inhibitors. DOI 10.1002/med. 10025, p. 146-188, Italy.
[10] DAVID, R. B.; LI, X.; SHEN, W. Patterned paper and alternative materials as substrates for low-cost microfluidic diagnostics. Microfluidic Nanofluidic, 13, p. 769-787, 2012.

Eletrodeposição de óxido de grafeno reduzido sobre eletrodos de Pt para uso como sensor amperométrico em microchips

Bruno Gabriel Lucca[a], Fábio de Lima[a], Wendell K. T. Coltro[b], Valdir Souza Ferreira[a]

bruno.lucca@ufms.br; fabio.lima@ufms.br; wendell@ufg.br; valdir.souza@ufms.br

[a] Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil
[b] Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

Resumo: *Este trabalho apresenta o desenvolvimento e a aplicação de um inédito eletrodo modificado com grafeno para uso como sensor amperométrico em microchips. O eletrodo modificado foi obtido por meio da redução eletroquímica de óxido de grafeno sobre a superfície de um eletrodo de trabalho de Pt integrado em um microchip comercial. A caracterização da superfície do eletrodo modificado foi realizada por meio das técnicas de MEV e voltametria cíclica. Os resultados indicaram que o grafeno eletrodepositado aumentou a condutividade e a sensibilidade do eletrodo. A performance do sensor desenvolvido foi avaliada por meio da separação e detecção dos ânions iodeto e ascorbato. O eletrodo modificado com grafeno proporcionou maior detectabilidade, melhores eficiências de separação e LD mais baixos do que aqueles obtidos com o eletrodo de Pt sem modificação. Por ultimo, o eletrodo modificado foi aplicado na detecção de ácido ascórbico (como ascorbato) em uma amostra de medicamento comercial.*

Palavras-Chaves: *detecção amperométrica; eletrodeposição; eletrodos modificados; grafeno; microchips.*

Introdução: O grafeno é um dos materiais mais investigados nos últimos anos devido ao fato de possuir propriedades térmicas, mecânicas e elétricas consideradas únicas [1]. Dentre as diversas aplicações do grafeno, uma da mais promissoras e exploradas envolve seu uso como sensor eletroquímico [2]. São relatados na literatura vários métodos para obtenção de eletrodos contendo grafeno, sendo que o mais utilizado é a modificação das superfícies de eletrodos. Estas modificação pode ser obtida por meio da redução eletroquímica do óxido de grafeno (GO) sobre uma superfície eletródica, processo no qual grupos funcionais oxigenados são removidos das folhas de GO [3]. A eletroforese em microchips (ME) é uma técnica consolidada nos dias atuais [4]. Entre algumas das vantagens da ME sobre outras técnicas analíticas de separação estão os menores tempos de análise, consumo reduzido de amostra e reagentes e a possibilidade de integrar diversas etapas analíticas em um único dispositivo [5]. Ao mesmo tempo, a detecção amperométrica (AD) é um método interessante para ser acoplado com ME e têm sido usada com sucesso [6]. A aplicação de sensores amperométricos contendo grafeno para detecção em ME é pouco explorada na literatura. Neste contexto, este trabalho propõe a modificação de eletrodos de Pt por meio da eletrodeposição grafeno para uso como sensor amperométrico em ME.

Procedimento experimental: *Soluções e reagentes:* tampão fosfato 10 mM em pH 6,5 contendo 200 µM de brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA). *Analitos:* iodeto de potássio e ácido ascórbico (AA) solubilizados em água ultrapura. *Microchip:* os experimentos eletroforéticos foram obtidos utilizando um microchip comercial (Micrux, modelo MCE-SU8-Pt002T) contendo um sistema de detecção eletroquímico integrado que consiste em três eletrodos de Pt (referência, trabalho e auxiliar). *Modificação do eletrodo de trabalho:* a eletrodeposição de grafeno na superfície do eletrodo de trabalho de Pt foi realizada por meio da redução eletroquímica do GO disperso em uma solução de KH_2PO_4 100 mM (pH 6,5), que foi levada ao reservatório de detecção do microchip. Voltametria cíclica (VC) no intervalo de potencial de 0 a -1,5 V foi aplicada para a eletrodeposição. *Detecção amperométrica e VC:* os experimentos foram realizados em um potenciostato Autolab PGSTAT128N equipado com um módulo para baixas correntes (ECD). Utilizou-se um sistema de 3 eletrodos: eletrodo de trabalho de Pt modificado com óxido de grafeno eletroquimicamente reduzido (Pt-GOER) e eletrodos de referência e auxiliar de Pt, todos integrados ao microchip. *Procedimentos eletroforéticos:* um equipamento *home-made* equipado com uma fonte de alta tensão de 0 a -2000 VDC foi usado para as separações. Antes de cada dia de uso, o microchip foi tratado com NaOH 0,1 M, água ultrapura e tampão por 20, 15 e 15 min, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados usando polaridade reversa e injeção eletrocinética. *Caracterização da superfície:* a microestrutura do eletrodo de Pt modificado foi caracterizada por meio da técnica de MEV. *Amostra:* o eletrodo modificado foi aplicado na determinação de AA em um amostra de medicamento comercial adquirido em uma farmácia local. A amostra foi diluída na proporção 1:1000 em água ultrapura e injetada no microchip.

Resultados e discussão: Imagens de MEV foram usadas para caracterizar a morfologia da superfície do eletrodo de Pt sem modificação e do eletrodo de Pt-GOER. Observou-se que o eletrodo de Pt-GOER possui uma morfologia diferente do eletrodo de Pt, apresentando uma estrutura típica de folhas de grafeno [7]. O comportamento eletroquímico do eletrodo modificado foi investigado por meio de VC usando iodeto e ascorbato como analitos modelo. Em comparação com o eletrodo de Pt sem modificação, o eletrodo de Pt-GOER apresentou maiores correntes capacitivas e maiores correntes de pico (aumento na ordem de 200%) para os analitos utilizados, assim como menores valores de potenciais de meia-onda. Para avaliar a performance do eletrodo de Pt-GOER como sensor amperométrico em ME, um microchip comercial com eletrodos integrados na configuração end-channel foi usado para monitorar a separação eletroforética de dois analitos modelo (iodeto e ascorbato). Entre os tampões avaliados, aquele que apresentou os melhores resultados foi o tampão fosfato 10 mM no pH 6,5 juntamente com 200 μM de BCTA. Devido ao fato de todos os analitos estarem carregados negativamente neste valor de pH, o uso de um surfactante catiônico (BCTA) junto com polaridade reversa foi essencial para inversão do EOF e diminuição dos tempos de migração, assim como para melhorar a resolução das separações. Voltamogramas hidrodinâmicos para ambos os eletrodos (Pt e Pt-GOER) foram obtidos variando-se o potencial de detecção de +0,2 até +1,0 V em incrementos de 0,1 V. Conforme esperado, as correntes de pico obtidas com o eletrodo de Pt-GOER foram maiores que aquelas observadas com o eletrodo de Pt sem modificação, sendo que o máximo de corrente foi verificado em +0,8 V. As separações eletroforéticas foram conduzidas em uma mistura de iodeto 100 μM e ascorbato 200 μM. Novamente, em comparação com o eletrodo de Pt sem modificação, o eletrodo de Pt-GOER propiciou melhor sensibilidade (896 *vs.* 210 pA/μM para o iodeto e 218 *vs.* 128 pA/μM para o ascorbato) e menores valores de LD (1,5 *vs.* 5,3 μM para o iodeto e 3,1 *vs.* 7,3 μM para o ascorbato). O uso do eletrodo de Pt-GOER como sensor amperométrico em ME, em comparação com o eletrodo de Pt sem modificação, também forneceu melhores valores para parâmetros eletroforéticos tais como resolução de pico (1,6 *vs.* 1,0) e eficiências de separação (3400 *vs.* 700 pratos/m para o iodeto e 10600 *vs.* 2400 pratos/m para o ascorbato). A repetibilidade do eletrodo modificado foi avaliada por meio de nove injeções sucessivas de iodeto e ascorbato. O eletrodo de Pt-GOER apresentou valores de desvio padrão relativo (DPR) de aproximadamente 6,6% para as correntes de pico e 1,7% para os tempos de migração. A reprodutibilidade foi investigada por meio da realização de um estudo entre 3 microchips diferentes contendo eletrodos de Pt modificados. Os valores de DPR para as correntes de pico e para os tempos de migração foram de cerca de 9,6% e 3,0%, respectivamente. Uma curva de calibração foi construída na faixa de concentração de 10 a 100 μM obtendo-se boa linearidade (R=0,998). Por último, o eletrodo de Pt-GOER foi aplicado na determinação de AA (na forma de ascorbato) em um medicamento comercial (Cenevit C) por meio do método de adição de padrão. As análises foram realizadas em triplicata diluindo alíquotas da amostra em água ultrapura, contaminando com quantidades conhecidas de solução padrão de AA e injetando no microchip. Os valores obtidos apresentaram boa concordância (95,7%) com o valor de referência fornecido no rótulo do medicamento.

Conclusões: Neste trabalho é apresentado um método para modificação de eletrodos de Pt com grafeno para uso como sensor amperométrico em microchips. Imagens de MEV e experimentos de voltametria cíclica forneceram informações sobre a estrutura, morfologia e comportamento eletroquímico do eletrodo modificado. Conforme os dados obtidos, a deposição de grafeno sobre o eletrodo de Pt melhorou significativamente a sensibilidade do eletrodo quando comparado com o eletrodo de Pt sem modificação. O uso do eletrodo de Pt-GOER como sensor amperométrico para a separação eletroforética de analitos modelo apresentou melhores resultados em termos de eficiências de separação, resolução de pico e limites de detecção, quando comparado ao eletrodo sem modificação. Além disso, o eletrodo de Pt modificado com grafeno proposto neste trabalho apresentou viabilidade para aplicações analíticas, conforme demonstrado por meio de sua aplicação para a determinação de ácido ascórbico em uma amostra de medicamento comercial.

Referências e agradecimentos:

[1] M. Hilder, et al., Physical Chemistry Chemical Physics **13**, 9187 (2011).
[2] M. Zhou, Y. Zhai, S. Dong, Analytical Chemistry **81**, 5603 (2009).
[3] G. T. Liu, et al., Biosensors and Bioelectronics **56**, 26 (2014).
[4] R. Castañeda et al.; Electrophoresis **34**, 2129 (2013).
[5] Z. Xu; R. D. Oleschuk, Electrophoresis **35**, 441 (2013).
[6] A. Fernandez-la-Villa, et. al.; Electrophoresis **31**, 2641 (2010).
[7] F. de Lima, G. Maia.; Nanoscale **7**, 6193 (2015).

Os autores agradecem à Capes e ao CNPq pelo auxílio financeiro, à UFG e à UFMS onde todo o trabalho experimental foi realizado.

Microchips em OSTE com molde de PDMS

Alieth S. P. Cavassa, Camila D. Madeira Campos, José Alberto Fracassi da Silva.
g073862@iqm.unicamp.br; camila.campos@iqm.unicamp.br; fracassi@iqm.unicamp.br;

Resumo:
Apresentamos aqui uma alternativa aos moldes convencionais fabricados em sala limpa, que pode ser utilizada na fabricação de dispositivos microfluídicos de OSTE. O método baseia-se na construção de um molde primário por gravação em acrílico e na transferência do padrão para o dispositivo utilizando um molde intermediário preparado em poli (dimetilsiloxano). São descritos o método de fabricação e a caracterização dos dispositivos.

Palavras-Chaves: *off-stoichiometric thiol-ene, fabricação de moldes, Poli(dimetilsiloxano)*

Introdução: Polímeros de alil-tiol em proporções não estequiométricas (OSTE, do inglês: *off-stoichiometric thiol-ene*) foram desenvolvidos como alternativa ao poli(dimetilsiloxano) - PDMS - em microfluídica [1]. A escolha deste material é vantajosa por permitir maior flexibilidade na funcionalização da superfície e selagem mais eficiente. Contudo, a produção do molde representa uma das dificuldades na produção de microchips em OSTE por requerer estrutura de sala limpa [1] – o que torna o processo bastante custoso - e dificuldades no momento de desmoldar o material com os canais impressos.

Este trabalho apresenta uma solução simples e de baixo custo para a obtenção de microdispositivos de OSTE. A fabricação dos moldes dispensa o uso de sala limpa. Baseando-se na elevada tensão superficial existente entre as superfícies de OSTE e PDMS [2], propõe-se um método de produção de microchips em OSTE utilizando moldes de PDMS, que oferecem desmolde mais fácil do que as alternativas convencionais. O PDMS é moldado a partir de padrões primários de acrílico. Solução similar foi proposta por Sikanen et al. [3].

Procedimento experimental

Materiais:
Placas de acrílico (PMMA) foram adquiridas no comércio local. O PDMS foi fabricado a partir do kit comercializado pela Dow Corning (Sylgard 184, EUA). Para a fabricação do OSTE utilizou-se uma mistura contendo 43,4% m/m do precursor tiol - Pentaeritritoltetrakis(2-mercaptoacetato) – (Bruno Bock Chemische, Alemanha), 56% m/m do precursor alil Trialil-1,3,5-triazina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona – (Sigma-Aldrich, Brasil) e 10 mL fotoativador - óxido de 2,4,6-trimetilbenzoildifenilfosfina – (TCI – Tokyo Chemical Industry, Japão).

Métodos:
O método baseia-se na construção de um molde primário por gravação em acrílico e na transferência do padrão para o dispositivo utilizando um molde intermediário de PDMS,

Figura 1: Esquema de produção dos dispositivos microfluídicos em OSTE a partir de moldes primários de acrílico e intermediários em PDMS.

Impressão do molde primário - Os canais foram inicialmente impressos em material acrílico (PMMA) em impressora a laser (Gravograph LS 100, Brasil) mantendo a velocidade máxima e variando a intensidade na faixa de 5 a 30 %.

Produção do molde em PDMS - A mistura de PDMS, ainda na forma de um líquido viscoso foi colocada sobre o molde de PMMA. Após a remoção de gás por vácuo, este sistema foi deixado em estufa por 30 minutos a 80°C para que ocorresse o processo de cura. Após atingir a temperatura ambiente o sistema foi desmoldado, obtendo-se o molde de PDMS para etapa subsequente.

Fabricação dos dispositivos: Misturou-se os precursores alil e tiol, além do fotoativador em ambiente de baixa luminosidade. A mistura foi deixada em repouso durante 50 minutos, com o objetivo de remover bolhas de ar e em seguida vertida sob o molde de PDMS e exposta à luz UV (Expositora fotolight UV-MD2-A4, 120 W, Carimbos Medeiros, Brasil) por 20 minutos e finalmente desmoldado.

Caracterização: Foram realizados ensaios de perfilometria (Talysurf 50, Taylor Hobson, Brasil), imagens de microscopia por microscópio óptico (Motic- SMZ-168, China), e ângulos de contato (DSA 100, Krüss, Alemanha) do OSTE preparados em superfícies de silício e PDMS.

Resultados e discussão:

Padrão em PMMA: No intuito de verificar como as condições de impressão afetariam o padrão de PMMA e o dispositivo resultante em OSTE, canais com diferentes configurações foram impressos e avaliados por perfilometria (Tabela 1). A largura e a profundidade dos canais em PMMA apresentam uma relação não linear com a intensidade do laser. A largura do canal em OSTE, por sua vez, apresenta relação linear com a do canal em PMMA enquanto a profundidade não segue uma tendência clara.

Tabela 1: Parâmetros utilizados na impressora e resultados de perfilometria obtidos para largura (*l*) e profundidade (h) dos canais em PMMA e OSTE.

			PMMA		OSTE	
Canal	**Intensidade (%)**	**velocidade (%)**	***l* (μm)**	**h (μm)**	***l* (μm)**	**h (μm)**
A	5	100	64± 4	23± 5	96± 3	36±5
B	10	100	96± 5	44±4	121± 2	54±4
C	20	100	116± 2	63±2	125± 2	59±7
D	30	100	133± 5	75±2	137± 2	75±3

Ângulo de contato: Como forma de demonstrar a baixa afinidade entre o OSTE e o PDMS, o que torna o último um bom material para o molde intermediário, o ângulo de contato com o PDMS foi medido e comparado com Si, PMMA e vidro, materiais tradicionalmente utilizados em moldes de microfabricação, antes e depois do processo de cura (tabela 2). Volumes de aproximadamente 20 μL de OSTE foram utilizados nesta medida. Esses valores permitem identificar uma afinidade significativamente ($\alpha = 0,05$) menor do OSTE com o PDMS do que com os demais materiais.

Tabela 2: Valores de ângulo de contato

Processo de cura	**vidro**	**PMMA**	**Si**	**PDMS**
antes	38 ± 2	27 ± 3	24 ± 4	60 ± 6
depois	37,8±0,2	25±3	26±5	60±7

Conclusões:

A alternativa apresentada neste trabalho se mostrou viável para a fabricação de dispositivos em OSTE. O método, baseado na construção de um molde primário por gravação em acrílico e na transferência do padrão para o dispositivo utilizando um molde intermediário de PDMS levou a um aumento de dimensões entre o molde primário e o dispositivo final. Uma correlação pôde ser estabelecida para a largura, mas não para a profundidade dos canais em OSTE. Assim, com a configuração correta da impressora a laser é possível obter canais de dimensões coerentes com a maior parte das aplicações microfluídicas.

Referências e Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e a FAPESP (2011/02477-3) pelo auxilio financeiro, Gabriela Sonai do laboratório de Nanotecnologia e Energia Solar pela realização dos ensaios de perfilometria.

[1] G. Pardon, et al. **Microfluid Nanofluid** 17:773–779 (2014)
[2] C. F. Carlborg, et al. **Lab Chip**,11, 3136–3147 (2011).
[3] T. M. Sikanen et al. **J. Micromech. Microeng**, 23, 037002 (2013).

Construção em única etapa de canais microfluídicos utilizando impressora 3D.

Lucas C. Duarte, Fabricio R. Sousa, Gerson F. Duarte Junior, Wendell K. T. Coltro.

Laboratório de Microfluídica e Eletroforese, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

lucasd@posgrad.ufg.br

Resumo: *Este trabalho descreve o uso de uma impressora 3D de hardware livre auto-replicável para a construção canais microfluídicos. Para isso, foi adquirido o kit de montagem da impressora 3D de baixo custo. A impressora foi devidamente montada e calibrada para a impressão dos microdispositivos. Os microcanais foram impressos através do método de Modelagem por Fusão e Deposição, utilizando como substrato o filamento termoplástico ABS. A utilização da impressora 3D permitiu a construção de canais microfluídicos com largura de 300 µm, 500 µm, 700 µm, 1000 µm em uma única etapa de fabricação.*

Palavras-Chaves: *Impressão 3D, Microfabricação, Instrumentação Analítica.*

Introdução: A utilização de microdispositivos analíticos tem sido bastante explorada nos últimos anos, pois permitem baixo consumo de amostra, menor tempo de análise e melhor sensibilidade [1]. Entretanto, métodos convencionais de prototipagem desses dispositivos exigem o uso de sala limpa, instrumentação sofisticada e especializada, além de serem constituídas de várias etapas de fabricação tornando a técnica de alto custo e laboriosa. Porém, recentes avanços em técnicas alternativas de prototipagem rápida permitiu o desenvolvimento de impressoras 3D mais acessíveis capazes de construir microestruturas com recursos e tempo de fabricação reduzidos, possibilitando a fabricação em uma única etapa [2,3]. Dessa forma, o presente trabalho apresenta a fabricação rápida e prática de dispositivos microfluídicos utilizando uma impressora 3D *open-source* auto-replicável (*RepRap*).

Procedimento experimental: A montagem da impressora 3D modelo Prusa MovtecH foi realizada acompanhando o manual de montagem em vídeo disponível no site da loja. O kit de montagem adquirido é composto por peças plásticas, carro de alumínio, bico de extrusão, plataforma de impressão, fonte ATX 450W, placa controladora, correias, motores de passos, bem como o kit de ferragens composto por barras lisas e roscadas, parafusos, porcas e arruelas mostrado na Figura 1A. Depois de montada a impressora foi devidamente calibrada e pronta para impressão. Os microdispositivos foram fabricados com o filamento termoplástico ABS (acrilonitrila, butadieno, estireno). A impressão foi realizada pelo método de Modelagem por Fusão e Deposição (Fused Deposition Modelling, FDM).

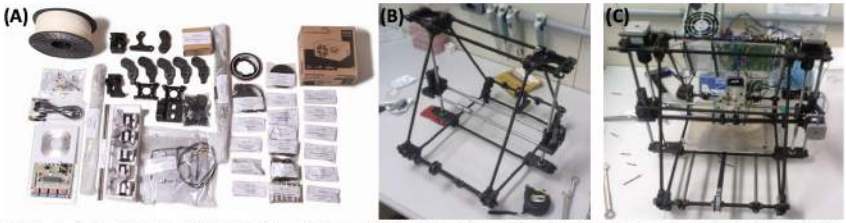


Figura 1. Processo de montagem da impressora 3D Prusa MovtecH. Kit de montagem da impressora (A)*. Montagem do corpo da impressora (B) e impressora concluída (C). *Retirado de *http://movtech.webstorelw.com.br/*

Resultados e discussão: Inicialmente, foi montado o corpo da impressora, Figura 1B, obedecendo os espaçamentos e alinhamentos predefinidos no manual. Em seguida, foram colocados os eixos da impressora. As barras do eixo Z foram posicionadas nas extremidades do corpo, combinados com seus respectivos motores de passos. O eixo X foi montado conectado perpendicularmente ao eixo Z e paralelamente ao eixo Y posicionado na base do corpo. Os motores do eixo Z tem a função de movimentar o extrusor na direção vertical, permitindo a impressão das camadas verticalmente. O carro de alumínio que suporta o extrusor foi montado sobre o eixo X, esta peça tem a função de transportar o extrusor ao longo do eixo durante a impressão. O eixo Y montado na base inferior da impressora suporta a mesa de impressão. A mesa de impressão se movimenta ao longo do eixo Y, e é sobre ela que a peça será impressa. Tanto o movimento do carro, ao longo do eixo X, quanto o movimento da mesa de impressão, ao longo o eixo Y, é realizado através dos sistemas de motores e polias. Este movimento no plano XY permite a impressão das camadas depositadas horizontalmente. Por fim, foi feita a instalação do sistema elétrico, conectando os fios dos motores a placa controladora que é alimentada por uma fonte de 450 W. A comunicação da impressora com o computador é feita via cabo USB conectado à microcontroladora da impressora. Depois de montada, foi realizada a calibração da impressora alinhando todos os eixos, e regulando a altura do bico de extrusão em relação com a mesa de impressão. Para uma impressão de boa qualidade é recomendável que o bico de extrusão esteja cerca de 2,0 mm acima da mesa de impressão.

Para a fabricação dos dispositivos foi feita, primeiramente, a modelagem do desenho tridimensional em software gráfico através do sistema CAD (Computer Aided Design) o qual foi exportado para o formato STL (Stereolithography)[4,5]. Em seguida, o arquivo STL foi aberto em um software de fatiamento, próprio para o modelo da impressora, que prepara o objeto para impressão determinando o posicionamento do objeto, o número e a orientação das camadas a serem impressas. A impressão foi realizada pelo método de Modelagem por Fusão e Deposição (Fused Deposition Modelling, FDM). Neste método filamentos termoplásticos são aquecidos em um cabeçote de extrusão e posteriormente depositados sobre uma plataforma de impressão. Pequenas quantidades do filamento são extrusadas sob a plataforma de impressão formando a primeira camada. A plataforma é mantida em uma temperatura menor do que a do cabeçote de extrusão a fim de que o material termoplástico endureça e seja possível a deposição da camada seguinte. A Figura 2A apresenta os canais impressos com largura de 300 μm, 500 μm, 700 μm, 1000 μm, bem como os canais impressos em cruz com 500 μm de largura, mostrados na Figura 2C.

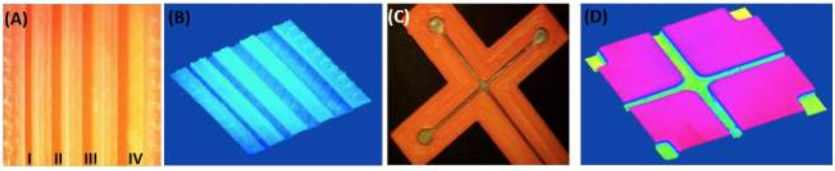


Figura 2. Canais impressos (A) e sua imagem 3D (B) nas larguras de (I) 300 μm, (II) 500 μm, (III) 700 μm, (IV) 1000 μm. (C) e (D) apresentam os canais impressos em cruz de largura de 500 μm e sua imagem 3D respectivamente.

Conclusões: O uso da impressora 3D permitiu a prototipagem de microchips de forma rápida e simples, evitando etapas dispendiosas como o uso de mascaras ou moldes, por exemplo, e com custo acessível. Os microcanais fabricados podem ser utilizados em técnicas analíticas como eletroforese e espectrometria de massas. Como próximas etapas, será estudada a viabilidade do uso dos microdispositivos para tais técnicas.

Referências e agradecimentos:

Referências: [1] do Lago, C. L. et al., Anal. Chem. **75**, 3853 (2003)
[2] Comina,G., Suska, A., e Filippini, D., Lab Chip, **14**, 424 (2014).
[3] Shallan, A. I. et al., Anal. Chem., **86**, 3124 (2014).
[4] Gross, B. C. et al., Anal. Chem., **86**, 3240 (2014).
[5] O'Neill, P. F. et al., Biomicrofluidics, **8**, 1932 (2014).

Agradecimentos: CAPES, CNPq, FAPEG, INCTBio e UFG.

3D focalization LTCC microfluidic device for nanoparticle synthesis by nanoprecipitation

Houari Cobas Gomez, Bianca Oliveira Agio, Luciana Wasnievski da Silva de Luca Ramos, Antonio Carlos Seabra, Mário Ricardo Góngora Rubio

hcobas_gomez@yahoo.com.br; boagio@ipt.br; swluciana@ipt.br; acseabra@lsi.usp.br; gongoram@ipt.br

Abstract: *Nanoprecipitation is a nanonization technique used for nanoparticle generation. Several fields, like pharmacology and fine chemistry, make use of such technique. Typically a bulky batch mechanical processes is used, rendering high polydispersity index of generated nanoparticles, poorly particle size reproducibility and energy wasting. LTCC-based microsystem technologies allow the implementation of different unitary operations for chemical process, making it an enabling technology for the miniaturization of chemical processes. In fact, recently LTCC microfluidic reactors have been used to produce micro and nanoparticles with excellent control of size distribution and morphology. The present work provides a report on the performance of a 3D LTCC flow focusing Microfluidic device designed to fabricate polymeric nanocapsules for Hydrocortisone drug, using nanoprecipitation route. Monodisperse Hydrocortisone nanocapsules were obtained with sizes (Tp) from 188.9 nm to 459.1 nm with polydispersity index (PDI) from 0.102 to 0.235.*

Keywords: *Nanoprecipitation; Fluid Flow Focusing; LTCC; Nanoparticle*

Introduction: Nanoprecipitation is a nanonization technique used for nanoparticle generation in fields like drug formulation and chemistry, among others [1]. In this strategy, the organic solution made up by a dissolved material is placed in contact with an antisolvent flow. Due to high material concentration regions formation, spontaneous nucleation takes place, generating nanoparticles.

Several works have reported the use of microfluidics devices in nanoprecipitation. They mainly make use of topologies with Y-junction shape [2] or T-junction shape [3,4, 5] with central channel. T-junction has two solvent-antisolvent fluid interfaces because of the antisolvent streams focalization effect, which improve the total diffusion process and hence the nanoprecipitation process. Diffusion process can also be improved having the solvent stream surrounded by the antisolvent stream. This technique is named as 3D flow focalization [3, 6].

This work shows a 3D microfluidic flow focalization device manufactured with LTCC technology intended to be used in a nanoprecipitation process. This is a research in progress, at this time is presented initial results of a nanoprecipitation device used for Hydrocortisone drug polymeric nanoencapsulation.

Device Layout: Fig. 1 shows the device, which consist in an organic phase input, dissolved material_DM, (D_H= 214.6 µm), the anti solvent (AS) inputs and the nanoprecipitation channel (NPC) (D_H= 772 µm and length 6.5 mm). The DM and NPC channels are centered. The four AS inputs have an input angle of 45º to the NPC direction. In the vertical direction this angle is assured with stairs like channels (fabrication constraint).

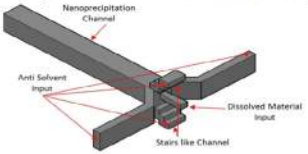


Fig. 1 – 3D focalization microfluidic device.

Experimental Procedure: A factorial experimental planning approach (without central point) was used to validate the device performance. Two process variables (Flow rate ratio and total flow rate) were analyzed. COMSOL® software was used in order to estimate the average concentration evolution, diffusion profile in perpendicular planes to the NPC length and focalization effect.

Results: Simulation results, Fig. 2 and Fig.3, show the focalized organic phase stream and the concentration evolution in the NPC. As expected, Antisolvent flow force action on the organic phase, due to the inlet topology, assured a focalized stream. As R_Q value increases, the stream diameter decreases. This effect can be helpful in the solvent diffusion and could help in the super saturation regions formation and hence the nanoparticles generation. The average concentration evolution in the NPC length show that from 3 mm and up, the variations are lower than 5%. We estimate the diffusion length in this device, to be 3 mm. Fig. 3 also shows that when flow rate ratio (Rq) increases, average concentration at the NPC outlet decreases due to solvent diffusion. As expected, an increase in the total flow rate (Q_T) value will not affect the average concentration for the same Rq value.

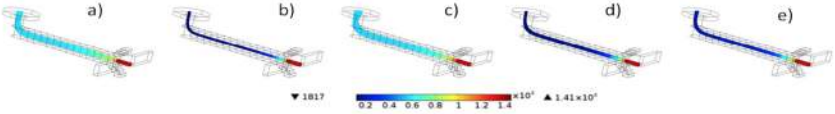


Fig. 2 – 3D focalization inside the device. Color bar is Organic phase (DM) concentration in mol/m³. a) R_Q = 1.3 and Q_T = 1 ml/min; b) R_Q = 10 and Q_T = 1 ml/min; c) R_Q = 1.3 and Q_T = 7.5 ml/min; d) R_Q = 10 and Q_T = 7.5 ml/min; e) R_Q = 6.26 and Q_T = 4.64 ml/min.

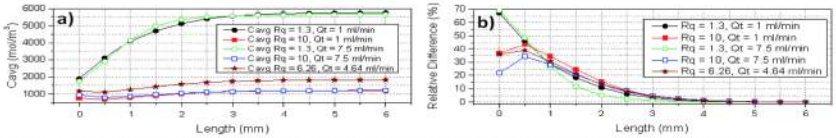


Fig. 3 – Average concentration evolution from the NPC inlet start point a) Average concentration versus channel length; b) Relative difference to the average concentration at 6 mm from the NPC inlet start point.

Proposed factorial experimental planning results showed Hydrocortisone nanocapsules with sizes ranging from 459.1 nm to 188.9 nm. The polydispersity index remains lower than 0.235 which implies a narrow particle size distribution. The data was analyzed with Statistica12 software to obtain a better representation of process variables influence on particle size (T_P) and polydispersity index (PDI). Both process variables showed an inversely proportional relation with Tp and PDI. Particle size showed a stronger dependence with Rq. In turn, polydispersity index showed a stronger dependence with the Q_T.

Conclusions: A 3D flow focalization microfluidic device manufactured with LTCC technology for nanocapsule fabrication was presented. Full 3D flow focalization was assured selecting inlet channels topology with suitable 45° inclination in the vertical and horizontal directions. Monodisperse Hydrocortisone nanopcasules were obtained with sizes from 188.9 nm to 459.1 nm and polydispersity index from 0.102 to 0.235.

References and Acknowledgments:

References:
1. S. Stainmesse, A. M. Orecchioni, E. Nakache, F. Puisieux and H. Fessi, Colloid Polym Sci **273** (5), 505-511 (1995).
2. H. S. M. Ali, P. York and N. Blagden, International Journal of Pharmaceutics **375** (1-2), 107-113 (2009).
3. M. Rhee, P. M. Valencia, M. I. Rodriguez, R. Langer, O. C. Farokhzad and R. Karnik, Advanced Materials **23** (12), H79-H83 (2011).
4. J. N. Schianti, N. N. P. Cerize, A. M. de Oliveira, S. Derenzo, A. C. Seabra and M. R. Góngora-Rubio, J. Nanomedicine Nanotechnology **4** (4) (2013).
5. H. Cobas Gomez, A. C. Seabra, V. Araujo Feitosa, J. de Novais Schianti, A. Marim de Oliveira, L. Wasnievski da Silva de Luca Ramos and M. R. Gongora-Rubio, presented at the Sensors (IBERSENSOR), 2014 IEEE 9th Ibero-American Congress on, 2014 (unpublished).
6. J. N. Schianti, N. P. N. Cerize, A. M. Oliveira, S. Derenzo and M. R. Góngora-Rubio, J. Phys. Conf. Ser. **421** (1) (2013).

