

VI Workshop em Microfluídica

20 a 22 de julho de 2016 Campinas, São Paulo

Livro de Resumos

Patrocínio Realização













Apresentação	2
Programação	4
Resumos	7

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 VI Workshop em Microfluídica será importante para acompanhar os avanços nessa área.

O Workshop

O VI Workshop em Microfluídica 2016 será realizado entre os dias 20 e 22 de julho de 2016, no Centro de Convenções da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A escolha dos três dias de programação tem como objetivo incentivar, aprimorar e amplificar a discussão dos trabalhos, a troca de experiências e colaborações envolvendo grupos de pesquisas e o setor industrial. Atendendo à crescente demanda da comunidade de sensores químicos, também aceitamos trabalhos voltados para o desenvolvimento e a aplicação dessas plataformas.

Programação

09:00 - 09:15 Recepção dos participantes e entrega de material 09:15 - 09:30 Abertura do VI Workshop em Microfluídica 09:30 - 10:30 Lab, Cells and Organ on a Chip Dr. Albert van den Berg (University of Twente, The Netherlands) 10:30 - 11:00 Sensores colorimétricos, sistemas eletroforéticos e dispositivos eletroanalíticos em plataformas de papel Dr. Wendell K. T. Coltro (Universidade Federal de Goiás, UFG) 11:00 - 11:30 Transferência de Calor e Massa em Microssistemas: Problemas Direto, Inverso e Medidas não-Intrusivas Dra. Carolina P. N. Cotta (Universidade Federal do Rio de Janeiro - COPPE/UFRJ) 11:30 - 11:50 Turbulência em microfluídica: fabricação, caracterização e aplicações Camila L. Camargo (LNNano, CNPEM) 11:50 - 12:10 Microfluídic devices combining dielectrophoresis trapping and Surface Enhanced Raman Spectroscopy Gabriela Brito Almeida (IQ-Unicamp) 12:10 - 12:30 Liquid-liquid partial solvent extraction using a 3D flow focalization device Houari Cobas Gomez (IPT-SP) 12:30 - 14:00 Almoço 14:00 - 14:30 Ultra-Highly Sensitive Electrical Detection of Breast Cancer Biomarkers Using Graphene Field Effect Transistors Decorated with Metal Nanoparticles Dra. Cecilia C. C. Silva (MackGraphe-Graphene and Nanomaterials Research Center, Mackenzie Presbyterian University, São Paulo) 14:30 - 15:00 Integrando papel e sensores químicos visando à aplicação nos setores forense, alimentício e ambiental Dr. Thiago R. L. C. Paixão (IQ, USP-SP) 15:00 - 15:20 Miniaturização de bioeletrodos implantáveis baseados em fibras de carbono para biocélula a combustível de glicose/O2 Fernanda C. P. F. Sales (IQSC, USP) Fabrication of Conductive Tracks Using 3D Printing Technology Gabriel Gaal (IFGW-Unicamp) 15:40 - 17:00 Apresentação de Pôsteres e Coffee-Break		20 de Julho	
09:15 - 09:30 Abertura do VI Workshop em Microfluídica 09:30 - 10:30 Lab, Cells and Organ on a Chip Dr. Albert van den Berg (University of Twente, The Netherlands) 10:30 - 11:00 Sensores colorimétricos, sistemas eletroforéticos e dispositivos eletroanalíticos em plataformas de papel Dr. Wendell K. T. Coltro (Universidade Federal de Goiás, UFG) 11:00 - 11:30 Transferência de Calor e Massa em Microssistemas: Problemas Direto, Inverso e Medidas não-Intrusivas Dra. Carolina P. N. Cotta (Universidade Federal do Rio de Janeiro - COPPE/UFRJ) 11:30 - 11:50 Turbulência em microfluídica: fabricação, caracterização e aplicações Camila L. Camargo (LNNano, CNPEM) 11:50 - 12:10 Microfluídic devices combining dielectrophoresis trapping and Surface Enhanced Raman Spectroscopy Gabriela Brito Almeida (IQ-Unicamp) 12:10 - 12:30 Liquid-liquid partial solvent extraction using a 3D flow focalization device Houari Cobas Gomez (IPT-SP) 12:30 - 14:00 Almoço 14:00 - 14:30 Ultra-Highly Sensitive Electrical Detection of Breast Cancer Biomarkers Using Graphene Field Effect Transistors Decorated with Metal Nanoparticles Dra. Cecilia C. C. Silva (MackGraphe-Graphene and Nanomaterials Research Center, Mackenzie Presbyterian University, São Paulo) 14:30 - 15:00 Integrando papel e sensores químicos visando à aplicação nos setores forense, alimentício e ambiental Dr. Thiago R. L. C. Paixão (IQ, USP-SP) 15:00 - 15:20 Miniaturização de bioeletrodos implantáveis baseados em fibras de carbono para biocélula a combustível de			