Acknowledgments: We acknowledge FINEP contract N°01.11.0108.00 for financial support. Houari Cobas Gomez wishes to acknowledge "Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior", CAPES for financial support.

Contact: hcobas_gomez@yahoo.com.br

Classificação de amostras de mel segundo sua origem floral utilizando língua eletrônica.

Leandro W. Hantao, Gabriela F. Giordano, Angelo L. Gobbi, Renato S. Lima.

RESUMO

*Este trabalho consistiu em duas etapas, quais sejam: obtenção de **fingerprints** voltamétricos de méis brasileiros empregando línguas eletrônicas e a análise de componentes principais para detectar padrões nas medidas instrumentais. As informações obtidas possibilitaram a classificação de amostras de mel quanto à sua origem floral utilizando-se língua eletrônica baseada em voltametria cíclica e análise multivariada.*

Palavras-chave: *quimiometria, análise multivariada, **screening analysis**, eletroanalítica, voltametria.*

INTRODUÇÃO

O mel é uma espécie de produto natural elaborado por abelhas a partir do néctar de flores e/ou exsudatos sacarínicos de plantas. Trata-se de uma matriz complexa constituída por frutose, glicose, proteínas, sais minerais e compostos orgânicos, responsáveis pela qualidade do produto e seu aroma. O conhecimento da flora apícola do país é ainda precário o que representa um aspecto crítico a considerar que a certificação do mel brasileiro agrega maior valor econômico no mercado internacional. Os protocolos usados para a classificação do mel no Brasil segundo a sua origem floral são lentos e laboriosos, incluindo análises sensoriais e melissopalinologia. Neste trabalho, nós descrevemos o uso de língua eletrônica para esse propósito. Em combinação com o uso da análise de componentes principais (PCA) para reconhecimento de padrão, línguas eletrônicas (*electronic tongues*) baseadas em voltametria cíclica geraram análises multivariadas com informações qualitativas sobre as amostras de mel.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As medidas de voltametria foram realizadas com potenciostato AUTOLAB PGSTAT302N da Metrohm. Foi usada uma célula eletroquímica contendo ouro (d = 3,0 mm), fio de platina e Ag/AgCl como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente. As amostras de mel foram diluídas na concentração de 100,0 g L^{-1} em tampão fosfato 100,0 mmol L^{-1}, pH 7,0. Até o momento, duas amostras de mel foram analisadas (n = 5). Elas se diferenciaram entre si em termos da sua origem floral: café e marmeleiro.

As línguas eletrônicas se baseiam (i) em medidas eletroquímicas capacitivas ou faradaicas, nesse caso incluindo a potenciometria e a voltametria, e (ii) na análise multivariada dos dados (capacitância e frequência para os sistemas capacitivos e corrente e potencial para os sistemas faradaicos) através da utilização de ferramentas quimiométricas para análises exploratórias. Os sistemas voltamétricos são aqueles que fornecem um número maior de informações sobre a amostra mediante a análise "espectral" dos voltamogramas cíclicos, o que justifica o uso dessas plataformas neste trabalho.[1] As análises se deram a partir dos dados de corrente e potencial de pico os quais se relacionam à concentração e à natureza dos compostos, respectivamente. Adicionalmente, há muitos fatores intervenientes sobre o sinal analítico em voltametria como a formação da dupla camada elétrica, o coeficiente de difusão das espécies eletroativas, os fenômenos de adsorção na superfície dos eletrodos e o material do eletrodo de trabalho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conjunto de medidas instrumentais gerou uma matriz de dados (**X**) de dimensões 15×1208. Por causa da elevada densidade de dados dos voltamogramas, optou-se pelo uso da análise multivariada de dados, em especial a PCA. Abordagens convencionais e univariadas são inviáveis por causa do tamanho e complexidade dos dados – o seu uso poderia acarretar no baixo aproveitamento da informação presente nas medidas visando à classificação de méis. No processamento dos dados, não foram utilizados métodos de pré-processamento e a escolha do número de componentes principais foi feita considerando-se a variância acumulada. Com apenas duas componentes principais (PC) foi possível acumular 99,92% de toda informação originalmente presente nos voltamogramas. Com isso, a detecção de tendências no conjunto de dados pôde ser feita através de uma simples análise visual do gráfico de *scores*, mostrado na **Figura 1**. Nesse gráfico, podemos observar que as amostras oriundas de flores de café agrupam-se na região superior do gráfico, com valores de *score* próximos a 0,2. Já as amostras de flores de marmeleiro exibiram valores próximos a 0,05. A inspeção do gráfico de pesos, por sua vez, revelou quais regiões do voltamograma foram responsáveis pelo agrupamento observado.

CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido foi aplicado com sucesso na classificação das amostras de mel segundo sua a origem floral usando língua eletrônica voltamétrica e PCA. A plataforma exibe características como rapidez, baixo custo e operação simples as quais são essenciais para experimentos rotineiros. Os métodos eletroanalíticos possuem comumente níveis de precisão, robustez e sensibilidade satisfatórios, atributos altamente desejáveis para o desenvolvimento de protocolos de certificação de méis.

Demais amostras estão sendo analisadas. Além do uso de células eletroquímicas convencionais, uma plataforma analítica desenvolvida recentemente em nosso laboratório será aplicada. Ela baseia-se em um potenciostato portátil *homemade* para medidas por amperometria ou voltametria e em um *smartphone* para aquisição de dados via *bluetooth*. Dispositivos em papel com eletrodos de ouro integrados serão empregados nesse caso em função do seu baixo custo.

REFERÊNCIA

1. Paixão, T. R. L. C.; Bertotti, M. *Sens. Actuators B* **2009**, *137*, 266.

E-mail: **leandro.hantao@lnnano.cnpem.br**

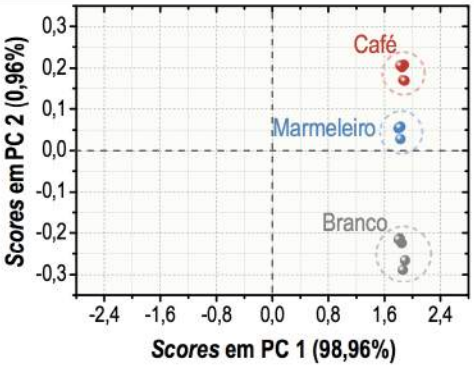


Figura 1. Gráfico de *scores* para classificação das amostras de mel. O branco se refere a medidas ao eletrólito.

Fabricação de dispositivos analíticos em plataformas de papel usando cola escolar para aplicação em bioensaios

Thiago M. G. Cardoso, Fabrício R. de Souza, Paulo de T. Garcia, Wendell K. T. Coltro

Laboratório de Microfluídica e Eletroforese, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil
tmgcgyn@gmail.com; frsouza_88@yahoo.com.br; ptarsogarcia@gmail.com; wendell@ufg.br

Resumo: *O presente trabalho apresenta um novo método de fabricação de microdispositivos analíticos em papel (μPADs) através do jateamento de uma solução de cola branca sobre o substrato de papel. Após a etapa de jateamento, o dispositivo é exposto à radiação UV/Vis usando um refletor com uma lâmpada halógena para secagem e cura do polímero. Os insumos e equipamentos necessários para a fabricação destes dispositivos são de baixo custo e facilmente adquiridos. Este método se mostrou vantajoso frente aos reportados na literatura pela simplicidade instrumental, possibilidade de produção em batelada, não toxicidade dos insumos utilizados e pela maleabilidade do dispositivo. O dispositivo utilizado nesse trabalho possui 8 zonas, objetivando fazer a análise simultânea de glicose, ácido úrico, nitrito, albumina, pH, bilirrubina, corpos cetônicos, ureia, amilase e lipase.*

Palavras-Chaves: *microfluídica; μPADs; uronálise; detecção colorimétrica.*

Introdução: Nos últimos anos, o uso de papel como substrato na fabricação de dispositivos analíticos miniaturizados tem ganhado destaque pelas vantagens apresentadas como: disponibilidade global, maleabilidade, baixo custo e biodegradabilidade.[1] Os microdispositivos analíticos em papel (μPADs) apresentam características essenciais para serem aplicados em análises nos pontos de necessidade (point-of-care), tais como: a possibilidade do uso do fluxo lateral e vertical para o transporte de amostra, dispensando o uso de bombas hidrodinâmicas ou fontes de alta tensão; portabilidade dos dispositivos; possibilidade de acoplamento com sistemas de detecção como colorimétrico, eletroquímico e espectrometria de massas. Em 2007, o grupo do professor George Whitesides, da Universidade de Harvard desenvolveu o primeiro método de fabricação de μPADs, através da técnica de fotolitografia,[2] porém a técnica proposta possuía algumas dificuldades para ser implementada em locais com recursos limitados, devido ao alto-custo da infra-estrutura necessária e dos insumos para a construção das barreiras hidrofóbicas. Desde então, diversos grupos de pesquisa começaram a desenvolver novos métodos de fabricação simples, e utilizando insumos com preços mais acessíveis. As técnicas alternativas relatadas que possibilitam uma produção em batelada foram: carimbagem[3], flexografia[4] e jateamento[5]. A proposta do uso de um jateamento para a construção de barreiras hidrofóbicas foi proposto por Nurak e colaboradores em 2013. Os autores propuseram o uso de um *spray* com solução de verniz acrílico para a construção de μPADs acoplados com detecção eletroquímica.[5] Neste trabalho iremos apresentar um método de fabricação μPADs baseado no jateamento de cola branca sobre a superfície do papel. A potencialidade deste dispositivo será demonstrada para a aplicação em ensaios clínicos para o teste de uronálise e pancreatites, sendo os analitos de interesse: glicose, ácido úrico, albumina, nitrito, bilirrubina, corpos cetônicos, ureia, pH, amilase e lipase utilizando detecção colorimétrica.

Procedimento experimental: O *layout* do dispositivo foi desenhado em um *software* gráfico, constituído de oito zonas de detecção circulares (com diâmetro de 5 mm), interligadas a uma zona central (com diâmetro de 10mm) por canais microfluídicos (com 3 mm de largura e 10 mm de comprimento). Com o auxílio de uma impressora de corte a *laser* de CO_2 foi cortado uma manta magnética com espessura de 0,8 mm com o *layout* do dispositivo para ter a função de máscara no processo de fabricação. A solução de cola branca é composta por um mistura de cola escolar líquida com água. Esta solução de cola foi colocada em uma pistola de pintura de um compressor de ar-direto. Em seguida montou-se um suporte para o jateamento da solução de cola branca sobre o papel, constituída de uma placa polimérica com um imã de neodímio na sua parte inferior; sobre a placa colocou-se uma folha de papel e sobre o papel colocou a máscara fabricada com a manta magnética. Com o suporte para o jateamento pronto, utilizou o compressor de ar para jatear a solução de cola sobre o papel de filtro. Em seguida a folha de papel de filtro foi exposta a radiação UV/Vis fornecida por um refletor com lâmpada halógena de 500 W por 5 minutos de cada lado. Os ensaios com analitos de interesse clínico foram realizados de acordo com trabalhos relatados na literatura.[3,6]

Resultados e discussão: O método de fabricação proposto apresenta vantagem quando comparado com o método proposto por Nurak e colaboradores, pois não utiliza solventes tóxicos para solubilizar o polímero utilizado para a construção das barreiras hidrofóbicas. Além disso, o acetato de poli (vinila) é mais maleável que o acrílico, evitando a quebra das barreiras hidrofóbicas. A radiação gerada pela lâmpada halógena permitiu a secagem e a cura completa do polímero. O gasto com à aquisição dos instrumentos necessários foi de aproximadamente R$ 500,00, sendo necessário somente um compressor com uma pistola de pintura, o imã e as máscaras fabricadas em mantas magnéticas. O custo final de cada dispositivo foi aproximadamente R$ 0,07. O layout dos dispositivos pode ser facilmente alterado, que torna a técnica desenvolvida robusta quando comparada a outras técnicas, como por exemplo, nos métodos de carimbagem. O dispositivo fabricado possibilitou a análise simultânea de até oito analitos de relevância clínica em amostras de sangue e urina. Os custos dos bioensaios conduzidos utilizando este dispositivo de papel é inferior a R$ 0,10, levando em consideração a plataforma e os reagentes para os ensaios de uronálise e pancreatites. A Figura 1 apresenta dois *layouts* diferentes de dispositivos fabricados pela técnica de jateamento de cola escolar sendo um layout para o ensaio em amostras de urina e o outro para ensaio de pancreatites.

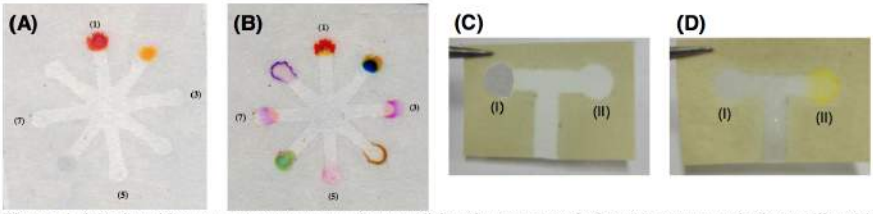


Figura 1. (A) Dispositivo com os reagentes cromógenos adicionados nas zonas de detecção para o ensaio de uronálise: (1) pH, (2) albumina, (3) nitrito, (4) glicose, (5) ácido úrico, (6) ureia, (7) bilirrubina, (8) corpos cetônicos. (B) Dispositivo após 20 minutos da adição de 50 µL de amostra por fluxo lateral na zona central. (C) Dispositivo com reagentes cromógenos adicionados nas zonas de detecção de pancreatites, (I) amilase e (II) lipase. (D) Dispositivo após 15 minutos da adição de 25 µL de amostra por fluxo vertical.

Alterações nestes analitos na urina podem indicar algumas disfunções como: a glicose pode estar associada a *diabetes mellitus*; o ácido úrico, albumina e ureia pode indicar um mau funcionamento do sistema renal; a presença de nitrito é causada por infecção no trato urinário, a presença de corpos cetônicos indica que o corpo está utilizando ácidos graxos como fonte de energia ao invés de carboidratos; a presença de bilirrubina pode indicar problemas hepáticos ou algumas disfunções que provoca a destruição das hemácias de forma anormal e alterações de pH podem estar ligado a vários problemas como infecção e problemas renais. No sangue as concentrações de amilase e lipase acima do normal indicam uma lesão pancreática, sendo este diagnostico essencial para investigação de um possível câncer de pâncreas.

Conclusões: O método proposto para a fabricação de µPADs mostrou-se atrativo para ser utilizado em laboratório com recursos limitados, pois necessita de uma infra-estrutura barata (< R$ 500,00) e utiliza insumos de baixo custo. A técnica de jateamento de cola branca pode facilmente ser adaptada para uma planta industrial para a produção em massa. As matérias-primas necessárias para a fabricação destes dispositivos são atóxicas trazendo benefícios para os fabricantes e os consumidores. Estes µPADs demostraram uma grande potencialidade para serem aplicados em ensaios de uranálise (glicose, ácido úrico, bilirrubina, nitrito, corpos cetônicos, ureia, pH e albumina) com custo extremamente reduzido.

Referências

[1] Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Carrilho, E.; Thomas, S. W.; Sindi, H.; Whitesides, G. M. *Anal Chem* **2008**, *80*, 3699-3707.
[2] Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Butte, M. J.; Whitesides, G. M. *Angew Chem Int Edit* **2007**, *46*, 1318-1320.
[3] Garcia, P. T.; Cardoso, T. M. G.; Garcia, C. D.; Carrilho, E.; Coltro, W. K. T. *Rsc Adv* **2014**, *4*, 37637-37644.
[4] Olkkonen, J.; Lehtinen, K.; Erho, T. *Anal Chem* **2010**, *82*, 10246-10250.
[5] Nurak, T.; Praphairaksit, N.; Chailapakul, O. *Talanta* **2013**, *114*, 291-296.
[6] Klasner, S.; Price, A.; Hoeman, K.; Wilson, R.; Bell, K.; Culbertson, C. *Anal Bioanal Chem* **2010**, *397*, 1821-1829.

Agradecimentos:
FAPEG, CNPq, CAPES, FINEP e IQ-UFG.

Interaction of lipid membanes and microfluidics devices

Marcos Masukawa, Dra. Margarita Staykova

marcos.masukawa@usp.br; margarita.staykova@durham.ac.uk;

Abstract: *In this study, we used the microfluidic device proposed by Staykova et. al (2011) to apply strain to a supported lipid membrane. Differently from previous studies using this device [1][2], we investigated the effects of the support on the lipid membrane morphology under strain. We have done that either by changing the degree of oxidation of a PDMS support or by applying a Dextran 150K coating. We found out that different degrees of oxidations and the Dextran coating produce adverse effects on the membrane morphology under strain. Under specific conditions, we were able to observe the membrane migration to PDMS cracks, the formation of pores, attached vesicles adsorption, the growth of tubes and what seems to be a bilayer to monolayer conversion. In this brief report, we intended to show that the membrane response to strain may be tuned by the properties of the surface where it is supported.*

Key words: *Supported bilayer, PDMS, microfluidic device, giant vesicles, Dextran 150K.*

Introduction: The cell membrane is a complex structure composed of a lipid bilayer wrapped by the extracellular matrix and the cellular cortex. A large number of physiological processes such as mitosis, endo and exocytosis, budding, cell migration, invagination and osmotic homeostasis subject the membrane to changes of its surface area, which is tightly regulated by the cell. In this project, we used the device proposed by Staykova (2011) [1] to model a cell membrane under strain interacting with the extracellular matrix. Our cell membrane-matrix model was constituted of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) bilayer patches supported on the synthetic polymer polydimethylsiloxane (PDMS), which eventually was coated with fluorescently labelled Dextran 150K. Dextrans are polysaccharides often found in lactic acid bacterial colonies and medical products acting as lubricants. Using epifluorescence microscopy, we observed that the stretch of bilayer patches supported on PDMS induced different behaviour on the membrane depending on the degree of oxidation of the PDMS. When the membrane support was mildly oxidized, the stretching induced vesicle fusion while the compression induced the nucleation of vesicles and formation of tubes. When the PDMS was coated with Dextran, we observed that the patches often grew pores and that no tubes were formed when the bilayer was compressed. Instead, the membrane would slide on the dextran film, closing the pores. Using image analysis over a large number of samples, we were able to verify that the lipid membrane is tightly bound to the PDMS while on Dextran it tends to slide over the support during compression.

Experimental procedure: We have used the device described in [1] to apply strain to DOPC membranes dyed with the Rh-DPPE fluorescent probe. The device was basically constituted of a thin sheet of PDMS, which, subject to the pressure of a microchannel connected to a syringe pump, could inflate of deinflate. DOPC membrane patches were deposited on the surface of the PDMS sheets and the area variations induced positive or negative strain on the bilayer. Before the deposition of the bilayer, the PDMS sheets were subject to plasma oxidation to make its surface hydrophilic and receptive to the bilayer patches. We have tested different degrees of oxidations changing the pressure and time exposition to air plasma (a few selected experiments are shown here). For some experiments, we have coated the PDMS with Dextran according to [3]. The membrane patches were produced firstly by making giant unilamellar vesicles by the eletroformation method [4] and then fusing them ofnthe PDMS sheets, where they formed bidimensional bilayer patches upon rupture.

Results and discussion: We have observed that specific parameters of oxidation and the coating with Dextran 150K induce different morphologies of DOPC mebranes under strain. One interesting phenomenon observed was what it seems to be a bilayer to monolayer conversion. For specific oxidation parameters, we see that when the membrane is strecthed, it starts to spread in a aureola whose fluorescence is precisely half of the intensity of the center of the patch, strongly indicating the formation of a monolayer. When the patch is compressed, we do not recover the original patch but the nucleation of small islands whose fluorescence density is between twice and thrice of the sourrounding fluorescence. When we coat the PDMS with Dextran 150K, we observe the patches are prone to grow pores when stretched. When compressed, the pores close and we recover the original

patch. Under specific oxidation parameters, the patches would absorb the attached vesicles when compressed and form protusions as a mechanism of strain relief. This results is similar to what is observed in [1] for confined bilayers. Measuring the patch coverage variation (defined as the rate of change of the region imaged covered by patches deducting the strain rate) with image analysis, we note that the patches of PDMS gain some area when stretched (Fig. 1a, attributed to vesicle adsorption) but do not slide over the support when compressed (Fig. 1b). We presume the PDMS is tightly bound to the support. The coverage of patches on Dextran vary greatly but considering a larger number of samples, there is no increase in coverage (Fig. 1c). When the patches on Dextran are compressed (Fig. 1d), we observe a trend in the increase of coverage. This is associated with the closure of pores.

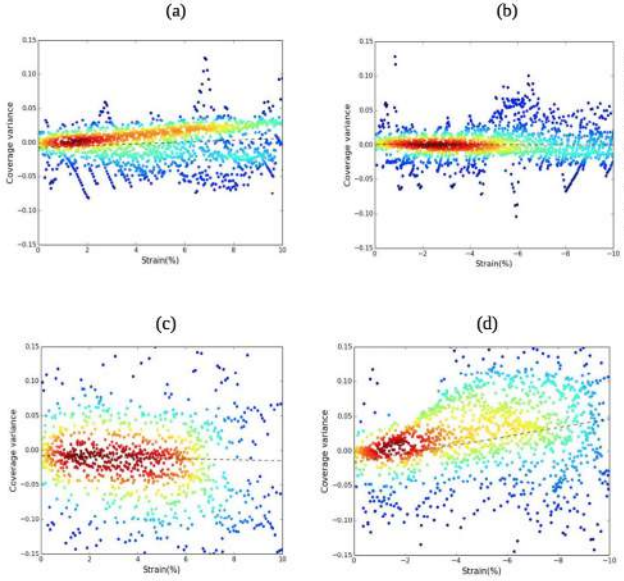


Fig. 1 – Coverage variance of patches on PDMS oxidized for 1.3mbar 2s during stretching (a) and compression (b) and on Dextran 150K during stretching (c) and compression (d) for 10 samples each.

Conclusions: We intend to show that the lipid membrane response to stress is tuned by its interaction with the support. This has direct implication to the culture of cells in microfluidics devices and to a better understanding of mechano-transduction processes. Mechano-transduction processes are those in which a physical signal to the cellular membrane (such as strain) is somewhow converted to a chemical sign to the cell. We have observed that changes to the support induced changes in the bilayer membranes under strain. Some of the phenomena observed here may also find application to novel technology, such as the bilayer to monolayer conversion and the growth of lipid tubes from patches, which have potential as biological sensors. At the Staykova laboratory, we are currently investigating the mechanical response of lipid mixtures other than pure DOPC and the effects of other coatings besides Dextran.

References and acknowledgements

1. Staykova, Margarita, et al. "Mechanics of surface area regulation in cells examined with confined lipid membranes." Proceedings of the National Academy of Sciences 108.22 (2011): 9084-9088. **2.** Staykova, Margarita, et al. "Confined bilayers passively regulate shape and stress." Physical review letters 110.2 (2013): 028101. **3.** Subramaniam, Anand Bala, et al. "Glycans pattern the phase behaviour of lipid membranes." Nature materials 12.2 (2013): 128-133. **4.** Angelova, M. I., et al. "Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications." Trends in Colloid and Interface Science VI. Steinkopff, 1992. 127-131.

We thank FAPESP for the Overseas research scholarship granted (no. 14/14682-9) and Durham University for the use of space, equipments and consumables.

Dispositivos Microfluídicos com aplicações Hidrodinâmicas e Micromisturadores

Salomão Moraes da S. Jr[1], Maria H. O. Piazzeta[2] , Márcia R. F.[3], Stanislav A. Moshkalev[3] , Jacobus W. Swart.[1]

[1]**FEEC – UNICAMP**; Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação, Universidade Estadual de Campinas.[2] **LMF – CNPEM**; Laboratório de Microfabricação, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais.[3]**CCS – UNICAMP**; Centro de Componentes Semicondutores, Universidade Estadual de Campinas.

Resumo

Neste trabalho está descrito a fabricação de dispositivos microfluídicos em vidro, silício e polidimetilsiloxano (PDMS) com aplicações hidrodinâmicas e micromisturadores.

Palavras-Chaves: *Microfluídica, Microfabricação, Micromisturadores e Hidrodinâmica.*

1.Introdução

Microfluídica pode ser definida como o estudo de fluxos que são mono ou multifásicas, que circulam em microssistemas artificiais, isto é, sistemas simples ou complexos, que são fabricados utilizando tecnologias de microfabricação que envolvem várias técnicas, incluindo fotolitografia, corrosão, deposição, corrosão e micro impressão, que permitem a fabricação de sistemas miniaturizados.[1] A utilização destes dispositivos tem algumas vantagens como utilização de pequenos volumes, maior transferência de massa e calor, que fazem com que estes dispositivos sejam atrativos para aplicações químicas e biológicas entre outras, pois é possível gerar gradientes de concentração estáveis e controlados. Este trabalho visa explorar as possibilidades de aplicações de dispositivos microfluídicos fabricados em vidro, silício e polidimetilsiloxano (PDMS), como processos de interdifusividade controlada, fluxos citométricos e fazer a comparação com os modelos simulados utilizando geometrias comumente aplicadas como micromisturadores.

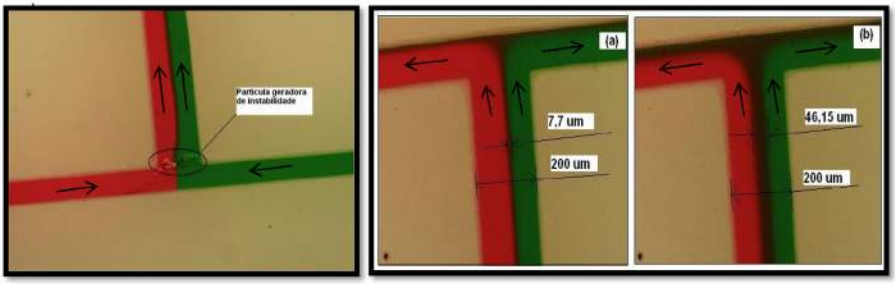
2. Procedimento Experimental

Baseado em geometrias de micromisturadores tipicamente encontrados na literatura e com algumas adaptações, foram feitos cálculos para obter definição de perfil, razão de aspecto e formato das geometrias dos microcanais, e após isso a confecção das máscaras definiu-se as etapas de processos para os substratos. Foram feitas as limpezas das lâminas de vidro para microscopia (*Perfecta código 201),* após a limpeza fora feita a secagem e fotogravação com o fotoresiste *AZ4620*, o filme fotossensível foi submetido a um longo tratamento térmico (*hard bake)* para poder ser utilizado como máscara para corrosão em solução de ácido fluorídrico (HF) e, em seguida, imersão em ácido clorídrico (HCl) para remoção de material nos microcanais. Etapas de obtenção de microcanais em silício, lâminas de silício tipo N (100), corroídas em KOH (Hidróxido de Potássio) na temperatura de 80°C Após a corrosão fora feita a caracterização do canal para observar perfil, rugosidade, largura e profundidade utilizando medidas de perfilometria, com o Perfilômetro *Veeco Dektak 150*. Para selagem do canal optou-se por utilizar o polímero PDMS, em que fora feita ativação por plasma de O_2 para selagem irreversível. Para testes foram utilizados bomba de seringa

modelo NE-4000 da *New Era Pump Systems inc*., microscópio *Citoval* com câmera digital acoplada externamente.

3. Resultados e Discussão

Foram utilizados soluções aquosas, corantes alimentícios e óleos, considerando que os fluidos são incompressíveis, viscosos e newtonianos para o experimento com os dispositivos, e a modelagem do sistema ocorreu na região de laminaridade com número de Reynolds em torno de 10. Utilizando a bomba de seringa com vazões variáveis para cada injeção e alteração dos fluidos foi possível observar uma difusividade controlada, que pode ser modificada de acordo com a geometria e os fluidos em questão. A figura 1 mostra o comparativo dos resultados experimentais.



(A) (a) (b)

Figura1 – Difusividade controlada experimentos práticos (experimentos práticos na parte superior e simulação na parte inferior). (A) Mostra os fluidos sem mistura com um aumento da região de interdifusão. (a) Mostra os fluídos com grau de difusividade baixa. (b) Mostra os fluídos com grau de difusividade intermediária com acréscimo de 23% da região de interdifusidade.

4. Conclusões

Pode-se concluir a possibilidade de aplicações em processos químicos de micromisturadores, com aumento da difusividade mássica e em alguns casos, tendo a difusividade controlada, possibilidades de aplicações na biologia com fluxos citométricos, modelamento de dos sistemas microfluídicos com ferramentas computacionais, *COMSOL*® tendo como ponto de partida começar a fabricar os dispositivos reduzindo assim a necessidade de práticas empíricas na engenharia de processos de micromisturadores.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas-FAPEAM, pelo fomento com bolsa de estudos, ao LMF-CNPEM, ao CCS-UNICAMP, ao LAMULT-IFGW-UNICAMP, pelo apoio de seus grupos de trabalho, equipamentos e colaboração.

Referências

[1] P. Tabeling, **Introductions to Microfluidics**.English Translation® Oxford University Press Inc., New York(2005).

Contato do autor: salomaomoraes@yahoo.com.br

Avaliação de diferentes indicadores colorimétricos para reações enzimáticas em dispositivos analíticos fabricados em papel

Ellen Flávia Moreira gabriel[1], Paulo de Tarso Garcia[1], Wendell K. T. Coltro[1,2]
[1]*Laboratório de Microfluídica e Eletroforese*
[2]*Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica (INCTBio)*

ellenflavia.moreira@gmail.com; ptarsogarcia@gmail.com; wendell@ufg.br

Resumo:
O sistema de detecção colorímetrico representa um dos métodos de detecção mais explorados quando associado aos dispositivos microfluídicos de papel (μPADs). A ampla aplicabilidade desta metodologia está relacionada com a facilidade de aquisição da resposta analítica bem como a utilização de equipamentos portáteis para a detecção, como scanner e câmeras de celulares. Normalmente a resposta colorimétrica ocorre através da associação do analito alvo com um agente cromógeno, em que a reação envolvida pode ser compleximéctrica ou enzimática. Este trabalho visou o estudo do efeito de diferentes indicadores colorimétricos na resposta analítica obtida no monitoramento de glicose e ácido úrico. A melhor sensibilidade e os menores valores de limite de detecção (LD) foram encontradas quando a mistura ácido 3,5-dicloro-2-hidróxibenzenosulfônico e 4-aminoantipira (4-AAP/DHBS) foi utilizada como indicador nos bioensaios de glicose e ácido úrico (faixa de concentração entre 0,0 e 1,0 mmol/L). Para concentração maior que 1,0 mmol/L, as melhores respostas analíticas foram obtidas quando o 3,3`,5,5`-tetrametilbenzidina (TMB) e a o-dianisidina (OD) foram empregados no monitoramento de glicose e ácido úrico, respectivamente.

Palavras-Chaves: *dispositivos de papel, detecção colorimétrica, agente cromógeno*

Introdução:

As reações colorimétricas respresentam uma das metodolodias mais exploradas como sistema de moniramento de um analito alvo. A ampla aplicabilidade do metódo resume-se na facilidade e simplicidade do sistema bem como na rápida resposta analítica que pode ser obtida. A mudança de cor, na presença do analito de interesse, fornece desde uma resposta qualitativa, como a presença ou a ausência até uma resposta quantitativa, desde que a intensidade de cor desenvolvida possa ser diretamente correlacionada com a concentração da espécie. Desde 2007, as reações que envolvem mudança de cor vêm sendo amplamente utilizadas associadas aos dispositivos microfluídicos de papel (μPADs) [1]. A associação destes sistemas com as reações colorímetricas tem causado uma enorme revolução no campo da ciência. O principal impacto dessas pesquisas ocorreu na área clínica, no qual os principais analitos monitorados clinicamente podem ser agora avaliados utilizando plataformas com custo extremamente reduzidos. Os níveis de diferentes espécies, como glicose, ácido úrico, lactato, nitrito e albumina, por exemplo, vem sendo estudado nos μPADs associados a detecção colorímetrica [1-3]. Para o monitoramente dessas analitos, diferentes agentes cromógenos podem ser empregados, sendo que cada um reage de modo espécifico com esses indicadores. Nesse sentindo, este trabalho foi desenvolvido no intuito de avaliar o efeito de diferentes indicadores envolvendo o monitoramento e detecção de glicose e ácido úrico em reações enzimáticas.

Procedimento experimental:

Diferentes agentes cromogénos foram testados para o monitoramento de glicose e ácido úrico realizados nos μPADS. Para o bioensaio de glicose, foram avaliados o iodeto de potássio (KI), uma mistura de ácido 3,5-dicloro-2-hidróxibenzenosulfônico e 4-aminoantipira (4-AAP/DHBS) e o 3,3`,5,5`-tetrametilbenzidina (TMB) como indicadores colorimétricos, enquanto que para o ensaio de ácido úrico foi utilizado a mesma mistura de (4-AAP/DHBS) e o o-dianisidina (OD) como indicadores. Exceto o TMB que foi preparado em metanol, todos os outros agentes cromógenos foram preparados em tampão fosfato (100 mmol/L, pH 6,0).

Os μPADS utilizados foram fabricados pela método de carimbagem, recentemente descrito por Garcia e colaboradores. Resumidamente, uma folha de palpel, previamente impregnada com parafina foi colocado sobre outra folha de papel (sem parafina), criando um "*sandwich*" de papeis. Em seguida, um carimbo de metal (contendo a geometria desejada) foi pré aquecido a 150 ºC e pressionado sobre o sandwich de papel para delimitar barreiras hidrofóbicas no papel sem parafina. O dispositivo final possui uma configuração de oito zonas circulares (zonas

de detecção) interligadas por canais microfluídicos a uma zona central denominada como zona de adição de amostra.

Após o processo reacional do analito com cada indicador e o desenvolvimento de cor na zona de detecção, a intensidade de cor foi correlacionada com a concentração do analito. Para tal finalidade, utilizou-se um scanner de mesa para realizar a digitalização da imagem e em seguida procedeu-se a análise da intensidade de *pixels* com a ferramenta histograma de um software gráfico.

Resultados e discussão:

Normalmente o monitoramento colorimétrico da glicose e ácido úrico ocorre por reações enzimáticas. Esse processo reacional ocorre pela oxidação do analito catalisada por enzimas oxidases, tendo como produto o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido produzido é em seguida utilizado para oxidar o agente cromógeno em uma reação secundária catalisada pelaenzima peroxidase (HPR). Seguindo esse processo, para o ensaio de glicose, as cores desenvolvidas durante o processo reacional foram marrom, magenta e azul quando o KI, 4-AAP/DHBS e TMB foram utilizados, respectivamente. No bioensaio de ácido úrico, as cores observadas foram magenta e amarelo, usando a 4-AAP/DHBS e OD como indicadores, respectivamente. Desde que os níveis de glicose e ácido úrico apresentam-se em concentrações distintas em diferentes matrizes biológicas, foram realizados estudos nos quais abrangesse faixas de concentração aplicáveis a qualquer fluido biológico.

Tabela 1- Valores dos limites de detecção, sensibilidade analítica e linearidade encontrada para os ensaios de glicose e ácido úrico, empregando diferentes indicadores.

Analito	Indicatores	LD (μM)	Sensibilidade (μM)	R^2	Linearidade (mM)
Glicose	KI	96	29,57	0,99	1,0 – 6,0
	4-AAP/DHBS	21	85,93	0,98	0,0 – 1,0
	TMB	89	44,63	0,98	1,0 – 5,0
Ácido úrico	4-AAP/DHBS	37	105,82	0,98	0,0 – 1,0
	OD	150	32,27	0,99	1,0 – 5,0

Como pode ser observado na Tabela 1, na faixa de concentração de glicose e ácido úrico variando de 0,0 – 1,0 mmol/L, as melhores sensibilidades e os menores valores de limite de detecção (LD) foram encontrados quando a mistura 4-AAP/DHBS foi utilizada como indicador nos dois bioensaios. Por outro lado, quando a faxia de concentração dos analitos foi maior que 1,0 mmol/L, as melhores respostas analíticas foram obtidas quando o TMB e a OD foram empregados no monitoramento de glicose e ácido úrico, respectivamente. Os menores valores de LD obtido nos µPADS associados a detecção colorimétrica permitiu a detecção de glicose em amostras de lágrimas. A lágrima é um fluído biológico que vem sendo recentemente explorado por apresentar alguns analitos de relevância clinica e por utilizar técnicas de coleta de amostra menos invasivas para o paciente. No entanto, para utilizar a lágrima como amostra, necessita-se de utilizar técnicas que possuem boa sensibilidade e detectabilidade, uma vez que a concentração de alguns analitos são extremamente reduzidas. A concentração de glicose na amostra de lágrima normalmente varia entre 0,1 a 0,6 mmol/L. Foram avaliadas quatro amostras de lágrimas de quatro doadores distintos e os valores de concentração de glicose encontrados foram de 0,20 ± 0,01, 0,34 ± 0,01, 0,25 ± 0,01 e 0,13 ± 0,01 mmol/L.

Conclusões:

Em resumo, diferentes agentes cromogénos foram avaliados para o ensaios envolvendo reações enzimáticas para monitoramento de glicose e ácido úrico. Basicamente, foram estudados os efeitos desses indicadores sobre os paramêtros, como LD, sensibilidade analítica e linearidade analítica. Dentre os indicadores avaliados, a mistura de 4-AAP/DHBS foi a que forneceu os melhores LDs e melhor sensibilidade para ambos os ensaios na faixa de concentração variando de 0,0 – 1,0 mmol/L. Para a faixa maior que 1,0 mmol/L, as melhores respostas analíticas foram obtidas quando o TMB e OD foi empregado no ensaio de glicose e ácido úrico, respectivamente. Além disso, os menores LDs encontrados permitiram o monitoramente de glicose em amostras de lágrima.

Referências:

[1]A.W. Martinez; S.T. Phillips; M.J. Butte; G.M. Whitesides, Angew. Chem., In. Ed. **46**, 1318 (2007).
[2]P. T. Garcia; T.M.G. Cardoso; C.D. Garcia; E. Carrilho; W.K.T. Coltro, RSC Advances, **4**, 37673 (2014)
[3]E. Evans; E.F.M. Gabriel; T.E. Benevidez; W.K.T. Coltro, C.D.Garcia, Analyst, **139**, 5560 (2014)

Reversible Single Particle Trapping in Microchannels

Jaione Tirapu Azpiroz[a]*, Yuksel Temiz[b], Emmanuel Delamarche[b]
[a] IBM Research, Av. Pasteur 138&146, Rio de Janeiro, Brasil
[b] IBM Research GmbH, Säumerstrasse 4, 8803 Rüschlikon, Switzerland
*jaionct@br.ibm.com

Abstract

Manipulating and immobilizing single microparticles in flowing fluids is relevant for biological assays and chemical test, and can enable dynamic characterization of single-particle reactions. Typical trapping mechanisms, however, are often non-reversible or require expensive laboratory equipment. Here, we combine the flexibility of dielectrophoresis for trapping beads with the ability to hold beads in firm positions and arrayed on a regular lattice using mechanical traps. We demonstrate dielectrophoresis-assisted mechanical traps with planar electrodes integrated in microfluidic channels. The design and configuration of the device is optimized through simulations of the combined effects of the hydrodynamic drag and electric field on 10μm polystyrene microspheres and their efficiency demonstrated experimentally.

Keywords: Microfluidics, Dielectrophoresis, Modeling, Silicon, Microparticles, Trapping.

Introduction

Periodic arrays of mechanical traps produce high density localized immobilization of particles, but are often non-reversible. Particle traps relying on dielectrophoresis forces induced by the spatial modulation of electric fields (field-induced charge polarization in the particles builds up a force that moves the particle along the field gradient) are flexible and reversible, but can suffer from particle vibrations and multiple bead stacking during signal acquisition. Here, we explore a configuration of periodic traps where the beads are guided by the electrodes and immobilized on recessed structures on mechanical obstructions along the path of the flow as displayed in FIG 1.

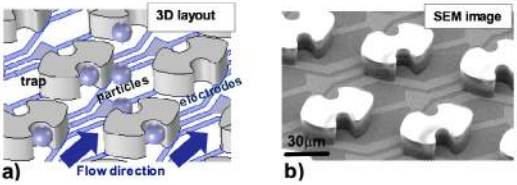


FIG. 1: a) Design of trapping structures inside the microchannel with integrated planar electrodes. Microbeads are displayed for illustration purposes. b) SEM image of a portion of the final device.

Computational Methods

Comsol Multiphysics® Finite Element solver was used to compute the low frequency 3D electric field distribution generated by the integrated electrodes as well as to solve the 3D Navier-Stokes equations applied to laminar flows to simulate the hydrodynamic flow within the obstructed microchannel. A single repeating cell containing a single mechanical recessed structure from FIG 1a) and shown in FIG 2a) is simulated assuming periodic boundary conditions. FIG 2b) displays a 2D slice of the tangential component of the net force magnitude in nano-Newtons experienced by the bead. It is observed that the net force near the trap starts to bend pushing the particle orthogonally to the flow and into the mechanical trap against the drag of the flow. Also displayed in FIG 2b) is the simulated trajectory of a hypothetical polystyrene particles microparticle flowing within the channel using the particle tracing feature in Comsol which solves for the position of the particle along the channel. Simulation insight is then used to

optimize the design of the electrode configuration and voltage settings for the efficient trapping of single microbeads while avoiding stacking of multiple particles on the same location.

Fabrication and Experimental Methods

In the lateral trap device of FIG 1b) planar metallic electrodes are lithographically patterned on a silicon substrate by lift-off technique and covered by a 14um thick layer of Dry-Film resist where cello-shaped mechanical structures within a 200um width microfluidic channels are patterned through a second lithographic step. The channels are then sealed by lamination with a thin dry-film resist cover with very good sealing and contamination properties[1,2]. 10µm diameter polystyrene beads (Thermo Fisher Scientific) were suspended in a 1× Tris-EDTA buffer and pipetted to the loading pad while 8Vpp potential at 1 MHz was applied to the electrodes. To sustain a flow rate of 120um/s, our microfluidic device incorporates an in-situ capillary pump that drives the buffer solution to fill the channels and pull the beads towards the trapping region[1].

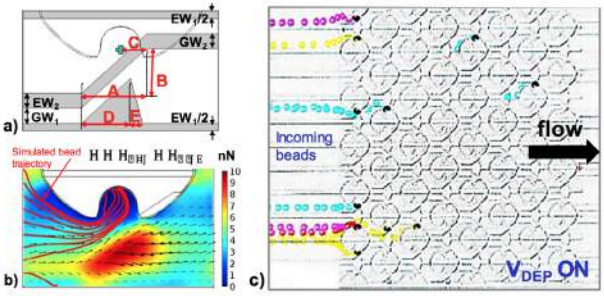


FIG. 2: a) Layout of trapping cell design lower half with paramctrized electrodes. b) 2D slice of net force field tangential component and force magnitude in nano-Newtons of the combined effect of the DEP and fluid drag across channel mid-depth for a trapping cell with parameters: EW_1=4µm; EW_2=6µm; GW_1=4µm; GW_2=4µm; A=27µm; B=12.5µm; C=18µm; D=13µm;E=3µm; Trap-diameter=12µm; Voltage=8Vpp; Flow Speed=120µm/s. c) Composite image of consecutive video frames after background subtraction highlighting bead movement from left to right. Voltage is adjusted for effective single trapping of beads.

Results and Discussion

FIG 2c) displays a microscope image of the trapping section with 10um polystyrene beads flowing from left to right in the image. The image is a composite of several consecutive frames of a video captured with a bright light microscope and the background subtracted to highlight the movement of the beads. Incoming beads are observed to flow into the trapping area following the flow streamlines but get slightly deflected and trapped as they interact with the electrodes. Beads are effectively and uniformly distributed inside individual traps, avoiding multiple particles trapped per location. Moreover, a critical advantage of these DEP-assisted mechanical traps is the ability to release the particles from the traps once the voltage is turned off.

Conclusions

In this paper we demonstrate the design of a simple and reversible single particle trapping device optimized through flow and electric field simulations.

References

[1] Y. Temiz, G.V. Kaigala and E. Delamarche. 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. 27-31 October 2013, Freiburg, Germany.

[2] Y. Temiz and E. Delamarche. J. Micromech. Microeng. **24**, 097001 (2014)

Mobilidade de portadores em filmes nanoestruturados no interior de microcanais

Mawin J.M. Jimenez, T. P. Almeida, M.H.O. Piazzetta, A.L. Gobbi, A. Riul Jr

mjmj@ifi.unicamp.br; tiago_pedr@hotmail.com; maria.piazzetta@lnnano.cnpem.br; angelo.gobbi@lnnano.cnpem.br;

Resumo: *Analisamos a mobilidade de portadores de cargas por espectroscopia de admitância (AS) em filmes ultrafinos nanoesturados no interior de microcanais de PDMS, previamente selados sobre eletrodos interdigitados de ouro. A admitância complexa está relacionada com as propriedades de transporte de portadores de cargas do material estudado, o que permite obter sua mobilidade a partir de um gráfico da susceptância vs frequência. Filmes ultrafinos nanoestruturados de ftalocianina tetrasulfonada de cobre (CuTsPc) foram fabricados no interior dos microcanais de PDMS através da técnica de automontagem por adsorção física. Os resultados obtidos indicam uma mobilidade na ordem de 10^{-3} $cm^2/s.V$ para um potencial DC aplicado de ~ 0,5 a 1,5V.*

Palavras-Chaves: *mobilidade de portadores; espectroscopia de admitância; microfluídica; filmes ultrafnos*

Introdução: A espectroscopia de admitância permite estudar propriedades interfacias de sistemas complexos, possibilitando a determinação de propriedades intrínsecas de um material, como a mobilidade dos portadores de cargas. Martens *et al.* [1] relatam que o tempo de trânsito médio, τ_{dc}, pode ser extraído a partir de um gráfico do negativo do diferencial da susceptância $-\Delta B$ *x* frequência. Em um gráfico deste tipo aparece um máximo a uma frequência característica $f_r=\tau_r^{-1}$, na qual Martens *et al.* argumentaram que a posição do máximo na curva deve estar relacionado ao tempo de trânsito médio dos portadores τ_{dc}. Tsang et al. [2] mostram que $\tau_{dc} = 0{,}56\tau_r$, para o transporte não dispersivo, entretanto, quando o transporte é dispersivo, o fator 0,56 varia ± 0,1 para diferentes graus de dispersão. Quando o transporte é altamente dispersivo, a capacitância medida acaba sendo muito maior que a capacitância geométrica em todas as frequências medidas.

Procedimento experimental: A admitância é definida como [3]

$$Y \equiv \frac{I_{ac}}{V_{ac}} = G + iB \qquad (1)$$

sendo $i^2 = -1$, G a condutância e B *a* susceptância. A espectroscopia de admitância consiste na aplicação de uma tensão do tipo,

$$V(t) = V_{dc} + V_{ac}sin(\omega t) \qquad (2)$$

sendo V_{ac} a amplitude do sinal aplicado, e $\omega=2\pi f$ a frequência angular. Como resposta a este sinal obtemos uma corrente composta de uma parte DC e uma parte menor I_{ac} que deslocada em fase por um ângulo θ em pequenas amplitudes do sinal AC, ou seja,

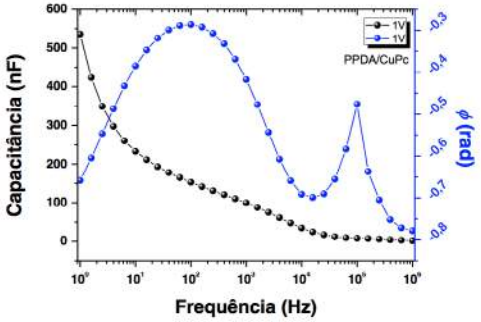
$$I(t) = I_{dc} + I_{ac}sin(\omega t + \theta) \qquad (3)$$

Os chips utilizados neste trabalho foram fabricados no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNnano), e os filmes ultrafinos nanoesturados de CuTsPc foram feitos através da técnica de automontagem por adsorção física (LbL, do inglês *layer-by-layer*). O filmes LbL foram fabricados através da injeção de solução 2 mg/mL de CuTsPc com uma microbomba de seringa (New Era) no interior do microcanal de PDMS,

previamente selado sobre eletrodos interdigitados de ouro através de plasma de oxigênio. As medidas de admitância foram realizadas em um analisador de impedância Solartron 1260, acompanhado de uma interface dielétrica 1296.

Resultados e discussão: Através das medidas de admitância foram feitos gráficos de $C \times f$ e $\phi \times f$, *lustrados na Fig. 1*.

Figura 1 – Curvas de capacitância e fase em função da frequência medida em um filme LbL de $(PDDA/CuTsPc)_1$



A curva de capacitância apresenta o comportamento esperado, uma diminuição do valor medido em função do aumento da frequência, enquanto através da curva $\phi \times f$ extraímos a frequência a partir da qual calculamos o valor da mobilidade de portadores no material em função do potencial DC aplicado, da ordem de 10^{-3} $cm^2/s.V$. Importante ressaltar que a ordem de grandeza nos valores de mobilidade não se altera em função da variação do potencial DC aplicado.

Conclusões: Verificamos a mobilidade de portadores em filmes ultrafinos automontados de CuTsPc depositados no interior de microcanais de PDMS selados sobre eletrodos interdigitados de ouro. Os valores observados estão coerentes com aqueles encontrados na literatura através do método dinâmico da técnica LbL, utilizando uma metodologia simples e eficiente.

Referências e agradecimentos:

Referências:

[1] H.C.F. Martens, J.N. Huiberts, and P.W.M. Blom. *Applied Physics Letters*, **77**(12):1852–854, 2000.
[2] S.W. Tsang, S.K. So, and J.B. Xu. *Journal of Applied Physics*, **99**(1):013706, 2006.
[3] H.C.F. Martens, H. B. Brom, and P.W.M. Blom. *Phys. Rev.* B, **60**:R8489–R8492, Sep 1999.

Agradecimentos: LNnano, FAPESP, CAPES, CNPq.

Análise de solos utilizando uma língua eletrônica

Andrea Hernández Rodríguez, Mawin Javier Martinez Jimenez, Tiago Pedroso de Almeida, Maria Helena Oliveira Piazzetta, Angelo Luiz Gobbi, Antonio Riul Jr.

andreinahr@hotmail.com; martinezmawin@gmail.com; tiago_pedr@hotmail.com; maria.piazzetta@lnnano.cnpem.br; angelo.gobbi@lnnano.cnpem.br; riul@ifi.unicamp.br

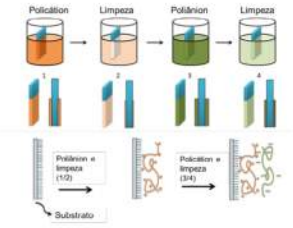
Resumo: *Foram fabricados filmes ultrafinos nanoestruturados de diferentes materiais (PEI, PDDA, MMt, GPSS, CuTsPc) no interior de microcanais de PDMA selados por plasma de oxigênio sobre eletrodos interdigitados de ouro. Através da técnica de automontagem por adsorção física foram formadas nanoestruturas PEI/MMt, PDDA/GPSS, PDDA/CuTsPc que atuaram como unidades sensoriais em uma língua eletrônica. A variação de resposta elétrica observada permitiu a distinção de amostras de solos através de medidas de impedância elétrica utilizando quantidades mínimas das amostras (mg e μL).*

Palavras-Chaves: *LbL; língua eletrônica; microcanais; solos.*

Introdução: O controle de arquitetura molecular em dispositivos microfluídicos tem aberto novas oportunidades e aplicações [1], que estendemos neste trabalho para análise de solos, visando possibilidades futuras de contribuirmos em desenvolvimentos para agricultura de precisão. Os materiais utilizados compondo as unidades sensoriais formando o dispositivo foram óxido de grafeno reduzido em ácido poliestireno sulfonado (GPSS) [2], argila montmorilonita (MMt) e ftalocianina tetrassulfonada de cobre (CuTsPc). Os microcanais foram fabricados em colaboração com o Laboratório de Microfabricação no LNNano (CNPEM, Campinas – SP), e para caracterização dos filmes nanoestruturados utilizamos espectroscopias de impedância e UV-vis. A aquisição de dados também foi realizada com medidas de impedância na faixa de frequência de 1Hz – 1 MHz, e as amostras de solo foram fornecidas em colaboração com os Profs. Paulo Graziano e Lucas Rios do Amaral (FEAGRI – UNICAMP).

Procedimento experimental: Inicialmente, foi realizado um estudo sobre o crescimento das monocamadas dos filmes poliméricos no interior dos microcanais de PDMS usando a técnica de automontagem por adsorção física (LbL, do inglês *layer-by-layer*) sobre substratos de quartzo. Brevemente, a técnica LbL possibilita a deposição de materiais através de um equilíbrio termodinâmico delicado, possibilitando controle de espessura em nível molecular na formação de filmes nanoestruturados (Figura 1). [3]

Figura 1 Técnica LbL



Após a confirmação prévia de alguns parâmetros (pH e tempo de imersão) no crescimento dos filmes LbL através da metodologia convencional [3], com auxílio da espectroscopia UV-vis, os mesmos foram utilizados para a fabricação dos filmes LbL no interior dos microcanais de PDMS. Soluções contendo polieletrólitos de cargas opostas (descritas na Tabela 1) foram injetadas alternadamente com uma bomba de seringa (1000μL/hora) em um intervalo de tempo específico a cada material utilizado para crescimento das nanoestruturas. Após deposição dos filmes LbL sobre microeletrodos interdigitados de ouro, foram passadas no interior dos microcanais amostras de solo (argiloso e arenoso) fornecidas pelos Profs. Paulo Graziano e Lucas Rios do Amaral (FEAGRI, UNICAMP). Medidas de espectroscopia de impedância foram adquiridas em um analisador de impedância Solartron 1260A quando as amostras de solo diluídas em água ultrapura (obtida de um sistema Sartorius) eram colocadas em contato com as unidades sensoriais. Com os dados de espectroscopia de impedância as amostras foram posteriormente correlacionadas através da Análise por Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Componente Analysis*).

Tabela 1.Soluções usadas nos experimentos

Solução	Concentração(mg/mL)	pH	Tempo de deposição
MMt	1	3	10min
PEI	1	3	3min
GPSS	1	3	15min
PDDA	10	3/8	10/8min
CuTsPc	0,5	8	8min
Terra Argilosa	0,04	Sem ajuste	-
Terra Arenosa	0,04	Sem ajuste	-

Resultados e discussão: Usando a espectroscopia de UV-Vis podemos observar que os filmes feitos pela técnica de LbL possuem crescimento linear no interior dos microcanais, indicativo de que a mesma quantidade de material é adsorvida a cada etapa de deposição (Figura 2). A correlação de dados das diferentes unidades sensoriais através do gráfico PCA possibilitou boa distinção das amostras de acordo com suas características físicas e químicas. A proximidade das águas era esperada uma vez que as mesmas correspondem às medidas realizadas após lavagem das unidades sensoriais, após as leituras das amostras de solo (Figura 3).

Figura 2: Crescimento de um filme LbL

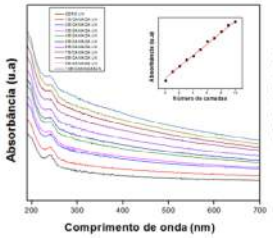
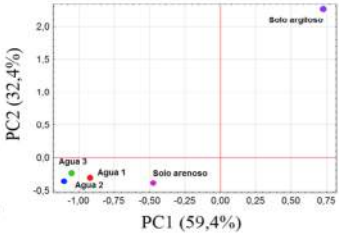


Figura 3: Gráfico PCA das amostras analisadas



Conclusões: Os filmes LbL se mantiveram íntegros mesmo após a lavagens consecutivas das unidades sensoriais. Apesar da simplicidade do método de medida, conseguimos boa distinção entre as amostras avaliadas, sendo um passo promissor para refinamentos futuros que poderão contribuir para procedimentos mais simples, rápidos e baratos que as metodologias atuais empregadas em agricultura de precisão.

Referências e agradecimentos:

Referências [1] Daikuzono, C. M.; Dantas, C. A. R.; Volpati, D.; Constantino, C. J. L.; Piazzetta, M. H. O.; Gobbi, A. L.; Taylor, D. M.; Oliveira, O. N.; Riul, A., Microfluidic electronic tongue. Sensors and Actuators B-Chemical **207**, 1129-1135(2015).

[2]Celina,M.M.; Fabricação de filmes ultrafinos automontados para aplicações em células a combustível.Tese de Doutorado (2014).

[3] G. Decher, Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites, Science. 277 (1997) 1232 –1237.

Agradecimentos Dr. Celina M. Miyazaki, (UFSCar, campuas Sorocaba), Msc Cristiane M. Daikuzono (IFSC, USP), Dr Flávio S. Makoto (IFSC, USP), Profs. Paulo Graziano e Lucas Rios do Amaral (FEAGRI/UNICAMP).

Fabricação e Caracterização Experimental de Microrreator Aplicado a Síntese de Biodiesel

José Martim Costa Junior, josemartim2005@gmail.com;
Carolina Palma Naveira Cotta, carolina@mecanica.coppe.ufrj.br;

Resumo: *O presente trabalho trata do projeto, fabricação e da caracterização experimental de um microrreator para a síntese de biodiesel. O presente microrreator, baseado em microcanais e construído por meio da técnica de micro-fresamento, destaca-se pelo caráter inovador na utilização da rota etílica em reação na microescala, contrapondo-se ao uso da rota metílica, mais amplamente analisada mundialmente. O uso do etanol pode ser justificado pela sua menor toxicidade quando comparado ao metanol, por ser considerado ambientalmente mais correto, mas talvez principalmente devido ao fato de termos no cenário nacional uma grande disponibilidade deste reagente, que tem origem vegetal e por fim não depende das variações do mercado oscilante do petróleo. Neste sentido, a conversão dos triglicerídeos em ésteres etílicos de ácidos graxos (EsEAG), aqui estudada foi avaliada para diferentes tempos de residência através da análise do biodiesel produzido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).*

Palavras-Chaves: *microrreator, microcanais, biodiesel, transesterificação, rota etílica, EsEAG*

Introdução: Historicamente, as preocupações com o aumento descontrolado do uso de derivados do petróleo e a perspectiva de que houvesse falta destes produtos, incentivaram o desenvolvimento de projetos sobre o uso de misturas binárias com biocombustíveis. Além de ser totalmente compatível com o diesel de petróleo em praticamente todas as suas propriedades, o biodiesel ainda apresenta várias vantagens adicionais em comparação com este combustível fóssil. É biodegradável, gera redução nas principais emissões presentes nos gases de exaustão, possui um alto ponto de fulgor, o que lhe confere um manuseio e armazenamento mais seguros. O processo convencional de produção do biodiesel envolve a agitação vigorosa da mistura álcool, catalizador e óleo vegetal em grandes reatores por mais de duas horas, para que a reação química de transesterificação ocorra, criando biodiesel e glicerol, bioprodutos que são em seguida separados. Apesar do processo convencional na produção de biodiesel estar bem consolidado, este apresenta ainda alguns problemas como reações incompletas, formação de emulsões, isolamento e purificação de produtos, além dos elevados padrões de qualidade do biodiesel. Diferentes tecnologias estão sendo estudadas e desenvolvidas tendo como objetivo a melhoria do processo, aumento da segurança, redução do consumo de energia, e uma maior preocupação ambiental. Desse modo, a intensificação de processos com o uso de microrreatores apresenta-se como uma forma promissora para estudo e otimização na síntese de biodiesel, os quais permitem uma transferência de massa e calor mais efetiva, reduzindo os tempos de reação, resultando em um controle mais preciso do processo. Devido ao aumento na área interfacial relativa entre as fases com a redução de volume, tem-se neste tipo de micro-dispositivos altas taxas de reação em baixos tempos de residência, quando comparados aos reatores tradicionais na macro-escala.

Projeto e fabricação do microrreator: O procedimento de fabricação do microrreator consiste no micro-fresamento via controle numérico computadorizado, de microcanais em uma base metálica (latão), e posterior selagem por um processo de soldagem a base de estanho. O dispositivo final tem dimensões totais de 25mm de largura, 40mm de comprimento e 6mm de espessura. O microrreator é baseado em um microcanal de seção de 400μmX400μm e comprimento total de 39,535cm. O processo de fabricação do microrreator é mostrado esquematicamente na Figura 1 e consiste basicamente de quatro etapas: (1) Preparação das superfícies da base e da tampa através de uma etapa de faceamento; (2) Deposição de uma fina camada de estanho em ambas as placas, base e tampa; (3) Gravação dos microcanais na placa da base por meio do processo de microfresamento (CNC Minitech Machinery); (4) Selagem das duas placas utilizando uma prensa térmica e pneumática (PLS 150 By Metalnox).

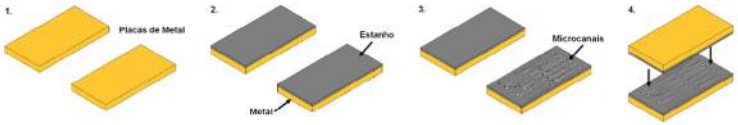


Figura 1. Representação esquemática do processo de microfabricação do microrreator

Síntese de Biodiesel usando Microrreator: A bancada experimental projetada e construída para a realização da síntese de biodiesel no microrreator, e seus principais componentes, são mostrados na Figura 2. Na síntese de biodiesel aqui analisada foi utilizado o óleo vegetal de soja de grau alimentício, etanol absoluto (99° Gl da B'Herzog) e NaOH (da Petroquimios) como agente catalisador da reação.

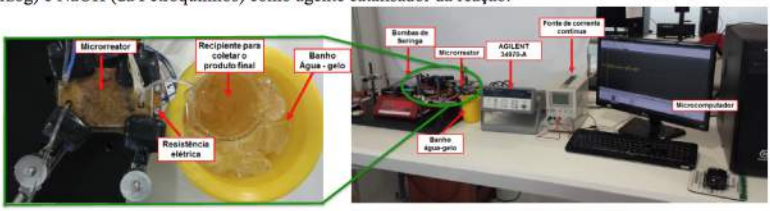


Figura 2. Bancada experimental e seus principais componentes

O procedimento experimental é iniciado com o bombeamento da solução de etanol com NaOH para o interior do microdispositivo por uma das entradas do microrreator enquanto o óleo de soja é bombeado pela outra. As duas correntes entram então em contato e o processo de transferência de massa e reação de transesterificação ocorre preferencialmente por difusão ao longo do comprimento de 39,535cm do microcanal. O produto final da reação é coletado em um recipiente imerso em banho de gelo-água que serve para estancar a reação e permitindo assim a caracterização do microrreator. O produto coletado é separado em duas fases, o glicerol e os ésteres etílicos de ácidos graxos EsEAG que são lavados com água destilada a 50ºC removendo desta forma os resíduos remanescentes de catalizador e glicerol. As análises do biodiesel produzidos neste microrreator foram analisados através da cromatografia líquida de alta eficiencia (CLAE), segundo o método descrito por [1].

Resultados e discussão: A conversão do triglicerídeo em biodiesel foi analisada para diversos tempos de residência (1, 3, 5, 8, 10, 13 e 15 minutos). Os experimentos foram conduzidos em uma razão molar etanol/oléo de 12:1, uma quantidade de catalizador de 1,0 wt % (da massa do óleo), e a temperatura ambiente de 23ºC. A Figura 3 mostra um resultado do perfil de conversão dos EsEAG ao longo do tempo de residência. Pode-se observar uma conversão dos EsEAG de 30,57±0,21% e 57,51±0,86%, para o tempo de residência de 1 min e 10 min, respectivamente. Para tempos maiores que 10min tem-se uma diminição da conversão dos esteres etílicos possivelmente explicada pela possibilidade a saponificação do biodiesel com o NaOH [2]. Esta analise, já a temperatura ambiente, ilustra o potencial de aplicabilidade do microrreator nesta síntese, uma vez que a literatura indica um aumento significativo da eficiência de conversão com o aumento da temperatura da reação [3, 4].

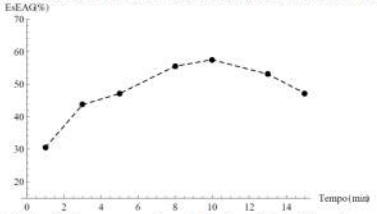


Figura 3. Perfil da conversão média dos EsEAG ao longo do tempo.

Conclusões: Neste trabalho foi apresentado o processo de fabricação de um microrreator visando a aplicação na síntese de biodiesel de rota etílica, condizente com a matriz energética nacional. O microrreator fabricado em material metálico propicia recuperação de calor rejeitado de outros processos, como por exemplo motores de combustão ou painéis fotovoltaicos/heliotérmicos, a partir de um micro-trocador de calor que pode ser integrado no mesmo substrato do microrreator, possibilitando desta forma a realização da reação de transesterificação a mais altas temperaturas e dando um caráter inovador ao dispositivo.

Referências e agradecimentos:

[1] D.F. Andrade, J.L. Mazzei, e L.A. d'Avila, Rev. Virtual Quim. **3**, 452 (2011).
[2] J. Sun, J. Ju, L. Ji, L. Zhang, e N. Xu, Ind. Eng. Chem. Res. **47**, 1398 (2008).
[3] A.A. Al-Dhubabian, M.Sc. thesis., Oregon State University, Corvallis, OR, USA (2005).
[4] B.H. Dennis, W. Jin, J. Cho e R.B. Timmons, Inverse Problems in Science and Engineering **16**, 693 (2008).

Pore-scale analysis of oil displacement by polymer solution.

Nicolle Lima, Márcio Carvalho

nicollelimarj@hotmail.com; msc@puc-rio.br

Abstract. *Water flooding is the most commonly used oil recovery method in the industry. However, the high mobility ratio limits the amount of oil displaced by the water phase. An effective alternative to minimize this limitation is the application of technologies that act as mobility control agents, as polymer solution injection. Experimental evidences have shown that the elastic behavior of some polymer solution may contribute to a better pore level oil displacement, reducing the residual oil saturation. This pore level behavior is not clearly understood. Here, a glass microfluidic chip is used as a two-dimensional model porous space. This device has the principal features of a porous media and provides means for pore level flow visualization. The evolution of the water phase as it displaces oil is recorded. Three different water phases were used: pure water, a high molecular weight PEO solution and a glycerol-water mixture. Flow visualization provides specific information about the presence of the trapped oil phase and the movement of the oil/water interface in the network. Results show that the polymer solution can modify the liquid distribution in the porous media, improving the displacement efficiency at pore scale and consequently the final oil recovery factor.*

Keywords: *polymer, enhanced oil recovery, viscoelasticity, porous media, micromodel*

Introduction: Water flooding is the most commonly used secondary recovery method, the application of water injection is responsible for more than half of oil production in the world. This process, however, has a limited reservoir sweep efficiency, leaving a considerable quantity of oil in the reservoir. This is due to unfavorable mobility ratio between oil and water, caused by the low viscosity of water compared with the oil, which results in the appearance of viscous fingers and inefficient sweep of the reservoir. Polymer is used in many cases as a way to increase the water phase viscosity and consequently reduce the mobility ratio. Many studies have been developed to understand polymer injection and its behavior in the reservoir.

In the review work from Wei et al (2014) it is shown that polymer flooding is economically and technically successful in EOR (enhanced oil recovery) projects. Also when flooding with viscous polymer solution, the mobility ratio between the displacing fluid and the displaced fluid becomes more favorable comparing to water flooding. The product of the macroscopic displacement efficiency and the microscopic displacement efficiency defines the overall oil displacement efficiency during oil recovery processes. Macroscopic displacement efficiency is a measure of the effectiveness of the displacing fluid in contacting the oil zone volumetrically; and the microscopic displacement efficiency is related to the effectiveness of the displacing fluid in mobilizing oil trapped at the pore scale by capillary forces.

Many works have explained the macroscopic effects of polymer addition to water to increase the oil recovery, but the pore level behavior (microscopic displacement efficiency) is not clearly understood, and this is the main objective of this study.

Experimental setup: The experimental setup used in this work is shown in Figs. 1 and 2.

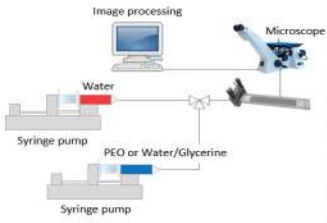


Figure 1. Experimental setup

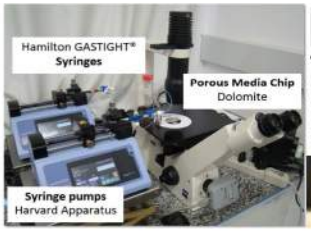


Figure 2. Syringe pumps and microscope

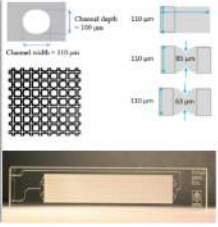


Figure 3. Microchip

It consists of the following components:

1. Glass porous media chip, formed as an array of interconnected pores and throats (Fig. 3).
2. Fluid injection system, consisting of two injection syringe pumps.
3. Visualization system of flow through porous media, consisting of a microscope and a camera.
4. Image processing, a computer with a MATLAB program to process the images.

Results and discussion:

The most common driving fluid used for oil recovery is water. Thus, for this study, water is used to compare the polymer displacement of oil. The flowrate of the injected fluids were 0.013 mL/h and four different areas of the chip were examined: the entrance, the exit and two areas in the middle with the same distance from de entrance/exit. For each area 4 pictures were taken. The pictures presented in Fig. 4 show different steps of the flooding procedure in the exit of the microchip. The red squares shows the oil mobilized after PEO injection and the yellow squares after the second water injection.

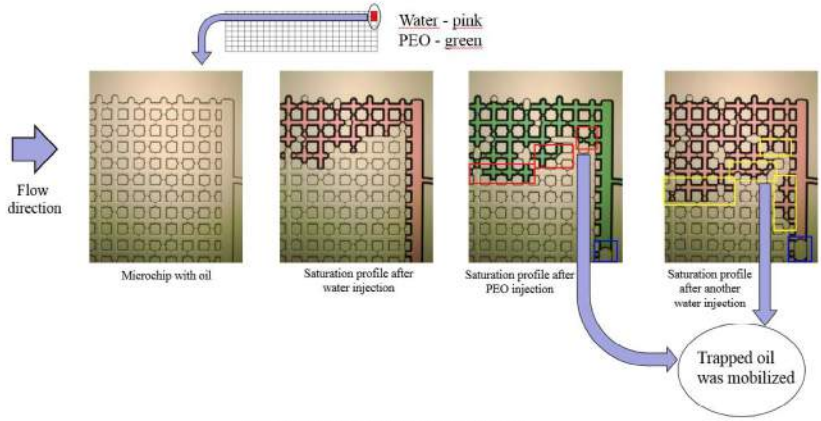


Figure 4. Saturation profile at the exit

Conclusion:

Enhanced oil recovery is an increasingly important field, and this work presents the efforts of developing microfluidics experiments to understand how polymer solution displaces oil a porous media and how they can modify the liquid distribution improving the displacement efficiency. Variations of fluids and flow rates will be examined for their ability to increase the recovery.

Future work with more complex, lower permeability microfluidics device will be performed and also with a device that allow measurements of the pressure drop.

References:

Colmenares Vargas, K. M. (2014). Processo de Deslocamento de Óleo em Micro Modelos de Meios Porosos por Injeção de Emulsão de Óleo em Água. Msc, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, RJ

Montalvo, M. (2008). Escoamento de Emulsões Óleo em Agua através de Micro-capilares. Msc, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, RJ.

Demin, W., Jiecheng, C., Qingyan, Y., Wenchao, G., & Qun, L. (2000). Viscous-elastic polymer can increase microscale displacement efficiency in cores. In SPE annual technical conference.

Wei, B., Romero-Zerón, L., & Rodrigue, D. (2014). Oil displacement mechanisms of viscoelastic polymers in enhanced oil recovery (EOR): a review. Journal of Petroleum Exploration and Production Technology, 4(2), 113-121.

Plataforma eletroanalítica *point-of-care* baseada em potenciostato *homemade* e *smartphone* para aquisição de dados via *bluetooth*.

Márcia B. R. Vicentini, Rui C. Murer, Gabriela F. Giordano, Angelo L. Gobbi, Renato S. Lima.

RESUMO

Este projeto consistiu em duas etapas, quais sejam: fabricação de um potenciostato portátil de baixo custo com sistema de transmissão de dados via Bluetooth e desenvolvimento de um aplicativo (app) para smartphone em sistema operacional Android com tecnologia Bluetooth visando à aquisição e monitoramento dos dados gerados pelo potenciostato. O método foi, até o momento, aplicado ao par redox $FeCN_6^{3-}$/ $FeCN_6^{4-}$ e calibrado em relação a um potenciostato comercial através de medidas por voltametria cíclica.

Palavras-chave: *Experimentos in-situ, aplicativo, Android, celular, instrumentação.*

INTRODUÇÃO

Os dispositivos *point-of-care* (POC) são atualmente uma área importante no campo das ciências analíticas quantitativas. Tais métodos possibilitam testes baratos, rápidos, portáveis e simples prescindindo a necessidade por operadores qualificados.[1] Neste projeto, reportamos uma plataforma analítica potencial para o desenvolvimento de dispositivos *point-of-care*. Ela baseia-se em um potenciostato portátil de baixo custo para a realização de determinações eletroanalíticas e em um *smartphone* para a aquisição de dados via *Bluetooth*. O advento do *smartphone* em química analítica é uma área do conhecimento atual e de fronteira. Suas características intrínsecas tais como portabilidade, uso difundido, comunicação e computação contribuem notoriamente para a construção de plataformas POC.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Inicialmente, um potenciostato portátil integrando um sistema de transmissão de dados via *Bluetooth* foi construído. O circuito relativo às funcionalidades de medida eletroquímica foi baseado em artigo publicado na literatura.[2] O dispositivo permite análises pelos métodos: amperometria (i) e voltametrias de (ii) onda quadrada, (iii) cíclica e (iv) linear. Um cabo USB permite o envio de dados a computadores. Adaptações adicionais no *hardware* do potenciostato foram implementadas as quais permitiram a sua alimentação mediante o uso de uma bateria de 9 V convencional. Isso representa uma vantagem substancial no tocante à realização de ensaios *in-situ*. Demais adaptações foram feitas tendo por finalidade a capacidade de transmissão dos dados gerados via *Bluetooth* para dispositivos móveis, como celulares, *tablets* e *notebooks*.

Posteriormente, desenvolvemos um app para *smartphone* em sistema operacional Android com tecnologia *Bluetooth* visando à aquisição dos dados obtidos pelo potenciostato. Uma vez concluído o teste eletroquímico e o recebimento dos dados pelo *smartphone*, o mesmo gera um gráfico para o usuário fornecendo, em seguida, a opção de envio do resultado por e-mail. Nesse caso, os arquivos são enviados em formato 'txt' para fácil manipulação por *softwares* de tratamento de dados e geração de gráficos. Um vídeo apresentando um teste pela plataforma segue no *link*: https://www.youtube.com/watch?v=Qi2NM6kkngM&feature=youtu.be.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A princípio, os gráficos gerados pelo ZR expressavam em seu eixo y valores com unidade arbitrária. Desse modo, foi necessária uma calibração do potenciostato *homemade* com um

equipamento comercial de referência. Para tal propósito, usamos o potenciostato AUTOLAB PGSTAT302N da Metrohm como referência. Os testes consistiram em medidas por voltametria cíclica ao par $FeCN_6^{3-}/FeCN_6^{4-}$. Foi usada uma célula eletroquímica com ouro (d = 3,0 mm), fio de platina e Ag/AgCl como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente. Os testes foram conduzidos no intervalo de potencial de 0,0 a 0,5 V vs. Ag/AgCl com velocidade de varredura de 50,0 mV s^{-1}. O resultado referente à calibração do ZR segue na **Figura 1 (a)**. Os parâmetros obtidos pelo ZR como eixo y dos seus gráficos foram convertidos em corrente (unidade: Ampère) no *software* do próprio ZR ao usar a equação de calibração. Em termos dos dados de potencial do ZR (eixo x), seus valores estavam deslocados em -0,3 V frente aos dados do potenciostato comercial. Para ajuste do potencial, seus dados foram corrigidos em +0,3 V.

Após os ajustes de corrente e potencial no ZR, os seus dados de voltametria cíclica se tornaram concordantes com aqueles obtidos pelo potenciostato comercial. Voltamogramas registrados por ambos os potenciostato são exibidos na **Figura 1 (b)**.

CONCLUSÃO

Uma plataforma analítica foi desenvolvida para determinações eletroanalíticas *point-of-care*. Além de características como portabilidade, baixo custo e operação simples as quais são essenciais para experimentos *in-situ*, tal plataforma possui a capacidade de transmissão dos dados em função do uso do *smartphone*. Ademais, nossa plataforma possui um desempenho analítico elevado. Os métodos eletroanalíticos possuem, em linhas gerais, níveis satisfatórios de precisão, robustez, sensibilidade, detectabilidade e especificidade.

Como etapa futura, será implementado o envio de dados do *smartphone* para o ZR para que, assim, o aplicativo não apenas receba informações, mas também possa atuar como elemento ativo ajustando os parâmetros desejados dos testes eletroanalíticos. Adicionalmente, serão gerados automaticamente os cálculos da resposta em determinado ponto do gráfico e da concentração da espécie de interesse utilizando a equação linear da curva analítica obtida.

REFERÊNCIAS

1. Yetisen, A. K.; Akram, M. S.; Lowe, C. R. *Lab Chip* **2013**, *13*, 2210.
2. Rowe, A. A.; Bonham, A. J.; White, R. J.; Zimmer, M. P.; Yadgar, R. J.; Hobza, T. M.; Honea, J. W.; Ben-Yaacov, I.; Plaxco, K. W. *PLoS ONE* **2011**, *6*, 23783.

E-mail: **marcia.rocha@lnnano.cnpem.br**

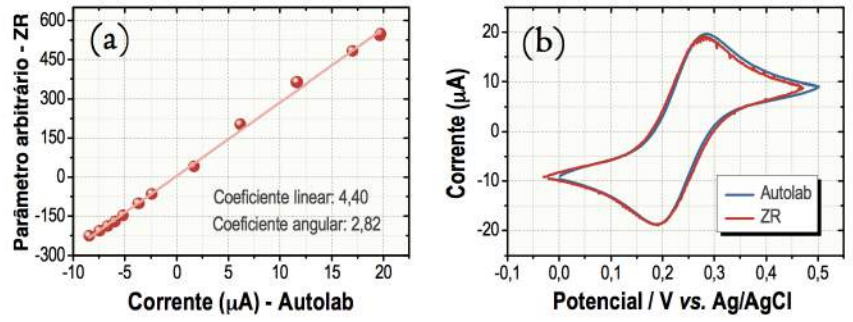


Figura 1. Curva obtida para correlação entre as correntes obtidas pelo ZR (ZR) e pelo potenciostato comercial (**a**). Voltamogramas cíclicos obtidos usando o Autolab (—) e o ZR (—) após ajuste dos seus parâmetros (**b**).

3D printed microchannels

Gabriel Gaal, Varlei Rodrigues, Antonio Riul Jr.

gabriel-gaal@hotmail.com; varlei@ifi.unicamp.br; riul@ifi.unicamp.br

Abstract: 3D printing is an emerging tool technology offering flexibility to expand the frontiers in microfluidic devices and applications. We present here the use of a home-made fused deposition modelling 3D printer for rapid prototyping of microchannels in poly(lactic acid). Different architectures were easily assembled in 2D and 3D microchannel structures using a one-step fabrication procedure, reducing costs and fabrication processes, encouraging future technical contributions for innovations and applications in different research fields.

Keywords: *3D printing; Polylactic acid (PLA); microchannels.*

Introduction: Three-dimensional (3D) printing was developed in the early 1990s and it has moved forward in leaps and bounds over the past few years, nowadays posing as one of the most promising technologies for 3D integration of circuits and complex systems, in addition to 3D printing of biomaterials and tissue engineering scaffolds on demand. We used the Fused Deposition Modelling (FDM) 3D print methodology which is a well-known procedure for plastic extrusion, where a filament is pushed by a stepper motor to a hot end that melts the plastic, which is then deposited in a layer-by-layer pattern to build the piece [1].

Poly(lactic acid) (PLA) is a plastic that has been used to built-up 3D structures that is an option to the traditional PDMS. It presents several properties, as transparency and biocompatibility, which are interesting to several microfluidics applications. Moreover, 3D printed PLA model is a rapid and low cost prototyping procedure when compared with PDMS technology.

We present here the state of the art to get 3D-printed microchannels in PLA within a couple of minutes in a one-step fabrication process. Different microchannel architectures were easily setup and we have obtained good laminar flow in all structures tested, even within ~ 2,5 cm length. Also, we have been able to easily integrate the microchannel device with metallic electrodes, thin glasses, plastics and paper, envisaging future microfluidic applications.

Experimental procedure: A standard home-made 3D printer (Prusa Mendel90 - Fused Deposition Modeling) was used to extrude the PLA filament in a hot end (~200 ºC), being further deposited over a hot table (~60 ºC). Extruder and hot bed are moved by stepper motors, following Cartesian coordinates, to build the device. With this method, the printer (Figure 1) setup the piece in a layer-by-layer process. The microchannel dimensions were 600μm height, 1800μm width and 1.8cm length (Figure 2).

In order to show the laminar flow, we printed a three inlets microchannel and pumped red and green water solutions using a syringe pump (New Era pump). We observed the flux with an USB microscope (Dino-Lite), and took pictures to analyze it. Once that the fluids were red and green, we could easily split the RGB channels of the picture, and could analyze its intensity profile.

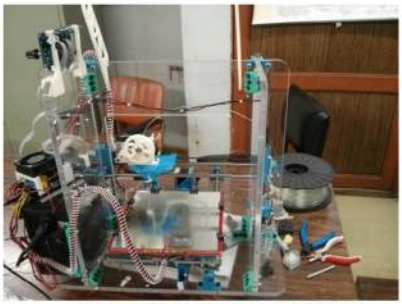


Figure 1: home-made 3D printing set-up

Results and Discussion: Figure 2 presents a picture of the microchannel with three inlets and the corresponding RGB intensity profile, which was taken transversal to the flux. One can clearly see that it has three well-defined regions. Also, it presents a superposition of the fluids at the interfaces, which occurs in a short distance when compared with the microchannel length.

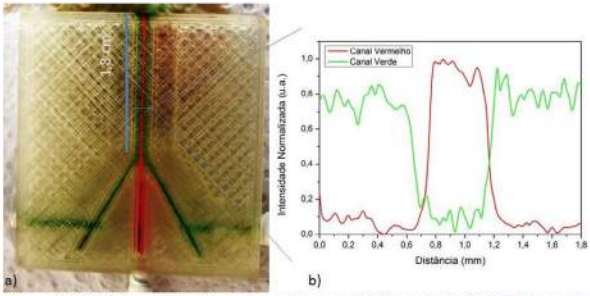


Figure 2: (a) Picture of the microchannel device with three inlets. (b) RGB intensity profile taken transversal to the flow.

Due the versatility of this new technique we have a lot of features to explore. We are now interested to break the laminar flow to mixture the fluids. We are also trying to eliminate the pump by adding paper in the microchannel to draw the fluid into it. Finally, we intend to improve the printer resolution, in order to print microdevices in a scale of tenth of microns which is the PDMS resolution; it worth mention that our current resolution is about half of millimeter.

Conclusion: Microchannels 3D printed in PLA in a one-step fabrication process were easily assembled in different architectures maintaining laminar flow for quite a long distance. Despite the elimination of leakage problem this integration also offer the advantage of low price, flexibility to change design and fast prototyping within minutes, being cheap alternative to PDMS in some applications.

References:

[1] E. Canessa, C. Fonda, M. Zennaro, *Low-Cost 3D printing for science education and sustainable development*. ICTP, c2013. 202 p., il. ISBN 9295003489.

Acknowledgments: Authors are grateful to FAPESP, CNPq and FAEPEX for financial grants.

Physicochemical, structural and biological evaluation of microfluidic-assembled lipoplexes for gene delivery

Tiago A. Balbino, Juliana M. Serafin, Antônio A. M. Gasperini, Cristiano L. P. Oliveira, Leide P. Cavalcanti, Marcelo B. de Jesus, Lucimara G. de La Torre

tiagoab@feq.unicamp.br; jmtserafin@gmail.com; antonio.am.gasperini@gmail.com; crislpo@if.usp.br; leide.cavalcanti@gmail.com; dejesusmb@gmail.com; latorre@feq.unicamp.br;

Abstract: *In this work, we studied the assembly of lipoplexes for gene therapy applications employing a hydrodynamic flow-focusing microfluidic device. Mesoscopic and biological properties of lipoplexes were evaluated as a function of the DNA content, using the conventional bulk mixing process (BM) as comparison. At high DNA-loading conditions, lipoplexes obtained by the microfluidic process exhibited lower particle size and polydispersity index than those obtained by the BM process. Structural studies revealed that microfluidic-assembled lipoplexes presented a multilamellar phase with a lower number of stacked bilayers. These results coupled with in vitro studies showed that the lower transfection efficiency of BM lipoplexes is likely due to the high bilayers number, what impaired the DNA internalization and processing by cells. Thus, at high DNA-loading conditions, lipoplexes assembled in a microfluidic device exhibited enhanced biological efficacy. We believe this study contributes to the development of microfluidic processes of new pharmaceutical products for gene delivery.*

Palavras-Chaves*: nanoparticles; lipoplexes; DNA, ene delivery; microfluidics*

Introduction: DNA-based gene therapy relies upon the introduction of an engineered DNA to the nucleus of diseased cells, which in turn enables the expression of therapeutic proteins. As an example, gene delivery has been shown as an effective treatment of Leber congenital amaurosis, the most severe retinal dystrophy [1]. Among the nonviral nanocarriers used to accomplish the gene delivery, lipoplexes have long been explored. The conventional bulk mixing (BM) process to assemble lipoplexes comprises the mixing of the cationic liposome (CL) dispersion and the DNA solution by pipetting or vortexing. However, at low positive/negative molar charge ratios (R±), i.e. higher DNA content, lipoplexes tend to present large particle size and high polydispersity values. The electrostatic association between the macro-ions in the colloidal media can lead to a complete structural reorganization. Under certain conditions, BM processes may yield inconsistent and poorly reproducible results, likely due to its uncontrolled mixing characteristics. In this fashion, microfluidic devices have become a technological alternative to overcome these drawbacks [2]. In the present work, we investigated the assembly of lipoplexes using a hydrodynamic flow-focusing microfluidic device at high pDNA loading conditions. We evaluated the lipoplexes in terms of physicochemical and nanostructural properties in effort to elucidate their biological behavior.

Experimental: We used a hydrodynamic flow-focusing microfluidic device to produce lipoplexes at varying R±, and BM process as comparison. The device had microchannels with depth of 100 μm and width of 120 μm, constructed by soft lithography (PDMS bounded to glass). CL were prepared by thin film method and were composed of egg phosphatidylcholine (EPC), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) and 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) (2:1:1 molar). Lipoplexes were assembled via microfluidics by injecting the DNA solution in the central inlet channel that was hydrodynamically focused by the two CL dispersion side streams. The microfluidic device was placed over a Peltier thermoelectric system to keep temperature controlled at ~4 °C. The average hydrodynamic diameter and size distribution were measured by dynamic light scattering (Malvern). The nanostructure of the lipoplexes was analyzed through small angle X-ray scattering (SAXS) according to Balbino et al [3]. The experiments were performed on a laboratory SAXS instrument Bruker-Nanostar, placed at the Institute of Physics of University of São Paulo. The *in vitro* gene delivery evaluation of lipoplexes was carried out on prostate cancer cell line PC3. Cells were transfected with EGFP-encoding pDNA and analyzed by measuring EGPF positive cells by flow cytometry.

Results and Discussion: To rationally design a gene delivery systems, it is crucial the identification of the best R± conditions. Thus, we first investigated the number-weighted particle size, polydispersity index and zeta potential of lipoplexes as a function of R±. Lipoplexes assembled by both processes presented greatest sizes and highest PdI values at high DNA-loading, R± 1.5. At such conditions, lipoplexes obtained by BM were highly

polydispersed and thus not suitable for proper DLS analysis. Zeta potential values decreased with decreasing R±, which was more evident for the microfluidics lipoplexes.

SAXS experiments were performed to evaluate the structural conformation of lipoplexes assembled by microfluidic and BM process. Based on the electronic density profiles, the model used to analyze the data assumed the form factor of pure CL and that the number of correlated bilayers varying according to the Caillé parameter. At R± 1.5, lipoplexes prepared by the microfluidic process exhibited a higher number of correlated bilayers than those prepared by the BM process. In the proposed structure, the negatively-charged DNA is sandwiched by two positively-charged stacked bilayers.

The *in vitro* results of gene delivery efficacy on cells showed that mixing processes present similar transfection efficiencies at same R± conditions, except at 1.5. Surprisingly, at higher pDNA loading, the transfection efficiency increased with the microfluidic-obtained lipoplexes, while it was reduced with the bulk mixing-obtained lipoplexes. This corroborates previous physicochemical studies, in which microfluidic-assembled lipoplexes exhibited more convenient size and zeta potential properties for gene delivery applications.

Conclusion: In this work, hydrodynamic flow-focusing microfluidic device produced lipoplexes with increased transfection efficiency than lipoplexes obtained by the conventional bulk mixing process at high pDNA loading conditions. At such conditions, particle size, polydispersity index, nanostructure and biological efficacy of microfluidic lipoplexes were significantly different. We believe that the results presented herein can contribute to the development of microfluidic processes for lipoplex assembly and to a better understanding of mesoscopic properties correlation with *in vitro* biological behavior.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge the Microfabrication Laboratory of the Brazilian Nanotechnology National Laboratory (LNNano). This work was financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de SP (FAPESP), Brazil.

References:

[1] Simonelli et al., Molecular Therapy **18**, 643 (2010)
[2] Koh et al., Journal of Controlled Release **141**, 62 (2010)
[3] Balbino et al., Langmuir **28**, 11535 (2012).

Dispositivo microfluídico gerador de gradiente difusivo para avaliação de comportamento celular microbiano

Aline Furtado Oliveira, Carlos Lenz Cesar, Reinaldo Gaspar Bastos, Lucimara Gaziola de la Torre

alinefurtado@feq.unicamp.br, lenz@ifi.unicamp.br, reinaldo@cca.ufscar.br, latorre@feq.unicamp.br

Resumo: *Este trabalho visou o desenvolvimento de um dispositivo microfluídico capaz de gerar gradiente de concentração difusivo e linear e avaliar sua aplicabilidade em bioprocessos. A microfluídica opera em microlitros e é capaz de gerar gradiente difusivo nos microcanais. Sendo assim, a microfluídica apresenta um potencial para investigar as condições ideais para o crescimento microbiano. Para isso, foi proposto um dispositivo gerador de gradiente de concentração e avaliou-se o comportamento de Saccharomyces cereviasiae ATCC 7754 no intervalo de 0 e 3 g/L de glicose neste dispositivo. O dispositivo foi construído em base de vidro, contendo dois níveis: inferior, onde o gradiente difusivo e o crescimento celular ocorreram dentro de microcanais e; no nível superior, o fluxo de soluções com concentrações diferentes. O sistema foi operado numa vazão de 15 µl/min, ambiente anaeróbio e a 30 °C, observado por 10 h em microscópio confocal e obtidas imagens a cada 30 min. Ao longo do tempo, observou-se o crescimento celular nos microcanais e determinou-se parâmetros cinético de crescimento de Monod, que apresentaram resultados coerentes com a literaura. Portanto, este dispositivo é aplicável à determinação dos perfis ideias para o crescimento microbiano, de forma mais prática, e contribuirá para estudos em bioprocessos.*

Palavras-Chaves: *microfluídica, geração de gradiente difusivo, parâmetros cinéticos, bioprocessos.*

Introdução: A microfluídica é uma ciência que opera em pequenos volumes de fluídos dentro de microcanais, sendo possível obter resultados rápidos e reprodutíveis [1, 2]. As configurações de sistemas microfluídicos possibilitam uma vasta gama de dispositivos com diferentes aplicações. Além disso, o sistema microfluídico é capaz de mimetizar ambientes celulares e também de gerar gradientes de concentração, o que permite estudos que visam conhecer ou determinar os níveis de concentração de biomoléculas, fundamentais para o metabolismo celular [1, 3, 4]. Sendo assim, a microfluídica geradora de gradiente de concentração difusivo permite avaliar o desempenho celular microbiano frente a diferentes concentrações de substrato limitante [5], visando a otimização em bioprocessos, por meio da determinação de parâmetros cinéticos de modo mais prático quando comparado os experimentos convencionais. Diante disso, este trabalho visa a construção de sistema microfluídico gerador de gradiente difusivo, tendo microcanais em triplicata, para investigação do crescimento microbiano em diferentes concentrações de substrato limitante e a determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento de Monod.

Procedimento experimental:

Sistema com gradiente de concentração difusivo: foi proposto uma geometria que induz a formação de gradiente de concentração de difusivo num sistema em dois níveis: nível superior por onde escoam, em paralelo, duas correntes de soluções de concentrações de 0 e 3 g/L de glicose e que acessam o nível abaixo por portas de acesso laterais e, o nível inferior, onde ocorre o gradiente difusivo e crescimento celular. A composição de cada nível e as etapas de montagem está apresentada na Figura 1.

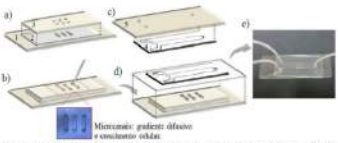


Figura 1: *Dispositivo em dois níveis: a) Inferior: lamínula de vidro lisa (1), PDMS laminado (2), lamínula de vidro com portas de acesso laterais (3), b) inoculação da suspensão de células dentro das microcâmaras (nível inferior), c) Superior: PDMS laminado em canal (4) aderido à lâmina superior com entradas e uma saída (5) e, d) Fechamento: adesão da parte superior com a inferior do dispositivo; e) dispositivo microfluídico montado. Os microcanais em PDMS laminado foram criadas por ablação em máquina de laser de* CO_2

Cultivo de *S. cerevesiae* em sistema microfluídico: A suspensão de *S. cerevesiae* ATCC 7754 (C_0~50 cel/µL) foi inserida nas microcâmaras (nível inferior) e, após a selagem do dispositivo, o gradiente de concentração foi induzido usando duas soluções de meio YPD, variando apenas a concentração de glicose (substrato limitante, 0 e 3 g/L). As soluções de meio foram injetadas por meio de bomba tipo seringa, numa vazão de 15 µL/min. O comportamento celular foi observado por meio de microscópio confocal ao longo de 10 h, com temperatura controlada a 30 °C e condição anaeróbia, sendo capturadas imagens a cada 30 min. O comportamento da *S. cerevisiae* foi identificado por meio de contagem direta das células através das imagens adquiridas. Para identificar a faixa de concentração de glicose onde as células se encontravam, foram feitas divisões virtuais em intervalos de 0,25 mm nas imagens das microcâmaras.

Determinação dos parâmetros cinéticos: foi determinado a cinética de crescimento conforme a Equação de Monod, a velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{máx}$) e a constante de saturação (k_s), a qual indica afinidade do micro-organismo pelo substrato (S), foram definidas de acordo com a Equação 1: $\mu = \frac{\mu_{máx} \cdot S}{K_S + S}$

Resultados e discussão: O dispositivo microfluídico proposto mostrou-se capaz de gerar um perfil de gradiente linear, indicando a formação de concentração difusivo [6], sendo promissor para o cultivo de células microbianas em diferentes concentrações de um determinado substrato limitante, como mostra a Figura 2.

Assim, foi possível avaliar o comportamento de crescimento microbiano e a determinação dos parâmetros cinéticos de Monod, uma vez que o gradiente de glicose é constante nos microcanais, possibilitando a determinação destes parâmetros não apenas nos tempos iniciais, como são feitos nos sistemas convencionais.

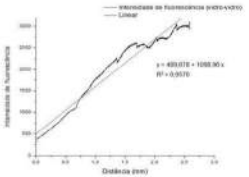


Figura 2: Perfil de gradiente linear que indica um gradiente difusivo. O gradiente foi observado usando solução de rodamina (0,1 mM) nos microcanais e soluções de concentrações diferentes de glicose

O perfil de crescimento microbiano no intervalo de concentração de 0 a 3 g/L de glicose apresentaram valores da constante de saturação (ks) e a taxa especifica de crescimento máximo (μ_{max}) de levedura de 0,32 ± 0,014 h^{-1} e 0,27 ± 0,045 g/L, respectivamente (Figura 3). Os resultados obtidos pelo dispositivo microfluídico foram coerentes com os dados reportados na literatura, em que foram relatados valores de ks entre 0,5 e 4,56 g/L e $\mu_{máx}$ 0,17 - 0,24 h^{-1} em sistemas de cultivo submerso [7, 8]. Assim, a determinação de parâmetros cinéticos a partir do dispositivo microfluidico foram obtidos de forma mais prática e num ambiente controlado para o cultivo microbiano. Desta forma, nota-se a viabilidade deste dispositivo microfluídico com formação de gradiente difusivo para investigar os parâmetros cinéticos do microrganismo e com isso contribuir na área de bioprocessos.

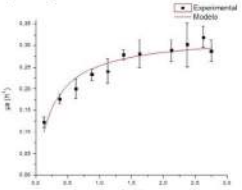


Figura 3: Dados experimentais (■) e modelo (linha contínua), obtida a partir de ajuste dos mínimos quadrados). Parâmetros cinéticos estimados para a cinética de crescimento celular para S. cerevisiae, descrito por Monod. Através deste gráfico obteve-se os valores para $\mu_{máx}$ = 0,32 ± 0,014 h^{-1} e K_s = 0,27 ± 0,045 g/L. As barras de erro para os dados experimentais indicam o erro padrão das triplicatas (N_0 = 64 cel/μL).

Conclusões: O dispositivo de microfluídico mostrou-se aplicável para o cultivo microbiano, tendo parâmetros cinéticos semelhantes ao cultivo convencional o que pode contribuir em bioprocessos. Ainda, este sistema microfluídico com geração de gradiente de concentração difusivo permitiu a determinação da cinética de Monod com valores coerentes aos da literatura, sendo que os resultados foram obtidos de forma mais prática quando comparados às técnicas convencionais. Diante disso, o dispositivo microfluídico proposto mostrou-se eficiente para determinação de parâmetros cinéticos e a viável para a otimização em bioprocessos.

Referências e agradecimentos:

1. Weibel, D. B., & Whitesides, G. M. (2006). Applications of microfluidics in chemical biology, 584–591. doi:10.1016/j.cbpa.2006.10.016
2. Whitesides, G. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, *442*(July 2006). doi:10.1038/nature05058
3. Ye, N., Qin, J., Shi, W., Liu, X., & Lin, B. (2007). Cell-based high content screening using an integrated microfluidic device. *Lab on a chip*, *7*(12), 1696–704. doi:10.1039/b711513j
4. D. Leonida, M., & Kumar, I. (2012). Microfluidics: from Engineering to Life Sciences. *Current Nanoscience*, *8*(3), 458–473. doi:10.2174/157341312800620151
5. Atencia, J., Morrow, J., & Locascio, L. E. (2009). The microfluidic palette: a diffusive gradient generator with spatio-temporal control. *Lab on a chip*, *9*(18), 2707–14. doi:10.1039/b902113b
6. Atencia, J., Cooksey, G. a, & Locascio, L. E. (2012). A robust diffusion-based gradient generator for dynamic cell assays. *Lab on a chip*, *12*(2), 309–16. doi:10.1039/c1lc20829b
7. Koren, D. W., & Duvnjak, Z. (1993). Kinetics of the Selective Fermentation of Glucose/Frutose Mixtures Using Saccharomyces cerevisiae ATCC 36859. *Acta Biotechnology*, *35*(4), 311–322.
8. Sonnleitner, B., & Käppeli, O. (1986). Growth of Saccharomyces cerevisiae is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnology and bioengineering*, *28*(6), 927–37. doi:10.1002/bit.260280620

Agradecimentos: Ao suporte financeiro do CNPq, à Faculdade de Engenharia Química/Unicamp, ao Laboratório de Microfabricação/CNPEM e ao Grupo de Eletroforese e Microssistemas de Análise (GEM) do Instituto de Química/Unicamp pelo suporte técnico para a construção dos dispositivos microfluídicos e também ao INFABIC do Instituto de Física/Unicamp, onde foram realizados os ensaios com aquisição de imagens.

Detecção de gliadina em alimentos através de dispositivo "língua eletrônica" microfluídica

Cristiane Margarete Daikuzono, Flávio Makoto Shimizu, Alexandra Manzoli, Maria Helena Piazzetta, Angelo Luiz Gobbi, Daniel Souza Corrêa, Antonio Riul Junior, Osvaldo N. Oliveira Jr.

daikuzonocm@gmail.com; flamakoto@yahoo.com.br; alexxiamanzoli@gmail.com, angelo.gobbi@lnnano.cnpem.br; maria.piazzetta@lnnano.cnpem.br; ariuljr@gmail.com; daniel.correa@embrapa.br; chu@ifsc.usp.br

Resumo: *Este trabalho visa à integração de línguas eletrônicas em dispositivos microfluídicos para detectar gliadina em alimentos. Os filmes finos para cada unidade sensorial foram depositados nos microcanais usando-se a técnica de automontagem (layer-by-layer, LbL) dinâmica [1], com bicamadas de ftalocianina tetrassulfonada de cobre (CuTsPc) e poli(cloridrato de alilamina) (PAH), bicamadas de poli(3,4-etilenodioxitiofeno):poli(estireno sulfonado) (PEDOT:PSS) e PAH, e bicamadas de polipirrol (PPy) e PAH. A adsorção de filme no substrato de ouro, assim como a adsorção de gliadina no filme, foi verificada com espectroscopia no infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS) e a distribuição do filme ao longo dos dígitos dos eletrodos de ouro foi observada por microscopia de força atômica (AFM). A espectroscopia no UV-vis foi utilizada para determinar a presença de gliadina nas soluções padrões preparadas com álcool etanol 70%, para que pudessem posteriormente ser analisadas através da espectroscopia de impedância. Usando análise de componentes principais (PCA), foi possível distinguir alimentos que continham ou não gliadina, ou aos quais gliadina foi introduzida.*

Palavras-Chaves*: automontagem (layer-by-layer), PM IRRAS, AFM, língua eletrônica, PCA e gliadina.*

Introdução: Um dispositivo de fácil manipulação para detecção de gliadina em alimentos é necessário para os portadores de doença celíaca, que é causada pela ingestão de glúten, mais especificamente a gliadina. Sintomas da doença incluem inflamação no intestino, perda de peso, diarreia, anemia, vômito, osteoporose, má absorção de vitaminas e distensão abdominal[2-3] . O tratamento para esta doença é a dieta sem glúten, donde surge a importância de um dispositivo prático e barato para detectar glúten em alimentos. Desenvolvemos um dispositivo do tipo "língua eletrônica" microfluídica capaz de detectar a gliadina em alimentos. O dispositivo é composto por 4 unidades sensoriais microfluídicas; em três sensores foram depositados filmes nanoestruturados de PAH/CuTsPc, PAH/PEDPOT:PSS, PAH/PPy, com a técnica de automontagem (*layer-by-layer)* dinâmica e um sensor sem filme foi utilizado como referência. Os filmes foram caracterizados por PM-IRRAS e AFM para verificar a presença e a distribuição de material nos microcanais. O PM-IRRAS foi usado também para verificar a adsorção de gliadina no filme. As soluções de gliadina foram analisadas com espectroscopia no UV-vis para verificar a presença de gliadina (280 nm) antes de serem estudadas por espectroscopia de impedância. Os dados de espectroscopia de impedância foram processados usando-se análise de componentes principais (PCA) e o software PEx-Sensors.

Procedimento experimental: Os filmes LbL foram depositados no interior do microcanal de PDMS em condição de fluxo com uma vazão de 10^3 µL/h. Os polieletrólitos foram injetados alternadamente no microcanal usando microsseringas Hamilton alocadas em uma bomba de seringa da marca *New Era pump systems*. Com um bisturi, o microcanal em PDMS foi removido da superfície do dispositivo e a superfície do eletrodo interdigitado analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), modelo JEOL 6510, para verificar a presença de filmes finos. A distribuição de material na superfície do eletrodo foi verificada através da microscopia de força atômica (AFM), modelo Dimension V (Veeco), utilizando pontas de silício anexadas a um microcantilever de constante de mola 5,6 $N.m^{-1}$ e frequência de ressonância de 180 kHz. As imagens foram geradas em modo de contacto intermitente (tapping™) com velocidade de varredura de 0,5 Hz. A espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS), modelo PMI 550, confirmou a adsorção de filmes na superfície de ouro e a adsorção de gliadina no filme. Para obter os espectros de cada filme, foi utilizado um modelo composto por um detector de HgCdTe, modelo PCI-3TE-10.6, uma lâmpada de carbeto de silício e um modulador fotoelástico de cristal de ZnSe.

As soluções padrões de gliadina e alimentos foram preparadas com álcool etanol 70% (v/v) e misturas em um Vortex por cerca de 15min. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e centrifugado na centrífuga, modelo Hanil – Continent R, por 10 min em 5000 rpm. As soluções de gliadina foram analisadas no espectrofotômetro Uv-vis, Uv-160 1PC-Shimadzu, para verificar a presença da gliadina em um comprimento de onda de 280 nm.

Para o arranjo de sensores da língua eletrônica foram usados chips com filmes de PAH/CuTsPc, PAH/PEDOT:PSS, PAH/PPy e outro sem filme. Foram analisadas soluções com diferentes concentrações de gliadina (0.005 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 227 ppm, 576 ppm, 776 ppm, 941 ppm e 1309 ppm) dissolvidas em álcool etanol 70% (v/v), alimentos com glúten (cerveja, Neston, torrada e bolacha salgada) e sem glúten (saque, Leite em pó Molico, leite em pó Ninho e cremogema). A técnica estatística de Análise de Componentes Principais (PCA), *software Smart*, e o software PEx-sensors foram utilizados para distinguir as diferentes soluções.

Resultados e discussão: As imagens de MEV confirmam a deposição de filmes finos ao longo da região do microcanal e sobre os eletrodos interdigitados de ouro. As imagens são de filmes aparentemente homogêneos, mas os resultados de AFM indicam maior acúmulo de material na borda do que no meio do filme. Além disso, observamos por PM-IRRAS a presença de filme sobre a superfície de ouro e a adsorção da gliadina nos filmes. Tendo confirmado a deposição de filme sobre os IDES, os dispositivos foram utilizados em análises de soluções padrões de gliadina, amostras com e sem glúten. A Figura 1 mostra clara distinção dos alimentos com e sem glúten.

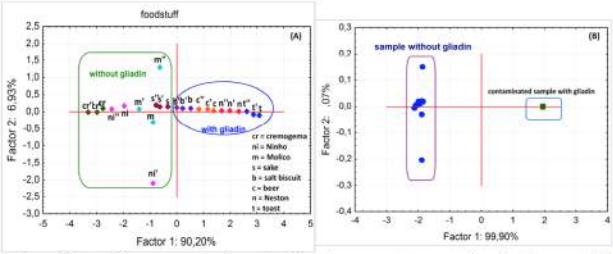


Figura 1 – PCA das análises feitas com amostras de alimentos com, sem e contaminados com gliadina.

Conclusões: Com as técnicas de caracterização empregadas, confirmamos a deposição dos filmes sobre os eletrodos de ouro, com material concentrado nas bordas, como era de esperar devido ao perfil de velocidade do líquido no interior do microcanal. Além disso, com PM-IRRAS observou-se que o filme não é removido com a passagem de solução de etanol 70% (v/v). Esta informação é importante para o desenvolvimento de sensores de glúten, pois as soluções de amostras reais serão preparadas em etanol 70% (v/v). Observamos que a gliadina adere bem ao filme, e portanto o dispositivo terá que ser descartável.

Referências

1. Kim, H.-J., Lee, K., Kumar, S. & Kim, J. Dynamic sequential layer-by-layer deposition method for fast and region-selective multilayer thin film fabrication. *Langmuir* **21,** 8532–8538 (2005).

2. Green, P. H. R. & Jabri, B. Celiac Disease. *Annu. Rev. Med.* **57,** 207–221 (2006).

3. Jenkins, H. R. Coeliac disease. *Curr. Paediatr.* **7,** 203–206 (1997).

Agradecimentos

CAPES, CNPq, FAPESP, INEO, nBioNet, CNPEM e EMBRAPA.

Fabrication and characterization of soft microcapsules with tunable elasticity

Wynter J. Duncanson[1], Jorge Avendaño[2,3], Débora F. do Nascimento[2], Márcio S. Carvalho[2]

1 - Nazarbayev University, 53 Kabanbay Batyr Avenue, Astana, Kazakhstan 010000

2 - PUC-Rio, Department of Mechanical Engineering, Rua Marques de São Vicente 225, Gávea, 22453-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

3 - Universidad de los Andes, FIRP Laboratory, Facultad de Ingeniería. Mérida, Venezuela

wynter.duncanson@nu.edu.kz, avengeorge@gmail.com, deboranuna@gmail.com, msc@puc-rio.br

Capsules with soft membranes are useful in different applications ranging from the flow of cells in the blood stream to the flow of smart dispersions in enhanced oil recovery and reservoir sensing. It is important to understand how these materials flow in a porous media and correlate the interface mechanical properties with the flow characteristics. The goal of this research is to fabricate soft capsules with tunable elasticity, and characterize their interfacial properties.

We use glass capillary microfluidics to prepare tunable monodisperse fluid-filled elastic microcapsules.

We manually construct glass capillary devices through the use of a glass slide, one square capillary, and two round capillaries, two blunt-tip syringe needles, two pieces of polyethylene tubing, and 5 minute all-purpose Devcon epoxy. We use epoxy to affix the square capillary with the square capillary; this piece serves as the base for further construction of the glass capillary device. One of the round capillaries is pulled to a taper by manually pulling the capillary following heat treatment with a butane torch. The tapered end is inserted into one side of the square of the base, while the flat blunt end of the other round capillary is inserted into the opposite end. The two round capillaries are carefully manually manipulated to achieve their coaxial alignment, and subsequently fixed in place with epoxy. One needle that serves as the fluid entry point is sealed to each intersection of the square and round capillary while tubing is fitted to each end of the capillary.

We use a double emulsion template to prepare the microcapsules wherein the innermost water phase is deionized water, the middle phase is a two-component PDMS base and cross-linker mixture, and the outer phase is a 10% polyvinyl alcohol (PVA) solution. The elasticity is simply tuned by varying the base:crosslinker from 10:1, to 20:1, where the former is stiffer and the latter is more flexible. The fluid flow rates are controlled through the use of a syringe pump. The droplet size is determined through a combination of variations in flow rates as well as device geometry. Droplet production is monitored using a Photron fast camera using acquisition speeds up to 1000 frames per second. The inner fluid flows through the tapered round capillary, while the middle phase co-flows with it in the space between the square and the round tapered capillary. The outer fluid flows in the space between the square capillary and the blunt-end round capillary to flow-focus the drops to enable droplet formation, as shown in the schematic in Figure 1. We collect the droplets in a PVA solution, and rotate them to ensure the center droplet and the outer droplet are concentric.

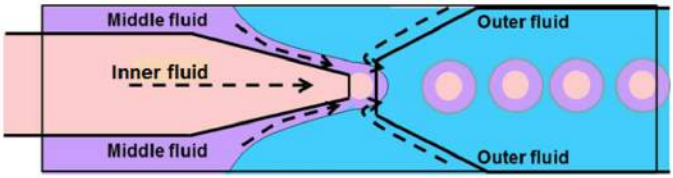


Figure 1 - Schematic illustration of the microfluidic droplet generation of bubbles stabilized by an unpolymerized PDMS shell at the orifice, which further downstream breaks into individual droplets.

We estimate the Elastic response of droplets by measuring the deformation when applying a uniform load, and drawing the correspondent force-displacement curve for each system. A comparison of relaxed droplets after full loading allows us to identify the elastic recovery of each system.

It is shown that the elastic properties of the droplets are directly related to the base:crosslinker ratio used in the formulation. Surprisingly, elasticity does not seem to be affected by the thickness of the oil phase in the range explored, even when the difference between these ratios is considerable (50μm and 150μm thickness for 500μm droplet diameter respectively), as shown in Figure 2.

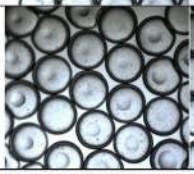
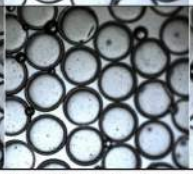
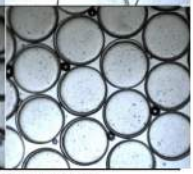
Parameters	Initial	Lower load	Higher load
Base to Cross-linker ratio: 20:1 OD:500μm ID:440 μm			
Base to Cross-linker ratio: 10:1 OD:500μm ID:460 μm			

Figure 2 - Images of fabricated droplets, and their deformation for different loads.

We have demonstrated the ability to controllably prepare tunable fluid-filled elastic microcapsules through the use of droplet microfluidics. The tunability and flexibility of the microcapsules enables their use in particle flow through confined geometries with applications including drug delivery, reservoir sensing and enhanced oil recovery.

Fabrication and characterization of soft microcapsules with tunable elasticity

Wynter J. Duncanson[1], Jorge Avendaño[2,3], Débora F. do Nascimento[2], Márcio S. Carvalho[2]

1 - Nazarbayev University, 53 Kabanbay Batyr Avenue, Astana, Kazakhstan 010000

2 - PUC-Rio, Department of Mechanical Engineering, Rua Marques de São Vicente 225, Gávea, 22453-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

3 - Universidad de los Andes, FIRP Laboratory, Facultad de Ingeniería. Mérida, Venezuela

wynter.duncanson@nu.edu.kz, avengeorge@gmail.com, deboranuna@gmail.com, msc@puc-rio.br

Capsules with soft membranes are useful in different applications ranging from the flow of cells in the blood stream to the flow of smart dispersions in enhanced oil recovery and reservoir sensing. It is important to understand how these materials flow in a porous media and correlate the interface mechanical properties with the flow characteristics. The goal of this research is to fabricate soft capsules with tunable elasticity, and characterize their interfacial properties.

We use glass capillary microfluidics to prepare tunable monodisperse fluid-filled elastic microcapsules.

We manually construct glass capillary devices through the use of a glass slide, one square capillary, and two round capillaries, two blunt-tip syringe needles, two pieces of polyethylene tubing, and 5 minute all-purpose Devcon epoxy. We use epoxy to affix the square capillary with the square capillary; this piece serves as the base for further construction of the glass capillary device. One of the round capillaries is pulled to a taper by manually pulling the capillary following heat treatment with a butane torch. The tapered end is inserted into one side of the square of the base, while the flat blunt end of the other round capillary is inserted into the opposite end. The two round capillaries are carefully manually manipulated to achieve their coaxial alignment, and subsequently fixed in place with epoxy. One needle that serves as the fluid entry point is sealed to each intersection of the square and round capillary while tubing is fitted to each end of the capillary.

We use a double emulsion template to prepare the microcapsules wherein the innermost water phase is deionized water, the middle phase is a two-component PDMS base and cross-linker mixture, and the outer phase is a 10% polyvinyl alcohol (PVA) solution. The elasticity is simply tuned by varying the base:crosslinker from 10:1, to 20:1, where the former is stiffer and the latter is more flexible. The fluid flow rates are controlled through the use of a syringe pump. The droplet size is determined through a combination of variations in flow rates as well as device geometry. Droplet production is monitored using a Photron fast camera using acquisition speeds up to 1000 frames per second. The inner fluid flows through the tapered round capillary, while the middle phase co-flows with it in the space between the square and the round tapered capillary. The outer fluid flows in the space between the square capillary and the blunt-end round capillary to flow-focus the drops to enable droplet formation, as shown in the schematic in Figure 1. We collect the droplets in a PVA solution, and rotate them to ensure the center droplet and the outer droplet are concentric.

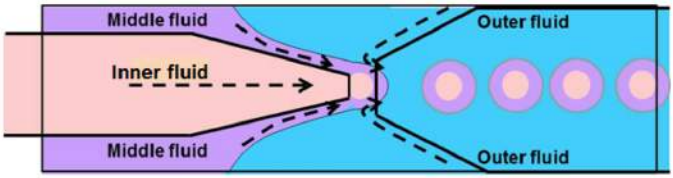


Figure 1 - Schematic illustration of the microfluidic droplet generation of bubbles stabilized by an unpolymerized PDMS shell at the orifice, which further downstream breaks into individual droplets.

We estimate the Elastic response of droplets by measuring the deformation when applying a uniform load, and drawing the correspondent force-displacement curve for each system. A comparison of relaxed droplets after full loading allows us to identify the elastic recovery of each system.

It is shown that the elastic properties of the droplets are directly related to the base:crosslinker ratio used in the formulation. Surprisingly, elasticity does not seem to be affected by the thickness of the oil phase in the range explored, even when the difference between these ratios is considerable (50μm and 150μm thickness for 500μm droplet diameter respectively), as shown in Figure 2.

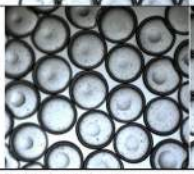
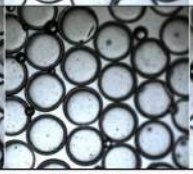
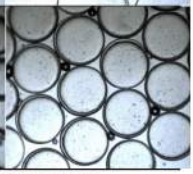
Parameters	Initial	Lower load	Higher load
Base to Cross-linker ratio: 20:1 OD:500μm ID:440 μm			
Base to Cross-linker ratio: 10:1 OD:500μm ID:460 μm			

Figure 2 - Images of fabricated droplets, and their deformation for different loads.

We have demonstrated the ability to controllably prepare tunable fluid-filled elastic microcapsules through the use of droplet microfluidics. The tunability and flexibility of the microcapsules enables their use in particle flow through confined geometries with applications including drug delivery, reservoir sensing and enhanced oil recovery.

Estudo da geometria de eletrodos planares para aplicação em sensores químicos

Luiz Eduardo Bento Ribeiro e Fabiano Fruett
Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação - Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
luizebr@dsif.fee.unicamp.br; fabiano@dsif.fee.unicamp.br

Resumo: *Um estudo comparativo entre eletrodos interdigitados (IDE) convencionais, eletrodos em forma de serpentina (SRE) e eletrodos em forma de anel (RSE) foi realizado neste trabalho. Os valores de capacitância encontrados na simulação de elementos finitos mostraram que os eletrodos em forma de anel possuem uma maior relação de capacitância por unidade de área, indicando que são mais sensíveis quando utilizados como sensor capacitivo. Além disso, os eletrodos em forma de anel são mais adequados a processos que necessitam de gotejamento, já que aproveitam melhor a distribuição da gota. Os três tipos de eletrodos, fabricados com filme fino de titânio e ouro em substrato de vidro, foram caracterizados eletricamente mostrando resultados compatíveis com os resultados de simulação.*

Palavras-chave: *eletrodo; interdigitado; serpentina; anel; sensor capacitivo.*

I. Introdução – Os eletrodos interdigitados possuem características interessantes, tais como a detecção de vários efeitos físicos na mesma estrutura, modelagem em duas dimensões, além de poder trabalhar em várias frequências para extração de parâmetros físicos e químicos de líquidos e gases [1]. Como transdutor capacitivo os IDE são aplicados em sensores químicos e de umidade [2], em espectroscopia de impedância [3], no estudos de filmes dielétricos [4] e em dispositivos sintonizáveis [5]. Além disso, podem ser fabricados utilizando substratos inertes com diferentes processos de fabricação compatíveis com a microfluídica. Neste trabalho, estudamos diferentes geometrias de eletrodos com objetivo de maximizar a capacitância por área metalizada. Podemos, assim, melhorar a sensibilidade sem aumentar as dimensões ocupadas pelo sensor. Nós comparamos o IDE convencional, o SRE e o RSE para descobrir quais são os parâmetros geométricos de maior influência sobre a capacitância total. Por fim, caracterizamos os três tipos de eletrodos fabricados para comparar os resultados experimentais com a análise teórica. A micrografia dos eletrodos fabricados é mostrada na "figura 1".

II. Procedimento Experimental - Nós simulamos as estruturas capacitivas do IDE, SRE e RSE com a mesma área, mesmo substrato e com a mesma espessura de filme metálico, calculando e comparando a capacitância de cada estrutura utilizando os simulador *COMSOL Multiphysics* (*Comsol Inc*., Suécia). Este software tem sido utilizado na literatura para calcular a distribuição do campo de potencial elétrico com base em equações diferenciais parciais e no método de elementos finitos. A "figura 2" mostra o corte em 3D da distribuição de potencial elétrico em torno do RSE com 20 dígitos. Os principais parâmetros geométricos analisados foram o comprimento de cada eletrodo, o espaçamento entre dígitos, a sua largura (sempre mantido com o mesmo valor do espaçamento), a espessura e o número de eletrodos. As estruturas para cada tipo de eletrodo foram fabricadas com três distâncias entre dígitos (10um, 20um e 50um), porém o número de eletrodos e a espessura do filme fino de metal foi mantido constante.

III. Resultados e Conclusões - Em todas as comparações o RSE apresentou um valor de capacitância superior. Os resultados mostraram também uma inclinação de 161.1fF para cada micrometro adicionado à largura dos eletrodos no RSE, uma inclinação de 160.7fF/μm para o SRE e 159.3fF/μm para o IDE. Nos resultados experimentais também verificou-se a diferença de capacitância entre as três estruturas com mesma área. Além disso, o RSE apresenta uma geometria que permite o melhor uso da sua área quando usado como sensor na aplicação que envolve o gotejamento de substâncias sob análise ou gotejamento de substâncias sensíveis como a zeólita.

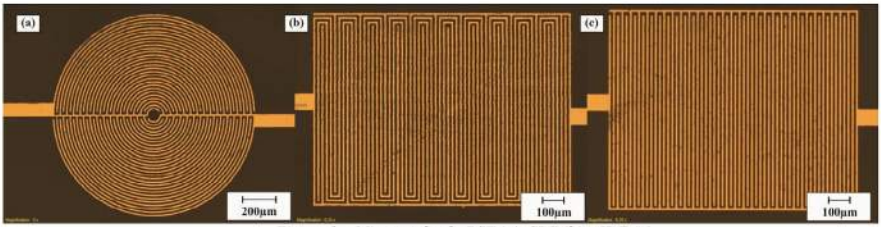


Figura 1 – Micrografia do RSE (a), SRE (b) e IDE (c).

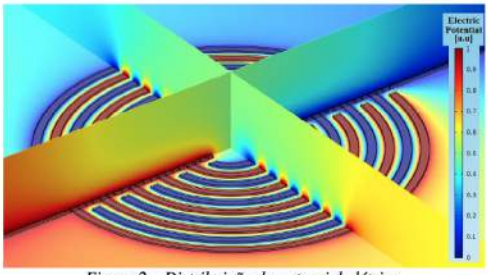


Figura 2 – Distribuição do potencial elétrico.

IV. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Componentes Semicondutores (CCS), ao Laboratório Multiusuário do IFGW (LAMULT) e ao Laboratório de Microfabricação do LNLS. O suporte financeiro para essa pesquisa foi cedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo através do projeto d Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Sistemas Micro e Nanoeletrônicos (INCT NAMITEC).

V. Referências

[1] A. Rivadeneyra, J. Fernández-Salmerón, J. Banqueri, J. A. López-Villanueva, L. F. Capitan-Vallvey, and A. J. Palma, "A novel electrode structure compared with interdigitated electrodes as capacitive sensor," Sensors and Actuators B: Chemical, vol. 204, 2014, pp. 552-560.

[2] Y. Kim, B. Jung, H. Lee, H. Kim, K. Lee, and H. Park, "Capacitive humidity sensor design based on anodic aluminum oxide," Sensors and Actuators B: Chemical, vol 141, n. 2, 2009, pp. 441-446.

[3] E. J. D. Chiappetta Filho, L. E. B. Ribeiro, and F. Fruett, "Full Design of an Electrochemical Impedance Spectroscopy Sensor." Workshop on Circuits and Systems, 2013.

[4] Z. Chen, A. Sepúlveda, M. D. Ediger, and R. Richert, "Dielectric spectroscopy of thin films by dual-channel impedance measurements on differential interdigitated electrode arrays," The European Physical Journal B-Condensed Matter and Complex Systems, vol. 85, n.8, 2012, pp. 1-5.

[5] M. W. Kim, Y. H. Song, and J. B. Yoon, "Modeling, fabrication and demonstration of a rib-type cantilever switch with an extended gate electrode," Journal of Micromechanics and Microengineering, vol. 21, 2011, 115009.

[6] L. E. B. Ribeiro, M. H. Piazzetta, J. S.Costa, A. L. Gobbi, F. Fruett, "Fabrication and Characterization of an Impedance Micro-Bridge for Lab-on-a-Chip," (2010), v. 31, pp. 155-163.

Desenvolvimento de plataforma analítica integrando separação por difusão gasosa e eletrodo de $Ni(OH)_2$ para a determinação de etanol em amostras de vinhos de cana-de-açúcar.

Gabriela F. Giordano, Luis Carlos S. Vieira, Angelo L. Gobbi, Renato S. Lima, Lauro T. Kubota.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver uma plataforma analítica para a determinação de etanol em amostras de vinhos de cana-de-açúcar. O sistema integrou a separação por difusão gasosa e a detecção voltamétrica em um único módulo. O detector consistiu em um eletrodo modificado com $Ni(OH)_2$, o qual teve sua estrutura estabilizada pela incorporação de Co^{2+} e Cd^{2+} como mostrado nos resultados obtidos por XPS. A etapa de separação por difusão gasosa envolveu a utilização de membrana hidrofóbica de PTFE que separou a solução de etanol (padrão ou amostra) de uma solução receptora de NaOH 100,0 mmol L^{-1} (eletrólito) onde o sistema eletroquímico foi acoplado. O vapor de etanol recolhido na solução de NaOH foi determinado utilizando o eletrodo de trabalho desenvolvido no intervalo de 2,0 a 20,0% v/v etanol em água. A concentração de etanol foi determinada em amostras de vinho de cana-de-açúcar por interpolação em curva analítica preparada em meio salino. Esse meio simulou a condutividade das amostras visando a eliminar o efeito tonométrico (redução do vapor de etanol pelos sais presentes nas amostras). Os resultados obtidos foram estatisticamente concordantes com aqueles registrados por FTIR considerando um nível de confiança de 95%.

Palavras-chave: *Eletrodo de $Ni(OH)_2$, separação por difusão gasosa, etanol, XPS, point-of-use.*

INTRODUÇÃO

O etanol é o biocombustível mais produzido no mundo, com cerca de 93 bilhões de litros produzidos em 2014. O monitoramento do teor alcoólico é importante para a detecção e correção de não-conformidades durante o processo fermentativo, alem de garantir maiores rendimentos de produção.[1]

Vários métodos foram propostos para a determinação de etanol em vinhos de fermentação, tais como densitometria, cromatografias e espectroscopias. No entanto, o desenvolvimento de plataformas *point-of-use* que possibilitem a realização dos ensaios *in situ* ainda é necessário. Detectores eletroquímicos são alternativas promissoras para a construção desses sistemas, incluindo eletrodos baseados nos compostos $Ni(OH)_2$/NiOOH os quais possuem baixo custo e alta atividade catalítica na oxidação de álcoois.[2] Logo, tal material não é seletivo a etanol. Um método simples e compatível com análises *point-of-use* de fornecer seletividade ao sistema é a separação por difusão em fase gasosa. Essa técnica consiste na separação de espécies voláteis de uma amostra para uma solução receptora através de uma membrana hidrofóbica.[3] Assim, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de uma plataforma que integre a sensibilidade dos eletrodos de $Ni(OH)_2$/NiOOH com a seletividade da difusão gasosa para a determinação de etanol em amostras de vinho de cana-de-açúcar.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O eletrodo de trabalho de níquel foi modificado com $Ni(OH)_2$, $Co(OH)_2$ e $Cd(OH)_2$ por deposição eletroquímica a partir de uma solução 10,0 mmol L^{-1} dos respectivos nitratos desses metais nas proporções molares de 77, 20 e 3%, respectivamente. A densidade de corrente catódica aplicada foi de -1,27 mA cm^{-2} durante 20 s. Utilizou-se eletrodos de referência de Ag/AgCl e auxiliar de fio de platina. A técnica de XPS foi empregada a fim de permitir determinações qualitativas e quantitativas sobre a composição química da superfície do eletrodo. O módulo de separação foi construído de PTFE e acoplado sobre um reservatório de vidro contendo a solução doadora de amostra. Dentro do módulo foram colocados a

solução receptora de NaOH, o sistema eletroquímico e a membrana hidrofóbica de PTFE que separou as duas soluções. A **Figura 1A** mostra uma foto da plataforma obtida. Vários parâmetros foram avaliados, como volume das soluções, distância entre eletrodos e membrana, tempo de extração e agitação da solução receptora. Após a extração, efetuou-se voltametria cíclica e as correntes medidas no potencial de 0,600 V vs. Ag/AgCl foram utilizadas para construção da curva analítica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O $Ni(OH)_2$ pode ser encontrado em duas fases estruturais distintas, α e β. A atividade eletrocatalítica dessa espécie é maior quando se encontra na fase α, que apresenta estrutura aberta e desordenada. Uma das estratégias descrita na literatura para estabilizar essa estrutura consiste na utilização de outros íons metálicos como aditivos na eletrodeposição de $Ni(OH)_2$, tais como Co^{2+} e Cd^{2+}. Os dados de XPS, ilustrados na **Figura 1B**, confirmaram a modificação do eletrodo de trabalho pelos metais Ni, Co e Cd. Suas proporções atômicas relativas foram 65,32, 32,84 e 1,83%, respectivamente.

As amostras foram analisadas por interpolação em curva analítica obtida em meio salino (0,810 g L^{-1} de Na_2SO_4) com condutividade similar à das amostras (1,22 mS cm^{-1}). Essa curva e os respectivos voltamogramas seguem apresentados na **Figura 1C**. Esse procedimento foi realizado para evitar o efeito tonométrico das amostras na determinação do etanol e permitirdeterminações exatas nas amostras. As concentrações de analito obtidas foram de acordo com a técnica de FTIR para um nível de confiança de 95%.

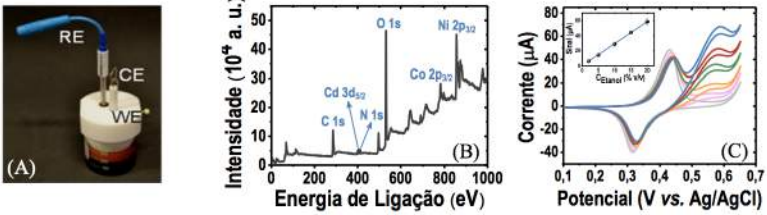


Figura 1 A. Plataforma analítica desenvolvida. **B.** Espectro exploratório obtido por XPS. **C.**Voltamogramas cíclicos obtidos após a extração de etanol a partir de soluções salinas da solução receptora (NaOH 100,0 mmol L^{-1}). Inserção: Curva analítica obtida em 0,600 V *vs*. Ag/AgCl.

CONCLUSÃO

Uma plataforma analítica integrada foi desenvolvida para a determinação point-of-use de etanol em amostras de vinho de cana-de-açúcar. As análises por XPS mostraram a modificação do eletrodo de trabalho com $Ni(OH)_2$ dopado com Co^{2+}e Cd^{2+}. Apesar da alta complexidade das amostras, a plataforma permitiu determinações exatas mediante o emprego de eletrólitos salinos para construção da curva analítica.

REFERÊNCIAS

[1] G. F. Giordano, L. C. S. Vieira, A. L. Gobbi, R. S. Lima, L. T. Kubota, Anal. Chim. Acta, **875**, 33, (2015).
[2] M. Vidotti, S. I. C. Torresi, L. T. Kubota, Sensor. Actuat. B-Chem., **135**, 245, (2008).
[3] C. R. Silva, T. F. Gomes, V. A. F. Barros, E. A. G. Zagatto, Talanta, **113**, 118, (2013).

AGRADECIMENTOS

Ao LNNano pelo auxílio financeiro. E ao CTBE pelo fornecimento das amostras.

gabriela.giordano@lnnano.cnpem.br

SENSOR CALORIMÉTRICO PARA MEDIÇÃO DE VAZÃO EM SISTEMAS MICROFLUÍDICOS.

Guilherme Augusto Dalri , Cyro Ketzer Saul
Universidade Federal do Paraná, Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais

Resumo: *Existem diversas formas para determinar a vazão em sistemas microfluídicos, uma para cada grandeza física envolvida. Os sensores calorimétricos são baseados em princípios térmicos e podem ser desenvolvidos empregando tecnologia de sistemas microeletromecânicos (MEMS). O presente trabalho visa desenvolver um sensor calorimétrico a partir de materiais e técnicas pouco convencionais, capaz de realizar medidas de vazão em sistemas microfluídicos. Seu principal material estrutural é um adesivo transferível para laminação mesclado com película de polipropileno, o elemento aquecedor é um fio de Níquel-Cromo com 56µm de diâmetro e sensor de temperatura um termopar de 13µm de diâmetro. Os resultados experimentais obtidos foram confrontados com resultados provenientes de simulação numérica que demonstrando excelente correlação.*
Palavras-Chaves: *sensor calorimétrico; vazão; adesivo transferível; microfluídica.*

Introdução

A necessidade de determinação da vazão em sistemas fluídicos é de fundamental importância para o controle destes sistemas. Existem varias formas de se determinar a vazão tanto de forma direta quanto indireta. Um recurso para determinar a vazão de forma direta é monitorar o volume que escoa no tempo, o que pode ser obtido, por exemplo, pesando o fluido em intervalos de tempo determinados, entretanto este tipo de procedimento inviabiliza a geração de resultados em tempo real. Existem sensores no mercado funcionam de forma indireta, ou seja, avaliam outras grandezas físicas para determinar a vazão, tais como transferência de força, detecção óptica, capacitiva, diferença de pressão e através de princípios térmicos, entre outros. Ainda assim, para o mesmo princípio pode haver várias formas de determinar a vazão, como por exemplo, os sensores térmicos que podem empregar anemometria, tempo de voo e análise calorimétrica [1].

Neste trabalho desenvolvemos um sensor tipo calorimétrico para determinar vazão similar aos empregados em "*Mass Flow Controllers*", pois ele garante maior precisão em baixas vazões. Seu funcionamento básico consiste em medir a temperatura do líquido na entrada, submeter o líquido a um aquecimento com potência conhecida e posteriormente medir sua temperatura na saída. O dispositivo foi desenvolvido visando atender os seguintes requisitos: baixa potência, baixo custo e a possibilidade de acoplamento a dispositivos fluídicos do tipo "*Lab on Chip*" [1].

Procedimento experimental:

O principal material estruturante é a fita de adesivo transferível para laminação 3M-YR-9767, cuja composição é o acrílico contendo fibras de vidro, com espessura de 50 µm, filme de polipropileno, com 10 µm de espessura, que limita as camadas adesivas **Figura 1 (a)**, o poliestireno expandido para isolamento térmico e chapas de acrílico para rigidez mecânica. O aquecedor consiste de uma resistência de Níquel-Cromo com 56 µm de diâmetro em formato de espiral. Os sensores de temperatura são termopares com 13 µm de diâmetro da marca Omega mostrado na **Figura 1 (b)**. A aquisição de dados assim como o controle de potência na resistência é realizada empregando um microcontrolador Arduino Due.

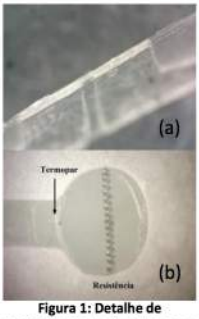


Figura 1: Detalhe de posicionamento do termopar e da resistência (a); Detalhe das camadas adesivas intercaladas com a película (b).

O dispositivo é composto por várias camadas de adesivo e de película que definem os microcanais de entrada e de saída, o microreservatório de aquecimento e espaços vazios para isolamento térmico. O reforço estrutural e isolamento térmico consistem de camadas de acrílico e poliestireno expandido respectivamente, e conforme mostrado na **Figura 2**. A fabricação das camadas foi efetuada utilizando um plotter de recorte Silhuette Portrait e uma fresadora a laser de CO_2 Gravograph LS-100, sendo o adesivo é cortado no plotter e o restante dos materiais na fresadora laser.

O aquecedor foi fabricado de forma manual, enrolando o fio de Níquel-Cromo entorno do próprio fio, a resistência formada é no formato de espiral. Os termopares foram adaptados a uma extensão feita por fio de mesma composição com diâmetro de 170 µm.

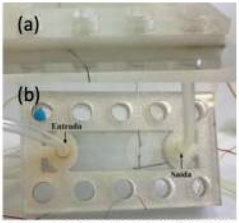


Figura 2: Sensor calorimétrico (b) destaque as camadas do dispositivo (a).

Para verificar o funcionamento do dispositivo foi induzida uma vazão conhecida de água bidestilada usando a bomba da Harvard Apparatus 11 plus. A simulação foi desenvolvida empregando análise energética através da função fundamental da calorimetria, diferenciando em relação ao tempo e resultando na equação (1), a qual foi resolvida pelo método de Euler, em Fortran. Para simulação foram feitas as seguintes considerações: o sistema foi reduzido a um volume de controle e considerou-se a incompressibilidade da água. Portanto, a vazão de entrada e de saída são as mesmas e a massa de água no interior permanece constante. A equação (1) é dada por

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \{\dot{Q}_R + UA_L(T_0 - T) + \dot{m}c_p(T_0 - T)\}\frac{1}{mc_p}, \qquad (1)$$

onde T é a temperatura, T_0 é a temperatura ambiente, $\dot{Q}_R$ é a potência dissipada na resistência, U é o coeficiente global de perda térmica, A_L é a área lateral do volume de controle, c_p é o color específico do fluído, $\dot{m}$ é a vazão e m é a massa de fluído interior do volume de controle.

A comparação dos resultados experimentais com os da simulação permitiu determinar um dos principais parâmetros do dispositivo, que é o coeficiente global de transferência térmica, que depende fortemente das características do escoamento e da geometria.

Resultados e discussão:

O dispositivo foi submetido a testes com diversas vazões e potências visando testar os limites de detecção de vazão, de resistência mecânica e de temperatura de operação. O adesivo garantiu a vedação do sistema e a adesão entre as camadas, mas apresentou vazamento para vazões superiores a 1000μL/min devido às altas pressões envolvidas. A **Tabela 1** mostra a faixa de vazão detectável e potência média utilizada. A menor vazão foi definida pela maior temperatura de operação que ficou entorno de 50°C, e a melhor temperatura de operação ficou entorno de 10°C acima da temperatura ambiente.

Tabela 1: Potência e faixa de vazão detectável com no máximo 10% de incerteza.

Potência (mW)	Vazão Máxima (μL/min.)	Vazão Mínima (μL/min.)
500	1200 ± 120	120 ± 12
100	900 ± 70	10 ± 1
50	120 ± 15	3 ± 0,3
10	60 ± 7	1 ± 0,1

Na **Figura 3** encontram-se os resultados para simulação e o resultado experimental em um teste que foi para avaliar o tempo de resposta do sistema. O protótipo utilizado apresentou coeficiente térmico global de $175\ W/m^{2o}C$.

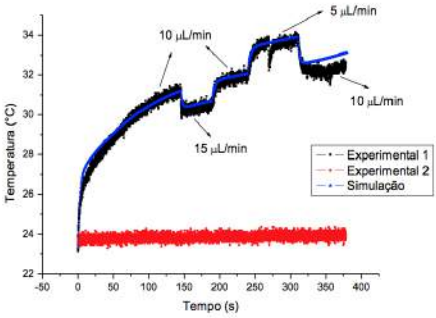


Figura 3: Gráfico dos dados da simulação numérica, Experimental 1 e Experimental 2 são respectivamente após e antes do aquecimento.

Conclusões:

Os resultados obtidos mostraram que o sensor é capaz de determinar vazões com incerteza na faixa de 10%, seu isolamento térmico é suficiente para garantir a operação da proposta apresentada, o termopar apresenta tempo de resposta inferior a reposta do sistema atendendo aos requisitos do projeto e finalmente o uso da plataforma Arduino Due possibilita o controle e coleta de dados em tempo real.

Referências:

[1] KUO, J. T. W.; YU, L.; MENG, E. Micromachined Thermal Flow Sensors—A Review, **Micromachines**, v. 3, p. 550-573, 2012.

Agradecimentos: Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro e ao IBMP pela infraestrutura.

guilhermedalri@ufpr.br

Microfluidics and Computational Fluid Dynamics for double emulsions

Juan Cervantes*, Juliana Schianti, Adriano Alencar

jriveroc@if.usp.br

Resumo:

From some years ago, microfludics with manipulation of fluids at the order of some picoliters and consequently the use of minimum of reactant and therefore relative low cost of chemical reactants and analytes has been emerged as a distinct new area. Multiple applications trhough microchannels in different materials from certains elastomers like PDMS, acrylic until uPADs - microfluidics paper analytical devices as well as mechanisms of micropumps has been developed and lead traditional expensive experiments into simple chips. Alternatively volume finite methods (VFM) has provided along last years the computational support for analysis and comparison of results. This work tries to get simple and multiple emulsion by low cost tools in hardware and software level for controlling fluids and obtaining results for analysis. We expect in the short period to get multiple emulsions.

Palavras-Chaves*: APTES; OpenFoam; Arduino.*

Introdução:

In this work we focus in the generation of simple emulsions and illustrate the method for reaching multiple emulsions over microfludics by a technique of modifying the wettability of microcanal walls [1,2] and by using an open source hardware Arduino [3] for pumping fluids on polydimethylsiloxane (PDMS) materials and parallelly we show a open source computational method based on OpenFoam [4] by using a suitable method for suitable multiphase mixture at the macroscale at the present stage.

Procedimento experimental:

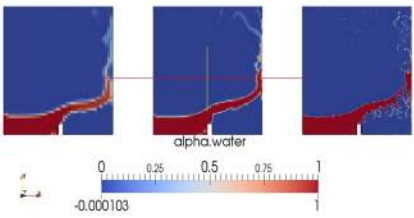
The microfabrication is performed by a known method called soft-lithography where a thin film of SU-8 is exposed to UV-light for the polymerization initiation. Once the master mold is obtained, we prepare the microdevices by pouring the known elastomer PDMS over the relieves of the mold.

To change the wettability of the internal walls we expect to make a chemical treatment of the surface which consists in exposing the walls to plasma oxygen before the sealing for hydrolization.

By using a chemical compound, aminopropyl (3-Aminopropyl)triethoxysilane, knwon as APTES, to take advantage of its functional groups we will attch it to the hydroxide terminals. Note that the APTES has an amino terminal in the other end.

Resultados e discussão:

We demonstrate the eficacy of getting simple emulsion by using open source hardware and software; arduino and OpenFoam. We are in the process of getting results for double emulsions.



Conclusões:

We have modify the surface of PDMS at the macroscale, now we are verifying if that is corresponding at the micrometer size.

Finally we are using a computational fluid method based for performing simulation using a parallelization path for rapid processes and getting better results in resolution as accuracy. Here in the figure a simulation in DualCore processer.

Referências e agradecimentos:

[1] NAE YOON LEE, Novel Poly(dimethylsiloxane) bonding strategy via room temperature 'chemical gluing', Langmuir, 2009.

[2] ADAM R. ABATE, Patterning microfluidic device wettability using flow confinement, Lab on a Chip, 2010.

[3] <http://www.arduino.cc/>

[4] <http://www.openfoam.com/>

Thanks to our scientific partners, to FAPESP and to our donor CAPES for support and my scholarship in Master's Degree level. A special thanks to CNPEM - LMF for provided me the tools for microfabrication and for its support in final experiments.

Aplicações de sensores CMOS e CCD para medidas de reações químicas colorimétricas.

Juliano Passaretti Filho, Arnaldo Alves Cardoso

juliano.passaretti@gmail.com, acardoso@iq.unesp.br

Resumo: *O uso de sensores CCD e CMOS contidos em dispositivos simples como webcams e scanners podem ser usados para acompanhar e medir reações químicas que envolvem a formação ou degradação de substâncias cromóforas. Neste trabalho foram realizados ensaios de determinação de nitrito, ozônio residual e fosforo total inorgânico utilizando sensores de webcam e scanner. O uso destes sensores que geram imagens digitais configura vantagens na miniaturização e redução de custo de ensaios colorimétricos.*

Palavras-Chaves: *Scanner ; Webcam ; Medidas colorimétricas*

Introdução: Métodos de detecção baseados na absorção ou reflexão de luz são muito comuns em análises de rotina em laboratório. Existem diversos equipamentos comercias para ensaios de reflectância e absorção de luz para compostos com cor. Em muitos casos, esses equipamentos podem ser adaptados para realizar medidas simples de laboratório. A universalização da computação facilitou a forma de adquirir e processar fotografias digitais e convergiu para utilização de sensores baseados em imagens para extrair informações químicas qualitativas e quantitativas[1]. Neste trabalho foi desenvolvido um modelo simples baseado no diagrama de cromaticidade[2] e no modelo grayscale[2] para quantificar e agrupar diferentes produtos com formação de corantes.

Procedimento experimental: Foram avaliados neste estudo dois tipos diferentes de sensores para aquisição de imagens: CMOS(webcam) e CCD(scanner). Estes sensores foram irradiados com feixes de luz monocromáticos entre 300 á 800 nm utilizando o sistema de feixes e monocromadores de um espectrofotômetro Hitachi U2000.Para os ensaios de quantificação foram escolhidas reações descritas no manual padrão de análises de águas[3]. A determinação de nitrito em água pelo método 4500-NO_2^- (reação de Saltzman)[3], ozônio residual em água pelo método 4500-O3 (corante índigo trisulfonado)[3] e a determinação de fosfato em água utilizando o procedimento 4500-P (reação com o complexo V-Mo)[3]. Após os ensaios, as imagens das soluções resultantes foram digitalizadas utilizando os sensores CMOS(webcam) e CCD(Scanner). Com a aquisição, as imagens foram processadas e convertidas em sinais de resposta em função da concentração do analito.

Resultados e discussão: Os sensores testados foram irradiados por feixes monocromáticos e as imagens adquiridas exibiram cores nítidas em um intervalo de 370 á 650 nm como representado na Figura 1-a. Os intervalos de aquisição para os diferentes comprimentos de onda mostraram a possibilidade de realizar ensaios colorimétricos para as reações escolhidas para ambos os sensores, porém o sensor CCD apresentou uma melhor resolução e intensidade de sinal. As imagens adquiridas das soluções foram processadas seguindo o modelo representado na Figura 1-b, onde as cores das imagens são associadas ao diagrama de cromaticidade para averiguar se a solução apresenta a cor adequada. Na sequência as imagens foram convertidas para o modelo de grayscale para serem associadas às concentrações dos analitos em estudo.

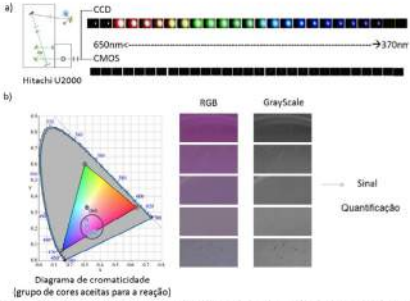


Fig.1. a) Avaliação de sensibilidade dos sensores b) Modelo de classificação e quantificação proposto baseado no sinal em grayscale.

As figuras de mérito analítico dos ensaios usando os dois diferentes sensores estão apresentadas na Tabela 1. Os métodos utilizando ambos sensores mostraram-se viáveis, entretanto o sensor CCD (scanner) apresentou um melhor desempenho alcançando menores limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

Tabela 1.Figuras de mérito dos sensores CCD e CMOS

SENSORES	PARÂMETROS ANALÍTICOS	OZÔNIO	NITRITO	FOSFATO
CCD (SCANNER)	Faixa de linearidade ($mMolL^{-1}$)	0.030 - 0.070	1.0 - 8.0	0.0030 – 0.0170
	SD	0.0133	0.0055	0.0100
	R^2	0.9908	0.9933	0.9895
	LD ($mMolL^{-1}$)	0.01	0.8	0.002
	LQ ($mMolL^{-1}$)	0.04	2.4	0.006
	Erro Relativo (%)	3.2	5.3	11.2
	RSD(%)	1.8	2.2	2.7
CMOS (WEBCAM)	Faixa de linearidade ($mMolL^{-1}$)	0.040 – 0.120	4.0 – 10.0	0.012 – 0.023
	SD	0.021	0.0102	0.0052
	R^2	0.9824	0.9777	0.9905
	LD ($mMolL^{-1}$)	0.02	1.9	0.002
	LQ ($mMolL^{-1}$)	0.06	6.2	0.007
	Erro Relativo (%)	4.2	7.3	9.3
	RSD(%)	3.6	6.1	5.7

Conclusões: Ambos os sensores apresentaram boa aplicabilidade para a quantificação dos corantes formados nos ensaios. Porém, quando o LD é crítico nas amostras a serem determinadas é recomendado o uso do sensor CDD.

Referências:

[1]Geladi, P.; Grahn, H. *Multivariate Image Analysis*. London: Editora Willey, 1996.
[2]Müller-Gerbes, L. *Spinner und Weber+Textilveredlung*. **1960**, *special reprint*.
[3] Clescreci, L. S.; Greenberg, A. E. e Trussel, R. R. *Standard Methods for examination of water and wastewater*. Washington,DC: Editora American Public Health Association, 1989.

Agradecimentos:

Ao CNPQ e a FAPESP pelo apoio financeiro.

Microemulsificação em química analítica: Estudo de fatores intervenientes

Karen M. Higa, Ivo P.O. Silva, Adriana Santinom, Gabriela F. Giordano, Angelo L. Gobbi, Lauro T. Kubota e Renato S. Lima

RESUMO: *O método baseado no fenômeno da microemulsificação (microemulsification based method, MEC) foi criado em 2014, no LMF, com uso pioneiro para fins de análises quantitativas, precisas ou preliminares. Seus resultados preliminares mostraram-se promissores no tocante a construção de tecnologias de teste rápido. Neste presente trabalho, reportamos um estudo do desempenho analítico do MEC considerando-se, variações na natureza do anfifílico, na composição das dispersões, no preparo das dispersões, na temperatura e na força iônica.*

Palavras-Chaves*: point-of-care; microemulsão; termodinâmica; tensão interfacial.*

INTRODUÇÃO: O método baseado no fenômeno da microemulsificação (denominado MEC) está relacionado com a estabilização termodinâmica de dispersões que se constituem inicialmente de emulsões ou sistemas de Winsor (turvas) e são convertidas em meios isotrópicos transparentes e estáveis, as microemulsões (**MEs**). As MEs são compostas pelas fases polar (W), apolar (O) e anfifílica (AP) e sua formação pode ser observada simplesmente através da inspeção visual da mudança de turbidez do sistema. Tal conversão turvo-transparente pode ser expressa pela fração volumétrica mínima de AP necessário para gerar ME (Φ_{ME}) o qual corresponde à resposta analítica do MEC. Neste trabalho, investigamos o efeito de fatores intervenientes diversos (desvios na preparação volumétrica das dispersões e variações na temperatura e na força iônica) sobre o desempenho analítico do método usando composições de dispersão e fases AP diferentes, incluindo hidrótropo e surfactantes, neutros e iônicos. As composições foram relativas a sistemas com excessos de água, óleo ou com volumes similares.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL: O protocolo experimental do MEC depende da natureza da amostra. Quando o solvente da amostra é polar (o caso reportado aqui), soluções W são preparadas variando a concentração de analito. Tais soluções são usadas no preparo das misturas W-O. Posteriormente, o AP é adicionado à mistura W-O até formar MEs (medida de Φ_{ME}). Essa etapa visa à construção da curva analítica. No que tange à etapa de aplicação, a microemulsificação é realizada utilizando-se a amostra diretamente como fase W. Por fim, a concentração do analito é estimada a partir da equação da curva analítica.

A medida de Φ_{ME} foi feita por detecção visual. As dispersões foram obtidas em tubos Eppendor® com o auxílio de micropipetas após adição de AP às misturas W-O e agitação vigorosa das dispersões. Água e ácido oleico constituíram as fases W e O das MEs. Para a fase AP, tivemos: **(i)** 1-propanol (hidrótropo), **(ii)** CTAB 12,50% v/v em água (surfactante aniônico), **(iii)** triton X-100 50,00% v/v em 1-propanol (surfactante neutro) e **(iv)** tergitol NP-9 50,00% v/v em octanol (surfactante neutro).

Inicialmente, diagramas de fase foram obtidos para cada uma das composições supracitadas variando a fração volumétrica de água em óleo (Φ_W) das misturas W-O desde 5,00 até 95,00% v/v. Posteriormente, a robustez do método foi avaliada para cada caso. Os níveis de robustez foram expressos pelos erros absolutos ($\Delta\Phi$, % v/v) calculados para a concentração de analito em função de desvios na preparação volumétrica das dispersões e mudanças de temperatura e força iônica. As concentrações (fração volumétrica de etanol em água, Φ_E) foram determinadas a partir de curvas analíticas a padrões de etanol os quais foram diluídos em água (fase W das dispersões; rotina de análise descrita acima). Para o estudo da robustez, as curvas analíticas foram registradas para misturas W-O contendo excessos das fases W (região **A**) e O (região **C**) e com frações similares dessas fases (região **B**). As misturas W-O foram preparadas utilizando-se 95,00% (**A**), 50,00% (**B**) e 5,00% v/v água em óleo (região **C**).

Para calcular $\Delta\Phi$, curvas analíticas foram inicialmente determinadas para cada uma das fases AP considerando **(i)** desvios de 5.00% e 10.00% v/v em Φ_W e diferentes **(ii)** temperaturas e **(iii)** forças iônicas. A robustez em função da temperatura foi avaliada através da construção de curvas analíticas nas seguintes temperaturas: 20, 23, 26 e 29°C. A robustez em termos da força iônica foi expressa matematicamente pela condutividade (κ) da fase W. Nesse caso, as fases W foram preparadas pela adição de etanol em soluções aquosas salinas diferentes, quais sejam: NaCl (10,0 e 500,0 mmol L^{-1}), Na_2SO_4, $FeCl_3$ e $CaCl_2$ (10,0 mmol L^{-1}). Os valores de κ para a fase W variaram de 100,0 a 35600,0 $\mu S\ cm^{-1}$.

Os valores de $\Delta\Phi$ foram relacionados a 7,00%, 30,00% e 60,00% v/v Φ_E a 23°C sem desvios em Φ_O e sem adição de sal (valores de referência). Em todos os casos, os sinais analíticos associados aos valores

de referência foram usados nas equações da regressão linear de cada curva para calcular Φ_E considerando os desvios na preparação das misturas W-O e mudanças de temperatura e força iônica da fase W.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: O desempenho analítico do método variou com a natureza química da fase AP e a composição relativa das misturas W-O. Adicionalmente, a robustez variou para cada AP. O aumento da força iônica na fase W, por exemplo, teve efeito mais significativo para o AP iônico CTAB. Esse efeito pode ser observado na **Figura 1** que mostra os valores de $\Delta\Phi$ em função de Φ_E para a região **B** quando há aumento da força iônica na fase W. Tais valores correspondem ao $\Delta\Phi$ médio de todos os sais estudados e tiveram como referência os valores da curva analítica obtidas sem adição de sal a 23 °C. Em linhas gerais, o limite de linearidade foi 70,00% v/v Φ_E. O surfactante neutro tergitol gerou os níveis maiores de sensibilidade e detectabilidade. As sensibilidades analíticas obtidas no intervalo de 30,00 a 60,00% v/v Φ_E na região **B** foram: -0,78 (propanol), -0,73 (triton), -0,99 (tergitol) e -0,70 (CTAB). Como esperado, o triton X-100 (preparado em 1-propanol) apresentou uma eficiência ligeiramente maior (valores menores de Φ_{ME}) com relação ao uso do hidrótropo, 1-propanol. Esse resultado se deve, presumivelmente, à maior atividade superficial dos surfactantes frente aos hidrótropos. Para os anfifílicos neutros, o método possuiu robustez satisfatória com relação ao aumento relativo da força iônica. Ademais, os estudos em função da temperatura e desvios das frações volumétricas das dispersões mostraram que o MEC foi bastante robusto em todos os casos.

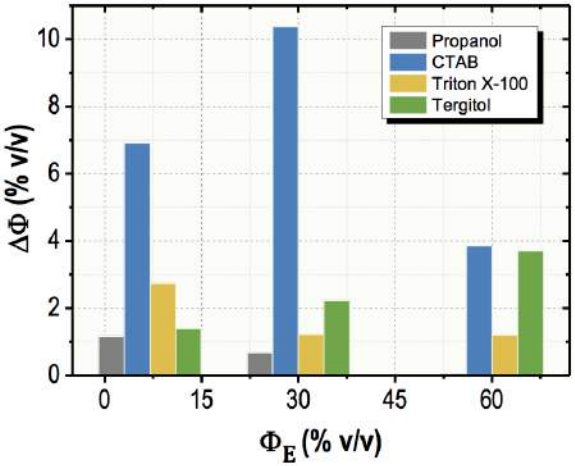


Figura 1. Valores médios de $\Delta\Phi$ em função de Φ_E para a região **B** quando aumenta-se a força iônica da fase W. Erros estão relacionados com a 7.00%, 30.00% e 60.00% v/v Φ_E (valores de referência).

CONCLUSÃO: O estudo de fatores intervenientes do MEC contribui para uma maior compreensão sobre o método, o que é essencial para sua consolidação nas ciências analíticas quantitativas. Atualmente, estudos de robustez e acurácia estão ainda sendo realizados.

REFERÊNCIAS: Lima, R. S.; Shiroma, L. Y.; Teixeira, A. V. N. C.; de Toledo, J. R.; do Couto, B. C.; Carvalho, R. M.; Carrilho, E.; Kubota, L. T.; Gobbi, A. L. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 9082.

E-mail: ***karen.higa@lnnano.cnpem.br***

Método baseado em microemulsificação: perfil do sinal analítico e determinação direta de etanol em vinho de cana-de-açúcar.

Gabriela F. Giordano, Adriana Santinom, Lauto T. Kubota, Angelo L. Gobbi, Renato S. Lima.

RESUMO

Descrevemos resultados importantes para consolidação do método baseado em microemulsificação (MEC), criado em 2014 como alternativa potencial para determinações point-of-care. Os seguintes testes foram feitos: caracterização por DLS para avaliar a correlação entre o sinal analítico e a tensão interfacial, testes de robustez em função de desvios na preparação volumétrica das dispersões e alterações na temperatura e na força iônica do meio e, por fim, determinação direta de etanol em amostras de caldo de cana-de-açúcar fermentado.

Palavras-chave: *Point-of-care, teste rápido, dispersões, termodinâmica, tensão interfacial.*

INTRODUÇÃO

Designado como MEC (*microemulsification-based method*),[1] esse método foi criado em 2014 e consiste no uso inédito do fenômeno da estabilização termodinâmica de dispersões para determinações analíticas. Com esse fenômeno, a geração de nanogotas em microemulsões (ME; transparentes) permite análises quantitativas mediante o monitoramento da turbidez do sistema, que constitui-se inicialmente de emulsões (turvas). Mais especificamente, o MEC baseia-se no efeito do analito sobre a entropia dessas dispersões, o que afeta a microemulsificação modificando a fração volumétrica mínima do anfifílico necessária para gerar ME (Φ_{ME}); tal parâmetro expressa a resposta analítica do método. Diferentemente do que ocorre em colorimetria onde a resposta varia com a intensidade de cor, a medida de Φ_{ME} depende de uma informação química binária, a conversão turvo-transparente, permitindo determinações precisas mediante detecção visual o que prescinde a utilização de técnicas instrumentais de detecção.

O método foi aplicado na determinação de etanol em amostras de caldo de cana-de-açúcar fermentado. Testes feitos por DLS avaliaram a relação entre Φ_{ME} e o fenômeno da atividade superficial, responsável por reduzir a tensão interfacial das dispersões o que gera o processo de microemulsificação. Adicionalmente, testes de robustez do MEC foram realizados; avaliamos o efeito de determinadas perturbações sobre as concentrações de analito (fração volumétrica de etanol em água, Φ_E) obtidas pelo método. Tais perturbações são referentes a desvios no preparo das dispersões e a alterações na temperatura e na força iônica.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental do MEC depende da natureza da amostra. De acordo com a sua polaridade, o analito pode ser adicionado na fase hidrofílica (W), anfifílica (AP), ou hidrofóbica (O). Logo, o MEC é aplicável a amostras polares, apolares e anfifílicas. Quando o solvente da amostra é polar (o caso reportado aqui), soluções W são preparadas variando a concentração de analito. Tais soluções são usadas no preparo das misturas W-O. Posteriormente, o AP é adicionado à mistura W-O até formar MEs (medida de Φ_{ME}). Essa etapa visa à construção da curva analítica. No que tange à etapa de aplicação, a microemulsificação é realizada utilizando-se a amostra diretamente como fase W. Por fim, a concentração do analito é estimada a partir da equação da curva analítica.

A medida de Φ_{ME} foi feita através de detecção visual. As dispersões foram obtidas em tubos Eppendorf® com o auxílio de micropipetas após adição de AP às misturas W-O e agitação vigorosa das dispersões a 23 °C. As MEs foram compostas por água, ácido oleico e etanol como fases W, O e AP, respectivamente. As misturas W-O tiveram 50% v/v água em óleo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os diâmetros de gota obtidos para composições diversas de ME por DLS (0,5 a 5,5 nm) indicaram uma relação sistemática na qual Φ_{ME} diminui com a atividade superficial. O MEC foi robusto frente a variações no preparo das dispersões, na temperatura (20 a 29 °C) e na condutividade da fase W (0,5 a 38,9 mS cm^{-1}). No que concerne à determinação de etanol em amostras de caldo de cana-de-açúcar fermentado, os resultados foram surpreendentemente exatos (frente a dados de FTIR) após simplesmente análises diretas em solução com detecção visual. Usualmente, etapas de diluição e técnicas de separação (cromatografia e eletroforese) são requeridas nesse caso. Os valores de sensibilidade analítica para primeira faixa linear (até 30,00% v/v Φ_E) e limites de linearidade e detecção foram, respectivamente, -0,39, 70,00% v/v e 1,34% v/v Φ_E. A curva analítica é apresentada na **Figura 1 (a)**. A **Figura 1 (b)**, por sua vez, exibe as curvas registradas com intento ao estudo da robustez em função da força iônica (condutividade da fase W). Os erros absolutos ($\Delta\Phi$) calculados para Φ_E considerando-se as adições de sais (os valores de referência foram aqueles determinados pela curva analítica obtida sem sal) variaram entre 0,01 e 2,90% v/v. As amostras foram fornecidas pelo CTBE/CNPEM.

CONCLUSÃO

O MEC combina simplicidade, rapidez, consumo de reagentes baixo (até 20 μL) e portabilidade (fatores cruciais na indústria) com desempenho analítico satisfatório considerando figuras de mérito como precisão, linearidade, robustez e exatidão (aspectos decisivos na pesquisa). Logo, o MEC é promissor para construção de sistemas *point-of-care*, capazes de conduzir análises *in situ* sem a necessidade de operadores qualificados.

REFERÊNCIAS

1. Lima, R. S.; Shiroma, L. Y.; Teixeira, A. V. N. C.; de Toledo, J. R.; do Couto, B. C.; Carvalho, R. M.; Carrilho, E.; Kubota, L. T.; Gobbi, A. L. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 9082.

E-mail: **gabriela.giordano@lnnano.cnpem.br**

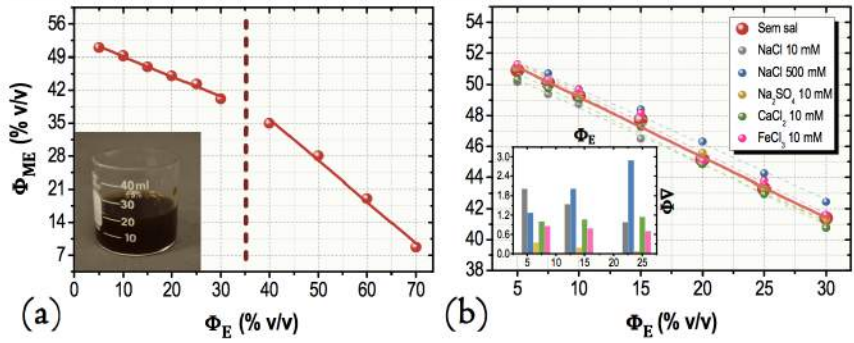


Figura 1. Curva analítica para análise de etanol em vinho de cana-de-açúcar **(a)**. Curvas analíticas obtidas usando soluções aquosas salinas no preparo das soluções do analito (fase W) visando a avaliar a robustez do método **(b)**. **Inserções**: foto de uma amostra **(a)** e erros absolutos calculados para Φ_E considerando-se as adições de sais **(b)**.

Microemulsificação: um novo método para determinações analíticas.

Jaqueline G. da Cunha, Leandro Y. Shiroma, Alvaro V. N. C. Teixeira, Bruno C. do Couto, Rogério M. de Carvalho, Emanuel Carrilho, Lauto T. Kubota, Angelo L. Gobbi, Renato S. Lima.

RESUMO

Descrevemos um método criado em 2014 que consiste na utilização inédita do fenômeno da estabilização termodinâmica de dispersões para determinações analíticas. Designado como MEC, o método foi aplicado para a determinação de água em etanol combustível e monoetilenoglicol em amostras de gás natural liquefeito.

Palavras-chave: *Point-of-care, teste rápido, dispersões, termodinâmica, tensão interfacial.*

INTRODUÇÃO

Este trabalho aborda um método criado em 2014 para determinações analíticas.[1] Designado como MEC (*microemulsification-based method*), ele consiste na utilização inédita do fenômeno da estabilização termodinâmica de dispersões. Com esse fenômeno, a geração de nanogotas em microemulsões (ME; transparentes) permite análises quantitativas mediante o monitoramento da turbidez do sistema, que consiste inicialmente de emulsões (turvas). Mais especificamente, o MEC baseia-se no efeito do analito sobre a entropia dessas dispersões, o que afeta a microemulsificação modificando a fração volumétrica mínima do anfifílico necessária para gerar ME (Φ_{ME}); esse parâmetro expressa a resposta analítica do método. Diferentemente do que ocorre em colorimetria onde a resposta varia com a intensidade de cor, a medida de Φ_{ME} baseia-se em uma informação química binária, a conversão turvo-transparente. Isso permite determinações precisas através de detecção visual prescindindo técnicas instrumentais de detecção.

O método foi aplicado na determinação de água em etanol combustível e monoetilenoglicol (MEG) em amostras referentes à regeneração desse diálcool (evita a formação de hidratos) após a sua aplicação nas linhas de processamento de gás natural liquefeito pela Petrobras.[1]

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental do MEC depende da natureza da amostra. De acordo com a sua polaridade, o analito pode ser adicionado na fase hidrofílica (W), anfifílica (AP), ou hidrofóbica (O). Logo, o MEC é aplicável a amostras polares, apolares e anfifílicas. Quando o solvente da amostra é AP (análise de água em etanol), misturas W-O (solventes padrão) são inicialmente preparadas numa razão de volume determinada. Em seguida, soluções AP com teores diferentes de analito são adicionadas à mistura W-O até formar ME (medida de Φ_{ME}). Essa etapa visa à construção da curva analítica. No que tange à etapa de aplicação, a microemulsificação é realizada utilizando-se a amostra diretamente como AP. Por fim, a concentração do analito é estimada a partir da equação da curva analítica. Quando o solvente da amostra é polar, por sua vez (análise de MEG em gás natural), soluções W são preparadas variando a concentração de analito. Tais soluções são usadas no preparo das misturas W-O. Posteriormente, as MEs são formadas após a adição de AP.

A medida de Φ_{ME} foi feita mediante detecção visual. As dispersões foram obtidas em tubos Eppendorf® com o auxílio de micropipetas após a adição de AP às misturas W-O e agitação vigorosa das dispersões a 23 °C. Em todos os casos, as dispersões foram compostas por água e etanol como fases W e AP, respectivamente. Para as determinações de água e MEG, clorobenzeno e ácido oleico constituíram as respectivas fases O das MEs.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises a etanol mostraram que o desempenho analítico do método varia com a região das dispersões no diagrama de fases. As misturas W-O foram preparadas usando 5,00% (**A**), 50,00% (**B**) e 95,00% v/v água em óleo (região **C**). As curvas analíticas para determinação de água em etanol seguem na **Figura 1 (a)**. Os intervalos de confiança ($\alpha = 0,05$ e $n = 4$) ficaram em torno de 0,20%. Os limites de detecção (LD) (S/N = 3) foram 1,41% (**A**), 0,73% (**B**) e 0,32% v/v água em etanol (Φ_W) (região **C**). Os testes a gás natural, por sua vez, mostraram o potencial do MEC para matrizes complexas. Tais amostras apresentaram cor, material particulado (ver foto na **Figura 1**), força iônica alta (condutividades de até 3.030,0 μS cm^{-1}) e compostos como metais, ácidos carboxílicos e ânions. Não obstante essa complexidade, determinações exatas foram conseguidas eliminando etapas como extração e separação. Adicionalmente, o método foi robusto em relação a desvios na preparação volumétrica das misturas W-O e a variações na temperatura e na força iônica do meio. A curva analítica a padrões de MEG na região **B** do diagrama de fases é apresentada na **Figura 1 (b)**. Surpreendentemente, a faixa linear se estendeu por toda a fração volumétrica do analito. Os intervalos de confiança ($\alpha = 0,05$ e $n = 4$) ficaram em torno de 0,17% v/v. O LD (S/N = 3) foi estimado em 1,50% v/v MEG em água (Φ_M).

CONCLUSÃO

O MEC combina simplicidade, rapidez, consumo de reagentes baixo (até 20 μL) e portabilidade (fatores cruciais na indústria) com desempenho analítico satisfatório considerando figuras de mérito como precisão, linearidade, robustez e exatidão (aspectos decisivos na pesquisa). Logo, o MEC é promissor para construção de sistemas *point-of-care*, capazes de conduzir análises *in situ* sem a necessidade de operadores qualificados. Atualmente, esforços estão sendo feitos com intento à automação do método em microfluídica com detecção através de *smartphone*.

REFERÊNCIAS

1. Lima, R. S.; Shiroma, L. Y.; Teixeira, A. V. N. C.; de Toledo, J. R.; do Couto, B. C.; Carvalho, R. M.; Carrilho, E.; Kubota, L. T.; Gobbi, A. L. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 9082.

E-mail: **jaquelinegcunha91@gmail.com**

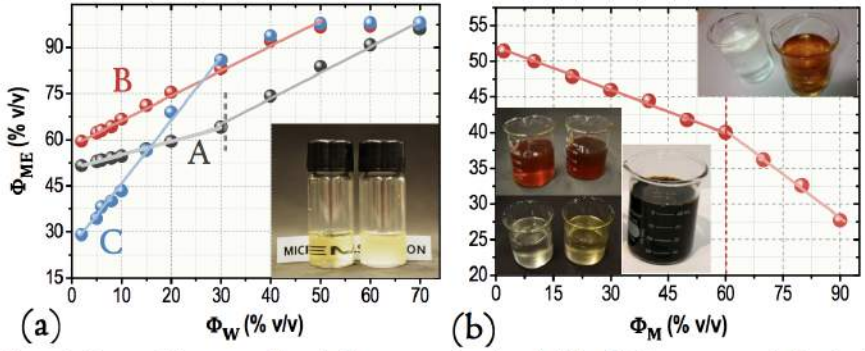


Figura 1. Curva analíticas para análises de água em etanol combustível (**a**) e MEG em amostras relacionadas à regeneração desse diálcool após o seu uso nas linhas de processamento de gás natural liquefeito pela Petrobras (**b**). **Inserções**: fotos da transição turvo/transparente que se observa com as microemulsificações (na figura (**a**)) e das amostras referentes à produção de gás natural (na figura (**b**)).

Numerical modeling of viscous lipid membranes and membrane tethering

Diego S. Rodrigues, Roberto F. Ausas, Fernando Mut, Gustavo C. Buscaglia
ICMC-USP, Brazil

diegosarodrigues@gmail.com, rfausas@icmc.usp.br, fermut@gmail.com,
gustavo.buscaglia@icmc.usp.br

Abstract: *Cell mechanics lies on the micromechanical properties of the plasmatic membrane, a two-molecule-thick phospholipid bilayer. The dynamics of such a two-dimensional material is governed by the interplay of external applied forces, surface Newtonian viscous effects and bending forces. Despite of theory and well-succeed biophysical experiments, computational techniques are more difficult to find in the literature, especially regarding the actual three-dimensional membrane dynamics [1]. Accordingly, we introduce a variational formulation for viscous flows of area- and volume-preserving closed curved surfaces [2]. The proposed formulation coupled to a powerful remeshing strategy is shown to be sufficiently robust making possible the simulation of tethering experiments that involve very large deformations of the membrane. Our numerical approach is validated by comparing it to semi-analytical solutions. This contribution is mainly a report of a simulation tool for numerically experimenting the viscous membrane dynamics.*

Keywords: *Biomembranes, Lipid Bilayer, Surface Viscosity, Canham-Helfrich Energy, Membrane Tethering*

Introduction: Phospholipid membranes are two-molecule-thick surface arrays of phospholipids [3] that constitute the fundamental building material of the Living Cell membrane, of many intra-cellular units, and of synthetic vesicles such as liposomes. The static properties of this two-dimensional material are governed by geometry. In fact, remarkable agreement with biophysical observations has been obtained with models in which the energy density (per unit area) is a function of the local curvature alone [4]. Such an energy density is typical of thin *elastic solids* in bending. The evolution of phospholipid membranes results from the interplay between the applied forces, the hydrodynamic forces coming from the adjacent inner and outer liquids and the forces that develop on the membrane itself coming from elasticity. In accordance with the mosaic fluid model [5], we assume that the surface viscous forces that develop on the membrane and determine its dynamics correspond to an area-preserving *Newtonian surface fluid* [6]. Regarding membranes with no particular symmetry, the numerical methods available in the literature only address static shapes with *non-physical dynamics* (except for [7]). Filling the gap, in this contribution we report a simulation tool for numerically experimenting the real *viscous flow* of phospholipid bilayers under the action of external forces. The full description of it is given in [2], where we essentially test and introduce our semi-implicit finite element method. Several relaxations experiments are presented there, but here we focus our attention mainly in membrane tethering [8]. This is a salient phenomenon that takes place in phospholipid bilayers, by which if a small part of a vesicle is pulled away by some localized force (using an optical trap [9], for example) it carries with it a narrow bilayer tube (tether) that can be much longer that the vesicle itself and nanometric in diameter.

Mathematical formulation: Only the very essential of the mathematical setting is present here. The reader is referred to [2] for a full description, including the numerical scheme. We consider the motion of a closed surface $\Gamma \subset \mathbb{R}^3$ under the action of surface elastic forces and external forces coming from the adjacent liquid. Since we are using finite elements the virtual work principle is appealing for such a system. Namely,

$$\int_\Gamma \boldsymbol{\sigma} : D_\Gamma \mathbf{v}\, d\Gamma = -d\mathscr{E}(\mathbf{v}) + \int_\Gamma \mathbf{f}\cdot\mathbf{v}\, d\Gamma \qquad \forall \mathbf{v} \in V, \tag{1}$$

where $\boldsymbol{\sigma}$ is the tensor of tangential stresses, $\mathscr{E}(\Gamma)$ is the elastic energy from which elastic forces are derived, $\mathbf{f}$ is the net external force, V the space of admissible virtual velocities and $D_\Gamma \mathbf{v}$ the surface virtual strain rate given by $D_\Gamma \mathbf{v} = 1/2(\mathbb{P}(\nabla_\Gamma \mathbf{v} + \nabla_\Gamma \mathbf{v}^T)\mathbb{P}$, which is the surface analog of the usual three-dimensional symmetric gradient $D\mathbf{v} = (\nabla \mathbf{v} + \nabla \mathbf{v}^T)/2$. Some elements of differential geometry are needed at this point. The tensor $\mathbb{P}$ above is the tangent projector onto Γ given by $\mathbb{P} = \mathbb{I} - \breve{\mathbf{n}} \otimes \breve{\mathbf{n}}$, $\breve{\mathbf{n}}$ being the outward normal to Γ. The symbol ∇_Γ refers to the *surface gradient*, essentially a "tangential derivative" (*cf.* [2]). The rheology of an area-preserving viscous interface Γ is governed by the Boussinesq-Scriven law [10], which is the tangential analog to the Newtonian constitutive law, *i.e.*, $\boldsymbol{\sigma} = -\pi_s \mathbb{P} + 2\mu D_\Gamma \mathbf{u}$, where μ is the *surface* viscosity (given in Pa·s·m), $\mathbf{u}$ is the material velocity of the membrane particles subjected to the restriction $\nabla_\Gamma \cdot \mathbf{u} = 0$, which is enforced by introducing the surface pressure π_s (given in Pa·m). The elastic bending energy considered here is the simplest version of the model proposed by Canham and Helfrich [4, 11], $\mathscr{E}(\Gamma) = \frac{c_{CH}}{2}\int_\Gamma \kappa^2$, where $\kappa = \kappa_1 + \kappa_2$ stands for the scalar

mean curvature of Γ (κ_1 and κ_2 are the principal curvatures) and c_{CH} is a material dependent parameter known as *bending rigidity* or *bending stiffness*. As we have already said, the numerical finite element scheme which fundamentally solves (1) is fully present in [2].

Results and discussion: Here, we assess the ability of the method to correctly predict the dynamical equilibrium of the tether. Other membrane tethering experiments can be found in [2]. We take a tether formed by applying a tweezer force of $F_T = 400$ and suddenly change the force. Two runs were performed, in one of them F_T is changed to 500 and in the other to 600. The time is redefined to be zero at the time of the force change. The radius of the simulated tether as a function of time is shown in Figure 1. The initial exact equilibrium radius is $R_{eq}(F_T = 400) = 0.0157$, which is reasonably approximated by the method despite the mesh being quite coarse. After changing the force to $F_T = 500$, the tether's radius shrinks to a value of approximately 0.013, which is a good approximation to $R_{eq}(F_T = 500) = 0.0126$. Further, the evolution towards the new radius is in good agreement with an exponential of the form $ae^{-t/\tau} + b$, where $\tau = 6.32 \times 10^{-4}$ is given by $R_{eq} = 2\pi/F_T$ and $\tau = 16\pi^2/F_T^2$ (*cf.* [2]), as shown by a continuous line in the figure. The same procedure is conducted for the change to $F_T = 600$, for which the exact values are $R_{eq}(F_T = 600) = 0.0105$ and $\tau = 4.39 \times 10^{-4}$. The relaxation towards the equilibrium radius is seen to agree quite well with the analytical solution (though better for $F_T = 500$ than for $F_T = 600$), and the equilibrium radius itself is predicted with an error of about 5%. This error level is reasonable, considering that there are just about twelve elements in the tether's circumference.

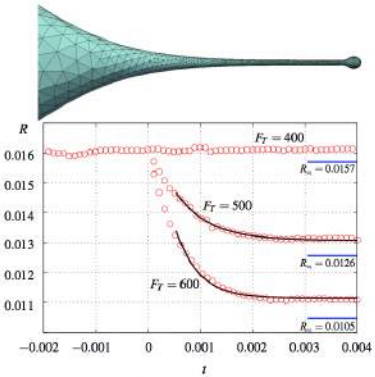


Figure 1: Response of the tether's radius to a sudden change in the tweezer's force. From a tether in dynamical equilibrum at $F_T = 400$, the force is changed to $F_T = 500$ or $F_T = 600$ at $t = 0$. The circles correspond to the numerical results obtained with the proposed method. The black lines correspond to an exponential adjustment with characteristic time given by $\tau = 16\pi^2/F_T^2$. On the right the exact equilibrium radius ($R_{eq} = 2\pi/F_T$) is shown with a short blue segment.

Conclusion: The proposed method is shown to be sufficiently robust to allow for accurate simulations of tether formation and extension, which are important to shed light on fundamental mechanisms of cell mechanics.

Acknowledgements: The authors acknowledge the financial support received from grants #2011/01800-5, #2012/14481-8, #2012/23383-0 and #2014/19249-1, São Paulo Research Foundation (FAPESP) and from the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq).

References:

[1] W. R. Holmes and L. Edelstein-Keshet, PLoS Comput. Biol. **8**, e1002793 (2012).
[2] D. S. Rodrigues, R. F. Ausas, F. Mut and G. C. Buscaglia, To appear in J. Comput. Phys. (also in arXiv:1409.3581).
[3] B. Alberts *et al.*, Garland Publishing, New York, 2009.
[4] P. Canham, J. Theor. Biol. **26**, 61 (1970).
[5] G. L. Nicolson, Biochim. Biophys. Acta Biomemb. **1838**, 1451 (2014).
[6] C. Harland *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, doi:10.1073/pnas.1111381108.
[7] I. V. M. Tasso and G. C. Buscaglia, Comput. Methods Appl. Mech. Engrg. **255**, 226 (2013).
[8] B. Pontes *et al.*, PLoS ONE **8**, e67708 (2013).
[9] A. Ashkin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 4853 (1997).
[10] L. Scriven, Chem. Eng. Sci. **12**, 98 (1960).
[11] W. Helfrich, Z. Naturforsch. C **28**, 693 (1973).

Obtenção de nanovesículas lipídicas utilizando dispositivos microfluídicos visando aplicações alimentícias

*Mariano Michelon, Davi Rocha Bernardes de Oliveira, Lucimara Gaziola de la Torre, Rosiane Lopes Cunha

*michelonmariano@gmail.com

Resumo: O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade técnica de empregar a microfluídica para obtenção de nanovesículas lipídicas em diferentes condições de processo visando posteriores aplicações na indústria alimentícia.

Palavras-Chaves: *microfluídica ; nanovesículas ; lecitina*

Introdução: Os lipossomas são vesículas esféricas de tamanho nanométrico constituídas de uma ou mais bicamadas concêntricas de lipídios que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo, os quais podem ser utilizados para veiculação de compostos hidrofílicos e/ou hidrofóbicos de interesse para a indústria de alimentos. No entanto, uma maior versatilidade nas aplicações das nanovesículas exige o desenvolvimento de processos mais robustos, já que os métodos clássicos de produção proporcionam um controle limitado do processo. A produção de nanovesículas em dispositivos de microfluídica de focalização hidrodinâmica é conduzida através da introdução de uma dispersão orgânica de lipídios no canal central do dispositivo e pela constrição dessa corrente central por correntes aquosas laterais. Isto resulta na difusão controlada do solvente orgânico na fase aquosa, desencadeando assim a auto-organização dos fosfolipídios em bicamadas e posteriormente em nanovesículas. Desta forma, a microfluídica caracteriza-se como um método simples e de alta reprodutibilidade para produção de estruturas com distribuição de tamanho controlada. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade técnica de empregar a microfluídica para obtenção de nanovesículas lipídicas em diferentes condições de processo visando posteriores aplicações na indústria alimentícia.

Procedimento experimental: Os dispositivos de seção retangular (~50 x 100 μm) utilizados com geometria de *cruz* foram confeccionados com polidimetilsiloxano pelo processo de litografia macia no Laboratório de Microfabricação do Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais. As nanovesículas foram obtidas através da injeção de uma fase orgânica contendo diferentes concentrações de lecitina natural de soja (LipoidS45, Lipoid GmbH, Alemanha) e etanol absoluto no canal central do dispositivo, com injeção simultânea de água nos canais laterais. As soluções foram introduzidas através de seringas de vidro, sendo suas vazões controladas por bombas PHD 22/2000 (Harvard Apparatus, Estados Unidos). A focalização hidrodinâmica foi acompanhada pelo microscópio óptico Multizoom AZ100 (Nikon, Japão). Após serem coletadas, as nanovesículas foram mantidas refrigeradas a 8° C antes da determinação da distribuição de tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, UK) e análises de microscopia eletrônica de transmissão (TEM-MSC Jeol 2100, Jeol Ltda, Japão).

Resultados e discussão: Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 1 (a-c) onde foi possível observar um aumento no diâmetro hidrodinâmico médio com o aumento da concentração de lecitina. Este comportamento pode ser explicado com base na teoria da formação de lipossomas através de técnicas que envolvem o princípio da difusão de um solvente orgânico em um meio aquoso. Durante o processo de difusão, são formadas inicialmente estruturas intermediárias planas. O processo de formação desses intermediários e a difusão do solvente orgânico na água ocorrem simultaneamente. Dessa forma, os fragmentos intermediários são caracterizados como uma resistência adicional à transferência de massa para difusão do solvente orgânico. Assim, em altas concentrações lipídicas à difusão do solvente ocorrerá lentamente e as moléculas de lipídios livres e os fragmentos provavelmente irão organizar-se de maneira descontrolada levando a formação de vesículas maiores com maior polidispersidade.

A Figura 1 (d-f) apresenta o efeito da velocidade total de escoamento das fases aquosas e orgânica no tamanho e na polidispersidade das nanovesículas. Com os resultados obtidos, foi possível observar que o diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersidade foram praticamente constantes quando a velocidade total de escoamento no canal variou de 75 a 500 mm/s (22,5 a 150 μL/min), com a razão entre as velocidades das fases aquosas e orgânica mantida constante em 10. Consequentemente, foi possível observar que o número de Reynolds, dentro da faixa do regime laminar (4,98 a 33,17), não exerceu influência significativa na distribuição do tamanho das nanovesículas.

A Figura 2 (a) apresenta um comparativo da distribuição de tamanho das estruturas obtidas por um método convencional de produção de nanovesículas realizado na macroescala (injeção de etanol) que consiste basicamente na mistura de uma fase orgânica (etanol e lipídios) numa fase aquosa (água) e pelo método de

focalização hidrodinâmica em microcanais, ambos na mesma concentração lipídica. Apesar do diâmetro hidrodinâmico médio em ambos os métodos serem semelhantes, a polidispersidade observada para as nanovesículas obtidas pelo método microfluídico foi de 20,7%, o que corresponde aproximadamente à metade do valor observado para as nanovesículas obtidas pelo método de injeção de etanol.

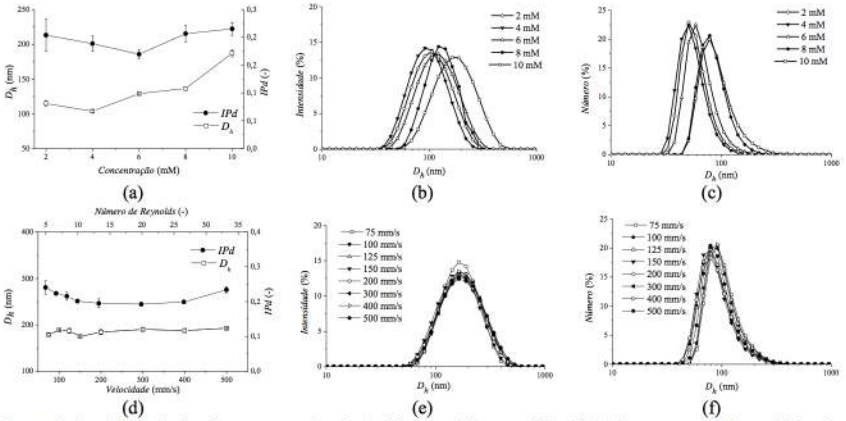


Figura 1. (a-c) Influência da concentração de lecitina no diâmetro hidrodinâmico e na polidispersidade das nanovesículas obtidas com velocidade de escoamento total de 125 mm/s; (d-f) influência da velocidade total de escoamento na polidispersidade das nanovesículas obtidas com concentração de fosfolipídios de 10 mM. Todos ensaios foram realizados a temperatura ambiente com uma razão entre as velocidades das fases aquosas e orgânica igual a 10.

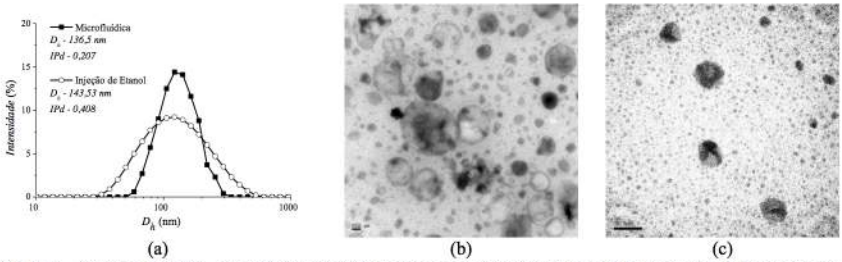


Figura 2. (a) Comparativo da distribuição dos tamanhos; (b) micrografias eletrônicas de transmissão das nanovesículas obtidas pelos método de injeção de etanol (10 mM, 40° C, 5 mL/min, 500 rpm) e (c) por microfluídica (10 mM, 25° C, 125 mm/s). Barra da escala de 0,2 µm.

Conclusões: Através da microfluídica foi possível produzir nanovesículas lipídicas de tamanho semelhante (~150 nm) às obtidas pelo método de injeção de etanol, o qual já é consolidado industrialmente. No entanto, as nanovesículas obtidas apresentaram um valor de polidispersidade inferior em relação às obtidas pelo método convencional. O desenvolvimento de dispositivos microfluídicos para operação contínua em elevadas velocidades dentro do regime laminar e que possibilitem a obtenção de estruturas com baixos índices de polidispersidade, é uma ferramenta importante para o desenvolvimento de sistemas microfluidicos paralelizados para aplicação industrial.

Agradecimentos: Agradecemos ao apoio técnico do Professor Dr. Angelo Gobbi e da técnica Maria Helena de Oliveira Piazzeto e a infraestrutura do Laboratório de Microfabricação (LNNano/CNPEM). Também gostaríamos de agradecer ao CEME/UNIFESP e ao apoio financeiro do CNPQ.

Estudo de Corrosões Anisotrópicas empregando KOH e TMAH aplicadas à formação de Nanoestruturas MEMS, NEMS e MOEMS em silício

Marcia Rautenberg Finardi, Mara A. Canesqui, J. A. Diniz

rautember@ccs.unicamp.br; mara@ccs.unicamp.br; diniz@ccs.unicamp.br

Resumo: *O trabalho apresenta um estudo baseado em processos físico-químicos para desenvolvimento de estruturas micro-eletromecânicas sobre o silício (100). As técnicas de corrosão química em silício é o principal foco do estudo. Foram caracterizadas 4 tipos de soluções – KOH, KOH+surfactante Triton X100, KOH-IPA e TMAH, avaliando-se os parâmetros de dosagem volumétrica, proporcionalidade, temperatura e agitação e rugosidade. Os resultados obtidos foram comparados considerando-se as formas de corrosão e o acabamento superficial das estruturas de forma qualitativa (superfície brilhante) e qualitativa (superfície polida e uniforme). Embora o TMAH tenha apresentado os melhores resultados, devido ao seu custo elevado e rápida saturação, foi importante estudar variações da solução com KOH, buscando desempenho próximo ao do TMAH. Obtiveram-se estruturas para aplicações em micro-estruturas suspensas e micro-sensores, dispositivos ópticos e também de microbombas fluídicas*

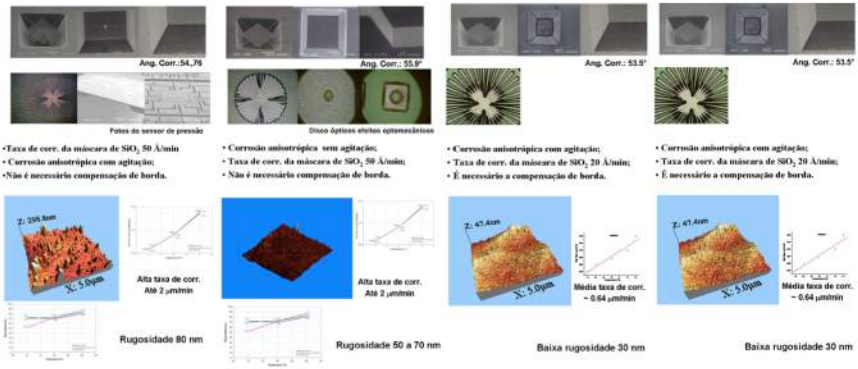
Palavras-Chaves: *corrosão anisotrópica; silício; micro-eletromecânica*

Introdução: O estudo de corrosão de silício é importante no desenvolvimento de nanoestruturas aplicadas em MEMS, NEMS e MOEMS, que se baseiam na existência de estruturas auto sustentadas executando algum tipo de movimento. Para isso necessitam que as técnicas de microfabricação em substrato ou em superfície removam, de forma parcial ou total, os materiais de forma controlada e baseada em efeitos geométricos, que dependem da orientação cristalográfica dos planos expostos. Para a realização deste trabalho deu-se enfoque nos processos de corrosão úmida para definição tridimensional em silício (membranas, cantileveres, canais, pontes e cavidades), porque em geral são mais seletivos e rápidos que os processos de corrosão a seco, acarretando menor custo e diversidade de aplicação. A corrosão úmida e anisotrópica de silício é conhecida desde as décadas de 60 e 70, em muitos trabalhos relacionados com a microeletrônica. Várias soluções podem ser encontradas na literatura, e buscou-se explorar as características de algumas soluções alcalinas para a aplicação em questão, estudando-se os parâmetros de processamento e um comparativo dos principais resultados baseados principalmente nos aspectos de facilidade de implementação, qualidade superficial e seletividade do ataque, além de custos. A utilização das estruturas desenvolvidas sozinhas ou combinadas possibilita a fabricação de uma grande variedade de dispositivos como sensores, atuadores, microfluídicos, fiber arrays entre outros.

Procedimento experimental: Para a corrosão na superfície do silício (100) desenvolveu um reator químico específico e foram utilizadas 4 tipos de soluções aquosas: KOH, KOH+surfactante Triton X100, KOH-IPA e TMAH, controlando-se alguns parâmetros como agitação da solução, temperatura da solução e tempo de reação. O desenvolvimento do processo de fabricação de estruturas MEMS é ilustrado na figura 1.

Figura 1 – Etapas do processo desenvolvido e fotos de alguns equipamentos empregados

Resultados e discussão: Os quadros a seguir sintetizam os resultados experimentais obtidos com a 4 soluções estudadas, indicadas abaixo dos respectivos quadros.



Solução de KOH á 42% | Solução. de KOH á 42% c/ surfactante | Solução de KOH 20%-IPA | Solução de TMAH á 25%

Conclusões: Realizaram-se experimentos para avaliar as propriedades de corrosão do silício (100) usando-se soluções de KOH e TMAH, para aplicações em microestruturas suspensas. 1 - Com o TMAH obteve-se bons resultados em estruturas suspensas microfabricadas, pois resistiram ao peso da membrana, apresentando superfícies polidas e baixa rugosidade, não havendo necessidade de compensação de cantos. A rugosidade da superfície corroída obtida é da ordem de 10 a 20 nm, com agitação da solução por rotação da amostra. Além disso, o TMAH é compatível com a tecnologia CMOS, evitando contaminação com os íons de potássio; 2 - A solução anisotrópica de KOH é mais indicada para aplicação na tecnologia de corrosão pela face posterior, pois a solução de TMAH degrada com a quantidade de silício dissolvido. Para este caso, após 250 □m de corrosão a rugosidade da superfície corroída obtida foi da ordem de 80 nm; 3 - Uma variação da solução de KOH também foi estudada, com adição de surfactante aniônico, para avaliar as propriedades de corrosão do silício e evitar-se a agitação, pois pela quantidade de material corroído as microestruturas podem facilmente ser danificadas pela mesma. Para este caso, devido ao aumento da capacidade hidrofílica entre a bolha de hidrogênio e a superfície do silício e o efeito da umidade, as propriedades de corrosão são constantes. A rugosidade pode ser reduzida em KOH com surfactante aniônico, obtendo-se valores no intervalo de 50 a 70 nm; 4 - Investigou-se ainda o álcool isopropílico (IPA) como surfactante no KOH, apresentando resultados de rugosidade próximo do TMAH, porém com velocidade de corrosão mais lenta.

Referências e agradecimentos:

Referências: [

[1]. O. Tabata, R. Asahi, H. Funabashi, S. Sug Iyama; "Anisotropic Etching of Silicon (CH3)4NOH Solutions", IEEE 1991.

[2]. H. Seidel, L. Csepregi, A. Heuberger, H. baumgäteL, "Anisotropic Etching of Cristalline Silicon in Alkaline Solutions. I.Orientation Dependence and Behavior of Passivation Layers", Journal of the Electrochemical Society, v.137, N.11, p. 3612-26, November 1990.

[3]. R. R. Neli, "Desenvolvimento de Micro-Estruturas Mecânicas sobre o Silício através da Corrosão do Substrato pela Superfície", Dissertação de Mestrado 2002 - Universidade Estadual de Campinas.

[4]. H. Furlan, "Desenvolvimento de Membranas par Sensores de Pressão utilizando Freamento Eletroquímico", Dissertação de Doutorado 2003 - Escola Politécnica/Universidade de São Paulo.

[5]. A. Fissore, "Corrosão Anisotrópica do Silício e Caracterização dessa Corrosão pela Mistura Hidróxido de Potássio-Água-Isopropanol", Dissertação de Mestrado 1997, - Escola Politécnica/Universidade de São Paulo.

[6]. C. Biasotto, "Obtenção e Caracterização de Filmes Finos de Óxido, Nitreto e Oxinitreto de Silício por Deposição ECR-CVD", Dissertação de Mestrado 2005 - Universidade Estadual de Campinas.

Agradecimentos: Os autores agradecem o apoio do CNPq e a equipe do CCS da UNICAMP, em especial aos Prof. Dr. Stanislav Moshkalev e Prof. Dr. Ioshiaki Doi, pelo suporte e contribuições durante os trabalhos.

Prototipagem de dispositivos meso e microfluídicos com TiO_2 impregnado em PDMS para teste de fotodegradação de Rodamina B em fluxo contínuo

Druval S. de Sá, Bojan A. Marinkovic, Eric C. Romani,Tommaso Del Rosso, Omar Pandoli

druvalperson@hotmail.com; bojan@puc-rio.br; eric_fisica@aluno.puc-rio.br; tommaso.delrosso@fis.puc-rio.br; omarpandoli@puc-rio.br

Resumo: *Neste trabalho, dispositivos meso e microfluídicos fotocatalíticos com TiO_2 impregnados em PDMS foram fabricados e utilizados no estudo de degradação de solução de rodamina 10^{-5} mol. L^{-1} em dois sistemas de fluxo diferentes para comparação de eficiência fotocatalítica entre os dispositivos. O primeiro em bomba peristáltica e o segundo em bomba seringa, ambos conectados aos dispositivos fabricados e à uma fonte LED (24,8 mW cm-2 ou 12, 4 mW cm-2) a uma velocidade de fluxo de 0,05 mL. min^{-1}. A impregnação no PDMS foi comprovada por MEV, EDS e Espetroscopia confocal Raman. O microrreator comparado ao mesorreator foi o mais eficiente, apresentando maior atividade fotocatalítica, 87,9%, em 12,4 mW.*

Palavras-Chaves: *Prototipagem, Fotocatálise, microrreator, mesorreator, TiO_2.*

Introdução:

A utilização de TiO_2 em catálise heterogênea incorporado a dispositivos micro e mesofluídicos, torna-se altamente eficaz na oxidação fotocatalítica de moléculas orgânicas e de poluentes orgânicos solúveis em água, eliminando a exigência de recuperação do fotocatalisador na mistura reacional como no caso de um sistema em batelada. A incorporação de TiO_2 na superfície do polidimetilsiloxano (PDMS), material mais adequado para esse tipo de técnica, durante a prototipagem de um dispositivo fotocatalítico elimina etapas críticas de calcinação do TiO_2 (P25 da Degussa) sobre vidros e de um ponto de vista sustentável diminui os gastos energéticos de prototipagem [1,2]. Neste trabalho, propusemos a prototipagem de dispositivos meso e microfluídicos fotocatalíticos para a fotoxidação de compostos orgânicos, apresentando teste de fotodegradação do corante rodamina B para comparar a eficiência dos dois dispositivos.

Procedimento experimental:

Para a imobilização do P25 em PDMS, utilizou-se uma lâmina de vidro com uma cavidade de área circular central (Ø= 13 mm, h= 100 µm). Realizou-se deposição de 100 µL de uma dispersão de 1% de P25 em etanol, evaporou-se o etanol na estufa a 60°C por 30 minutos, despejando-se, em seguida, uma mistura 10:1 de monômero de PDMS e agente polimerizante. O compósito P25-PDMS foi curado, cortado, caracterizado quimicamente e utilizado como suporte fotocatalítico para os dispositivos micro e meso. Para a prototipagem do microrreator fotocatalítico foi utilizada a metodologia descrita por Pandoli e colaboradores [2]. A selagem do PDMS e do compósito PDMS-P25 foi finalizada com auxílio de um plasma cleaner.

O teste de fotodegradação foi realizado injetando 10 mL de uma solução 10^{-5} M de rodamina B com o auxílio de uma bomba seringa (5 ciclos) e bomba peristáltica (16 h). A uma velocidade de fluxo de 0,05 mL min^{-1} a solução foi irradiada constantemente por uma fonte LED UV (365 nm), com potência de 24,9 mW cm^{-2} e 12,4 mW cm^{-2}. A descoloração da rodamina B foi avaliada em espectrofotômetro UV-VIS da Perkin Elmer, modelo lambda 956. A caracterização do compósito PDMS-P25 foi realizada a partir das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), Espectroscopia de Raios-X por dispersão de energia (EDS) e espectroscopia confocal Raman.

Resultados e discussão:

A Tabela 1, resume os resultados obtidos em duplicada no processo de fotodegradação com e sem fotocatalisador. Durante o monitoramento do processo de fotodegradação, verificou-se que o mesorreator, em bomba seringa e potência do LED a 24,9 mW cm^{-2}, a ação do fotocatalisador foi menos evidente pela competição do processo de fotólise da Luz UV, o controle apresentou uma descoloração de 63,6%, em detrimento ao mesorreator PDMS-P25, que apresentou 77,2% (diferença de 13,6 %). Com a redução da potência do LED para 12,4 mW cm^{-2}, a fotólise na ausência do P25 decresceu. O microrreator apresentou um leve aumento de descoloração (58,8%), com uma diferença percentual de *37,8%* frente ao controle. Em bomba peristáltica, com 12,4 mW cm^{-2}, constatou-se que a eficiência do microrreator é superior a do mesorreator. Enquanto o dispositivo

meso apresentou 40,8% de descoloração frente a 21,7% do controle, o dispositivo micro apresentou 87,9% de descoloração frente ao controle com 29,5%. Outro fator importante a ser considerado é a permanência da atividade catalítica do microrreator mesmo após a primeira utilização. O mesmo catalizador suportado foi reutilizado observando uma redução na eficiência da fotodegradação, apresentando uma descoloração de 78,6%. Torna-se necessário compreender o comportamento destes microrreatores fotocatalíticos em decorrência de uso prolongado.

Tabela 1. Descoloração de rodamina B em dispositivos meso e microfluídicos em bomba seringa após 5 ciclos e em bomba peristáltica após 16 horas de fluxo a 0,05 mL.min^{-1}.

Seringa				Peristáltica			
Dispositivos		P (mW)	%	Dispositivos		P (mW)	%
Meso	Con.	24,9	63,6	Meso	Con.	24,9	41,9
	P25	24,9	**77,2**		P25	24,9	**76,4**
	Con.	12,4	17,7		Con.	12,4	21,7
	P25	12,4	51,7		P25	12,4	40,8
Micro	Con.	12,4	21	Micro	Con.	12,4	29,5
	Micro	12,4	**58,8**		Micro*	12,4	**87,9**
					Micro**	12,4	**78,6**

Con: **controle;** Micro*: **utilizado por 1 vez;** Micro** **por 2 vezes.**

A imagem de MEV mostra uma seção transversal do compósito PDMS-P25 com uma protrusão de 124 µm, correspondente à profundidade da cavidade onde foi depositado o P25 e PDMS (Figura 2A). Os espectros EDS comprovam a imobilização do P25 na superfície do PDMS como indicado pela presença de apenas silício na área superior da imagem de MEV, enquanto Ti e Si são detectados na área de imobilização do P25 impregnado no PDMS. A imagem óptica do microscópio confocal Raman evidencia uma mistura heterogênea dos componentes TiO_2 e PDMS (Figura 2B). Um mapeamento 2D (25x25 µm) mostra duas áreas coloridas em azul e verde correspondentes aos dois componentes do compósito. O espectro em verde apresentou bandas vibracionais de estiramentos simétrico Si-O-Si (490 cm^{-1}) e estiramento simétrico e assimétrico Si-C (702 cm^{-1} e 790 cm^{-1}) característicos para o PDMS puro. O espectro de coloração azul, apresentou uma banda intensa em 140 cm^{-1}, e outras bandas menores sendo atribuídas ao TiO_2 na forma de anatásio. No processamento da imagem do mapeamento Raman 3D (figura 2C) foi possível a visualização de um volume 20x20x10 µm onde a área azul representa o TiO_2 na forma de anatásio e a área verde o PDMS.

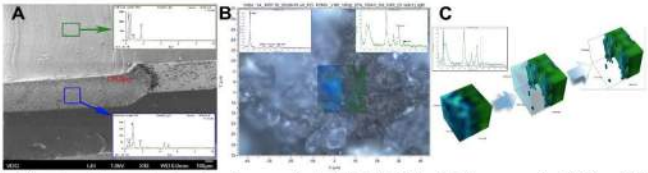


Figura 2. Técnicas de caracterização do compósito PDMS-P25. (A) Imagem de MEV e EDS; (B) Foto de microscopia óptica com espectros RAMAN dos componentes TiO_2 em azul e PDMS em verde; (C) Mapeamento 3D (20x20x10 µm) com microscópio confocal Raman.

Conclusões

A integração do fotocatalisador ao PDMS foi realizada com uma metodologia ambientalmente sustentável, de baixo custo e de fácil manuseio. A impregnação foi comprovada por MEV, EDS e Espetroscopia confocal Raman. O filme de P25 apresentou boa aderência à superfície do PDMS, entretanto, algumas áreas ficaram sem revestimento completo. Embora ainda seja necessário o aprimoramento da técnica de deposição, a atual técnica possibilitou o desenvolvimento de dispositivos meso e microfluídicos com alta atividade fotocatalítica. O microrreator comparado ao mesorreator foi mais eficiente, apresentando maior atividade fotocatalítica. Sob irradiação UV, em 12,4 mW de potência e com o auxílio de um fluxo continuo de 0,05 mL.min^{-1} por 16 horas, o meso e microrreator, respetivamente, apresentaram descoloração de 40,8% e 87,9%.

Referências

[1]A. Lamberti, *A. Surf. Scien.* **2015,** *335, 50-54.*

[2]O. Pandoli; T. D. Rosso; V. M. Santos; R. S. Rezende, B. A. Marinkovic. *Quim. Nova,* **2015,**

Estudo preliminar da extração de cobalto utilizando sistema aquoso bifásico em microfluídica

Anne Caroline Guimarães Veloso[1], Thiago Pinotti Segato[2], Luis Henrique Mendes da Silva[1], Emanuel Carrilho[2], Maria do Carmo Hespanhol da Silva[1]

[1] *Grupo de Química Verde Coloidal e Macromolecular, Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa*

[2] *Grupo de Bioanalítica, Microfabricação e Separações, Instituto de Química, USP São Carlos*

annecgv@gmail.com; segato22@yahoo.com.br; luhen@ufv.br; emanuel@iqsc.usp.br; mcarmohespanhol@gmail.com

Resumo: *Sistema aquoso bifásico (SAB) é um sistema de extração líquido-líquido que tem sido aplicado com sucesso para extrair biomoléculas, e mais recentemente íons metálicos, geralmente em batelada. Em escala micro, poucos estudos são reportados, limitando-se à materiais biológicos. Neste trabalho, é avaliada de forma pioneira a extração de cobalto utilizando o SAB PEO1500 + KSCN + água, em dispositivo microfluídico de PDMS/vidro com determinação espectrofotométrica. O aparecimento de bandas intensas na região de 320,0 e 620,0 nm, na fase superior(FS) do SAB, confirmam a transferência do cobalto da fase inferior para a FS. A transferência é favorecida principalmente por interações específicas entre o complexo Co-SCN e a macromolécula presente na FS. Os estudos iniciais indicam a viabilidade da aplicação do SAB em microfluídica para a separação e determinação de cobalto.*

Palavras-Chaves: *SAB, cobalto, microfluídica, extração líquido-líquido, green chemistry*

Introdução:

O sistema aquoso bifásico (SAB), descoberto em 1896 por Beijerink, é formado espontaneamente quando soluções aquosas de dois polímeros quimicamente distintos e hidrossolúveis, ou um polímero e um eletrólito são misturadas, em determinadas condições termodinâmicas, isto é, em uma temperatura, pressão e composição [1]. Além de polímeros e eletrólitos, líquidos iônicos também podem formar SAB [2-4]. Após mistura, e posterior repouso, duas fases líquidas e límpidas são formadas.

Devido às características distintas de cada fase, ao baixo custo, à possibilidade de reutilização e à atoxicidade, os SABs são aplicados com sucesso na extração e pré-concentração desde compostos biológico à metais [5]. Todavia, os processos são efetuados em geral em batelada requerendo um elevado tempo na sua execução, e ainda um grande consumo de amostras e solventes.

O uso de dispositivos microfluídicos figura como uma nova alternativa, possibilitando um menor consumo de reagentes e amostras, com consequente diminuição na geração de resíduos. Menores tempos de análise, elevada reprodutibilidade, portabilidade, e implementação de processo contínuo são outras vantagens atribuídas a este sistema. Alguns trabalhos já reportam a utilização do SAB em microfluídica, para a extração de materiais biológicos, como proteínas, células, anticorpos e DNA [6]. Todavia, não há nenhum estudo quanto à extração de metais utilizando SAB em microfluídica.

Tendo em vista a grande importância na determinação de metais, principalmente os de controle ambiental,como o cobalto [7], se faz estratégico o desenvolvimento de novos métodos verdes. Aliar as vantagens tanto do SAB quanto da microfluídica, na determinação de metais, representa um grande avanço, ainda pouco explorado.

Procedimento experimental:

Foi escolhido o SAB PEO 1500 + KSCN + H_2O, pH 6,0, 1ª linha de amarração, comprimento da linha de amarração 44,39% (m/m), 298,15 K. O sistema foi preparado, e as fases superior (FS) e inferior (FI) foram recolhidas em separado, após 96 horas. A solução de cobalto 4,8 mmol kg^{-1} foi preparada em FI (FI + Co). Os reagentes PEO1500, KSCN e $CoCl_2.6H_2O$, foram adquiridos respectivamente da Synth, Vetec e Isofar.

O dispositivo microfluídico de PDMS com base em vidro foi construído no Laboratório de Microfabricação, do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (LMF-CNPEM), Campinas - SP, utilizando a técnica de fotolitografia. Utilizou-se o fotorresiste SU-8, sendo as etapas de fabricação descritas no protocolo NANO^{TM} SU-8: Negative Tone Photoresist Formulation 50-100 [8]. Os microcanais do dispositivo foram do tipo trifurcado, tanto na entrada quanto na saída, com caminho reacional em serpentina, **Figura 1.a.**

Na etapa de extração, as fases foram bombeadas através do dispositivo microfluídico com o auxílio de três bombas seringa, New Era Pump Systems. Inicialmente foram bombeadas a FS e FI puras. E depois a FS e a FI + Co.

A FS foi bombeada no microcanal central a uma vazão de 2,5 μL/min. A FI, e posteriormente a FI + Co, foram bombeadas nos microcanais laterais, a uma vazão de 9,5 μL/min em ambos os microcanais. As fases efluentes de cada microcanal foram recolhidas em separado. O perfil laminar das fases foi acompanhado em tempo real em um microscópio digital, Olympus. A detecção espectrofotométrica, na faixa de 200 a 800 nm foi realizada no Nanodrop, DeNovix.

Resultados e discussão:

A Figura 1.b compara os espectros da FS efluente antes da extração, curva em preto, com a FS efluente após a extração, curva em vermelho. É notório o aparecimento de duas bandas nos comprimentos de onda próximos a 320,0 e 620 nm após o contato da FS com a FI no dispositivo microfluídico.

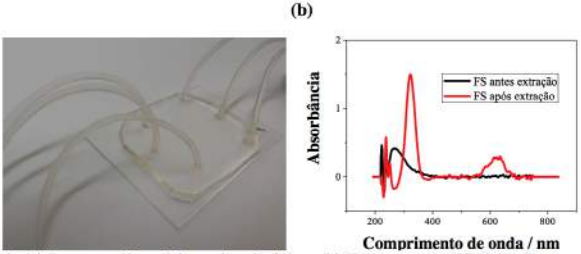


Figura 1: (a) Imagem dispositivo microfluídico, (b) Espectros da FS antes da extração e após a extração.

O aparecimento das bandas pode ser atribuído à formação do complexo Co-SCN, que apresenta dois picos com máximos de absorbância em 320,0 e 620,0 nm respectivamente. Os íons SCN^- já estão presentes na composição do SAB, e formam um complexo estável com o cobalto. Este complexo interage especificamente com os grupamentos de óxido de etileno do PEO. Justificando a afinidade do Co-SCN pela FS, uma vez que esta é rica em polímero.[9] Este estudo preliminar sinaliza o grande potencial da aplicação do SAB em microfluídica, na extração de metais, que até o presente momento ainda é desconhecido. Variáveis do sistema aquoso bifásico como componentes formadores, temperatura, pH, linha de amarração e comprimento da linha de amarração ainda serão investigados. Assim como as variáveis inerentes aos dispositivos microfluídicos, tais quais material de fabricação, tipo e largura de canal, tipo de entrada, vazão, arranjo das fases e tempo de coleta.

Conclusões:

Confirmou-se a viabilidade da extração de cobalto utilizando SAB em escala micro, de forma continua. O estudo pioneiro sinaliza a ampla gama de possibilidade de otimização tanto nos parâmetros do SAB, quanto dos dispositivos microfluídicos. São requeridos ainda estudos complementares, para o desenvolvimento de um método eficiente, rápido, seguro, de baixo custo e reprodutível para a determinação de cobalto utilizando SAB em microfluídica.

Referências :

[1] M. D. H. Da Silva, Quimica Nova **29**, 1332 (2006).
[2] D. J. S. Patinha, Journal Chemical Termodynamics **65**, 106 (2013).
[3] J. F. B. Pereira, Separation and Purification Technology **113**, 83 (2013).
[4] H. Passos, Biochemical Engineering Journal **67**, 68 (2012).
[5] L. R. Lemos, Separation and Purification Technology **115**, 107 (2013).
[6] S. Hardt, Lab on a Chip 12, **434** (2012).
[7] http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html, acessada em Junho de 2015.
[8] http://microchem.com/pdf/SU8_50-100.pdf. acessada em Junho de 2015.
[9] G. D. Rodrigues, Analytical Sciences **28**, 1213 (2012).

Agradecimentos:

Ao Angelo Gobbi, e à Maria Helena Piazetta (LMF-CPEM), CAPES, FAPEMIG, CNPq, INCTBio e INCTAA.

Desenvolvimento de metodologia para análise rápida de açúcares em microssistemas eletroforéticos

Gerson F. Duarte Junior, Marília S. Lopes, Humberto H. S. Alves, Wendell K. T. Coltro

Laboratório de Microfluídica e Eletroforese, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

gersonjunior16@hotmail.com; marilia.s.lopes@hotmail.com; humberto.quimica.ufg@hotmail.com; wendell@ufg.br

Resumo: *O presente trabalho descreve o desenvolvimento de metodologia baseada em microssistemas eletroforéticos acoplados com detecção condutométrica sem contato para análise rápida de açúcares Paras a análise foi utilizado um sistema comercial de eletroforese em microssistemas e microchips de vidro. A separação foi realizada em um eletrólito com pH fortemente alcalino para garantir a ionização dos carboidratos. Devido à baixa mobilidade dos açúcares foi possível realizar a separação em polaridade positiva. Duas condições de potenciais de separação foram utilizadas na qual a utilização de 1000 V resultou em um tempo de análise inferior à 2 min apresentando uma boa resolução de separação entre o par crítico frutose e glicose.*

Palavras-Chaves: *Microchips, detecção condutométrica sem contato, carboidratos*

Introdução: Os carboidratos representam uma classe de grande importância para a manutenção da vida atuando como fonte de energia em alguns processos biológicos bem como a produção de biocombustíveis. Devido a esta importância, os carboidratos estão no interesse de diversas áreas de pesquisa, como a bioquímica e a tecnologia e engenharia de alimentos, estando constantemente no foco de técnicas analíticas [1]. Técnicas cromatográficas como a cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência e Cromatografia líquida de troca iônica tem sido amplamente empregadas para análise desses compostos [2]. No entanto a utilização destas técnicas resulta em um longo tempo análise (30 a 60 min.). A eletroforese capilar (CE) acoplada com detecção condutométrica sem contato (C^4D) têm se tornado uma alternativa às técnicas cromatográficas, reduzindo o tempo de análise para cerca de 10 min [1]. Em 2004, Tanyanyiwa e co-autores reportaram a separação frutose (FRU) e sacarose (SAC) em microssistemas eletroforéticos (MSE) acoplado com C^4D [3]. Eles conseguiram a separação dos dois açúcares em um tempo inferior à 1 min. Eles testaram dois tipos de eletrólitos (NaOH 10 mmol/L e Trietilamina 100 mmol/L). Uma melhor sensibilidade foi alcançada utilizando NaOH como eletrólito. Uma das limitações quanto ao uso de MSE para a separação de carboidratos está na pobre resolução de separação entre essas espécies, exemplo que neste trabalho eles analisaram apenas dois analitos (FRU e SAC).
Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho é desenvolver uma metodologia baseada em um sistema comercial de eletroforese em microchips acoplados C^4D para análise rápida de açúcares, incluindo FRU, SAC e Glicose (GLI).

Procedimento experimental: Os experimentos foram realizados em um sistema comercial de eletroforese em microssistemas com detecção C^4D (C^4D System 225, eDAQ, Austrália). Este sistema é equipado com uma plataforma microfluídica modelo ET 225 e fonte de alta tensão bipolar modelo ER 230, ambas comercializadas pala eDAQ. Foi utilizado microchip de vidro modelo T35100C4D (*Micronit Microfluidics*, Holanda). Este microchip possui canal com largura de 100 μm, comprimento total de 45 mm), além de conter já integrados eletrodos para C^4D confeccionados em Pt/Ta. Uma mistura de FRU, GLI e SAC (5 mmol/L cada) foi introduzida no canal de separação utilizando injeção eletrocinética no modo *floating* sob potencial de 500 V por 10 s. A separação foi realizada utilizando tampão $NaOH/Na_2HPO_4$ 75/10 mmol/L (pH 12,4) sob potenciais de 800 e 1000 V. A detecção foi realizada sob aplicação de um sinal alternado com 200 kHz e 20 V_{pp} de frequência e amplitude, respectivamente.

Resultados e discussão: Devido à natureza neutra dos carboidratos a análise destes por eletroforese se torna um desafio. A utilização de um pH fortemente alcalino (> 12) têm sido uma estratégia empregada, uma vez que garante a ionização destas espécies, eliminado laboriosas etapas de reações de derivatização para tornar estas espécies carregadas. Para isso, foi utilizado um eletrólito composto por NaOH 75 mmol/L. A adição de 10 mmol/l ao eletrólito têm por função aumentar a força iônica do eletrólito colaborando para uma melhora na resolução de separação entre o par FRU e GLI que em algumas condições não são separados. Mesmo que nestas condições os carboidratos apresentam carga negativa, a separação foi realizada em polaridade positiva. Isso é possível devido à baixa mobilidade eletroforética dos carboidratos, fazendo com que sejam carregados em direção ao detector pela mobilidade eletrosmótica, que é bem maior que a mobilidade das espécies. A figura 1 mostra os eletroferogramas obtidos para a separação de uma mistura equimolar de FRU, GLI e SAC (5 mmol/L). Para a separação foram testadas duas condições de potenciais de separação. Na primeira (Fig. 1A) foi utilizada 800 V onde foi obtida a separação com boa resolução do par FRU e GLI com um tempo de análise cerca de 125 s. Afim de reduzir o tempo de análise aumentou-se o potencial de separação para 1000 V (Fig. 1B). O aumento do potencial levou à redução no tempo de análise para cerca de 90 s e ainda assim não comprometeu a resolução de separação do par FRU e GLI.

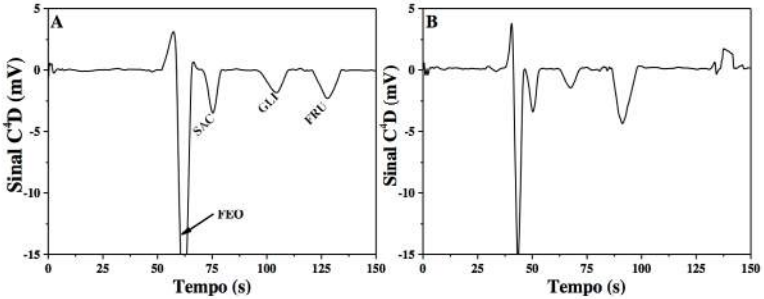


Figura 1 - Eletroferogramas obtidos para a separação de FRU, GLI e SAC (5 mmol/L cada) em tampão NaOH 75 mmol/L com adição de 10 mmol/L de Na_2HPO_4. Em (A) o potencial de separação aplicado foi de 800 V e (B) 1000 V. Injeção modo floating 500 V / 10s e separação à 800V. Detecção à 200 kHz e 20 Vpp de amplitude. Microchip: 45 mm.

Conclusões: A metodologia proposta se mostrou favorável para separação de carboidratos, sendo obtida a separação de FRU, GLI e SAC em um tempo inferior à 2 min. As próximas etapas estarão voltadas validação analítica da metodologia para análises quantitativas.

Referências

[1] Alexandre Z. Carvalho *et al*, Electrophoresis, **24**, 2138 (2003).
[2] I Molnár-Perl, J. Chromatogr. A, **891**, 1 (2000).
[3] Jatisai Tanyanyiwa *et al*, Electrophoresis, **25**, 903 (2004).

Agradecimentos

PETROBRAS, CNPq e INCTBio.

Sistemas multifásicos em dispositivos de microfluidica: determinação da vazão real das fases

Ana Letícia Rodrigues Costa, Andresa Gomes, Rosiane Lopes da Cunha

analeticiarc@yahoo.com; andresagomes84@gmail.com; lc.rosiane@gmail.com

Resumo

O objetivo deste trabalho foi determinar a vazão real das fases em microcanais planares pelo método desenvolvido por Steegmans et al. (2009), adaptado para a geometria flow-focusing. Os valores das vazões reais foram similares aos nominais em baixas vazões, porém menores em elevadas vazões. Estes menores valores das vazões reais foram associados com as pequenas dimensões dos canais e as forças envolvidas no processo de formação de gotas no mecanismo flow-focusing. Desta forma, concluiu-se que a partir de uma vazão máxima de escoamento nos dispositivos de microfluidica não há mais variação da velocidade das fases.

Palavras-Chaves: *vazão nominal,variável de processo, fluidos, velocidade.*

Introdução: Com o avanço da microfluidica na formação de partículas, mais estudos visando a mudança de escala são essenciais para a implementação desta tecnologia industrialmente e, para isso, é necessário ter maior controle das variavéis de processo. A vazão de entrada das fases é uma variável de processo controlada por bombas de deslocamento positivo (tipo seringa), responsável pela injeção de entrada dos fluidos nos dispositivos microfluídicos. Poucos estudos foram feitos para verificar se as velocidades nominais das bombas são as velocidades reais que os fluidos adquirem dentro dos dispositivos, de forma a determinar as limitações do processo e o comportamento dos fluidos através do cálculo mais exato dos números adimensionais. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi determinar a vazão real das fases dentro do dispositivo de microfluídica.

Procedimento experimental: Microcanais com mecanismo *flow-focusing* foram projetados em AutoCAD 2012 (Autodesk, EUA) e produzidos em polidimetilsiloxano (PDMS) pela técnica de litografia macia. Estes foram conectados a três bombas seringa (PHD22/2000, Havard Apparatus, EUA) para o bombeamento das fases para o interior dos canais. Foi estudado o sistema com a fase contínua formada por óleo de soja (Bunge Alimentos, Brasil) adicionada de 4% m/m do emulsificante polirricinoleato de poliglicerol (PGPR) (Danisco, Dinamarca) e como fase dispersa água e solução aquosa de goma gelana 0,6% m/m (Kelco, EUA). A vazão de entrada da fase dispersa variou de 0,5 a 3,0μL/min e a vazão da fase contínua variou de 1,0 a 6,0 μL/min. Determinou-se a velocidade real das fases pelo método desenvolvido por Steegmans et al. (2009), adaptado para a geometria *flow-focusing*, com imagens obtidas em microscópio Multizoom AZ100 (Nikon, Japão).

Resultados e discussão: A Figura 1 mostra as vazões nominais ($Q_{nominal}$) e reais (Q_{real}) das fases dispersa e contínua instantes depois da junção dos canais. A vazão nominal variou entre 2,0 e 6,0 μL/min para a fase contínua e entre 1,0 e 3,0 μL/min para a fase dispersa. Em baixas vazões de fase contínua ($Q_{c\ nominal}$= 1,0-2,0 μL/min) e fase dispersa ($Q_{d\ nominal}$= 1,0-2,0 μL/min) os valores reais e nominais foram similares. Em altas vazões de fase contínua ($Q_{c\ nominal}$= 3,0-6,0 μL/min) e fase dispersa ($Q_{d\ nominal}$= 2,5-3,0 μL/min) a velocidade dos fluidos dentro dos microcanais apresentaram valores de vazão real menores que o valor da vazão nominal. O estudo realizado por Steegmans et al. (2009) mostrou que as vazões reais em dispositivos microfluídicos de junção em Y foram diferentes daquelas aplicadas na bomba, provavelmente devido a uma significativa queda de pressão no dispositivo de microfluídica. Neste trabalho, a diferença dos valores das vazões reais comparados com as vazões nominais podem ser associados a dois fatores. O primeiro fator está relacionado às pequenas dimensões dos canais que restringe o volume de fluido escoando dentro dos dispositivos de microfluidica levando a um valor de vazão máxima, pois acima deste valor a vazão real é mantida praticamente constante independente da vazão aplicada.

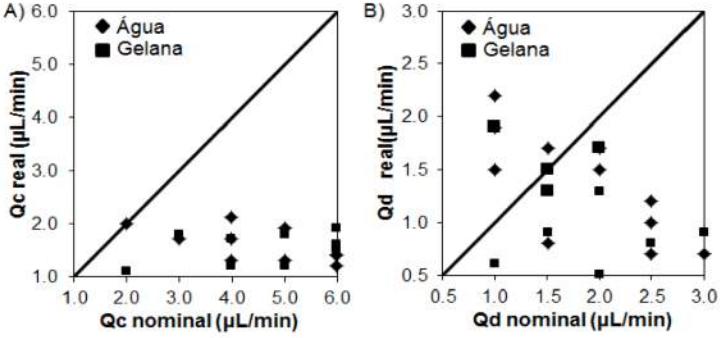


Figura 1. Vazões nominais e reais da A) fase contínua e B) fase dispersa instantes depois da junção dos canais

As forças envolvidas no processo de formação de gotas no mecanismo *flow-focusing* é a segunda limitação. O encontro das correntes da fase contínua atuam como uma "parede" que bloqueia a passagem da fase dispersa ocasionando o decréscimo da velocidade. Além das forças interfaciais e de cisalhamento ($\overrightarrow{F_{friction}}$), o impacto entre as fases ($\overrightarrow{F_{impact}}$) gera uma força contrária à força de deslocamento positiva aplicada pela bomba ($\overrightarrow{F_{pump}}$) durante a formação das gotas (Figura 2). Esses fatores levam a um aumento da pressão (*increase pressure*) na entrada do dispositivo de microfluidica. Quando a vazão real é menor que a vazão nominal ocorre um acúmulo no fluido injetado, levando à expansão das mangueiras de silicone e, em alguns casos, o rompimento do canal.

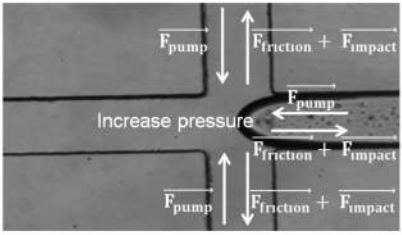


Figura 2. Forças atuantes na junção dos canais

Conclusões: Conclui-se que a vazão real apresenta valores similares em baixas vazões nominais de escoamento e que a partir de uma vazão máxima de escoamento nos dispositivos de microfluidica praticamente não há mais variação da vazão das fases devido às pequenas dimensões dos canais e às forças envolvidas no processo de formação de gotas no mecanismo *flow-focusing*.

Referências e agradecimentos:

Referências: STEEGMANS, M. L. J. et al. Dynamic Interfacial Tension Measurements with Microfluidic Y-Junctions. **Langmuir**, v. 25, n. 17, p. 9751-9758, 2009.

Agradecimentos: Agradecemos o apoio técnico do Professor Angelo Gobbi e da Maria Helena de Oliveira Piazzeto e a infraestrutura do Laboratório de Microfabricação do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Também gostaríamos de agradecer ao apoio financeiro da FAPESP (2011/06.083-0) e do CNPQ.