10:30 - 10:30 Lab, Cells and Organ on a Chip Dr. Albert van den Berg (University of Twente, The Netherlands) 10:30 - 11:00 Sensores colorimétricos, sistemas eletroforéticos e dispositivos eletroanalíticos em plataformas de papel Dr. Wendell K. T. Coltro (Universidade Federal de Goiás, UFG) 11:00 - 11:30 Transferência de Calor e Massa em Microssistemas: Problemas Direto, Inverso e Medidas não-Intrusivas Dra. Carolina P. N. Cotta (Universidade Federal do Rio de Janeiro – COPPE/UFRJ) 11:30 - 11:50 Turbulência em microfluídica: fabricação, caracterização e aplicações Camila L. Camargo (LNNano, CNPEM) 11:50 - 12:10 Microfluídic devices combining dielectrophoresis trapping and Surface Enhanced Raman Spectroscopy Gabriela Brito Almeida (IQ-Unicamp) 12:10 - 12:30 Liquid-liquid partial solvent extraction using a 3D flow focalization device Houari Cobas Gomez (IPT-SP) 12:30 - 14:00 Almoço 14:00 - 14:30 Ultra-Highly Sensitive Electrical Detection of Breast Cancer Biomarkers Using Graphene Field Effect Transistors Decorated with Metal Nanoparticles Dra. Cecilia C. C. Silva (MackGraphe-Graphene and Nanomaterials Research Center, Mackenzie Presbyterian University, São Paulo) 14:30 - 15:00 Integrando papel e sensores químicos visando à aplicação nos setores forense, alimentício e ambiental Dr. Thiago R. L. C. Paixão (IQ, USP-SP) Miniaturização de bioeletrodos implantáveis baseados em fibras de carbono para biocélula a combustível de glicose/O ₂ Fernanda C. P. F. Sales (IQSC, USP) 15:20 - 15:40 Fabrication of Conductive Tracks Using 3D Printing Technology Gabriel Gaal (IFGW-Unicamp)	09:00 - 09:15	Recepção dos participantes e entrega de material	
Dr. Albert van den Berg (University of Twente, The Netherlands) 10:30 - 11:00 Sensores colorimétricos, sistemas eletroforéticos e dispositivos eletroanalíticos em plataformas de papel Dr. Wendell K. T. Coltro (Universidade Federal de Goiás, UFG) 11:00 - 11:30 Transferência de Calor e Massa em Microssistemas: Problemas Direto, Inverso e Medidas não-Intrusivas Dra. Carolina P. N. Cotta (Universidade Federal do Rio de Janeiro – COPPE/UFRJ) 11:30 - 11:50 Turbulência em microfluídica: fabricação, caracterização e aplicações Camila L. Camargo (LNNano, CNPEM) Microfluídic devices combining dielectrophoresis trapping and Surface Enhanced Raman Spectroscopy Gabriela Brito Almeida (IQ-Unicamp) 12:10 - 12:30 Liquid-liquid partial solvent extraction using a 3D flow focalization device Houari Cobas Gomez (IPT-SP) 12:30 - 14:00 Almoço 14:00 - 14:30 Ultra-Highly Sensitive Electrical Detection of Breast Cancer Biomarkers Using Graphene Field Effect Transistors Decorated with Metal Nanoparticles Dra. Cecilia C. C. Silva (MackGraphe-Graphene and Nanomaterials Research Center, Mackenzie Presbyterian University, São Paulo) 14:30 - 15:00 Integrando papel e sensores químicos visando à aplicação nos setores forense, alimentício e ambiental Dr. Thiago R. L. C. Paixão (IQ, USP-SP) 15:00 - 15:20 Miniaturização de bioeletrodos implantáveis baseados em fibras de carbono para biocélula a combustível de glicose/O ₂ Fernanda C. P. F. Sales (IQSC, USP) Fabrication of Conductive Tracks Using 3D Printing Technology Gabriel Gaal (IFGW-Unicamp)	09:15 - 09:30	Abertura do VI Workshop em Microfluídica	
dispositivos eletroanalíticos em plataformas de papel Dr. Wendell K. T. Coltro (Universidade Federal de Goiás, UFG) 11:00 - 11:30 Transferência de Calor e Massa em Microssistemas: Problemas Direto, Inverso e Medidas não-Intrusivas Dra. Carolina P. N. Cotta (Universidade Federal do Rio de Janeiro – COPPE/UFRJ) 11:30 - 11:50 Turbulência em microfluídica: fabricação, caracterização e aplicações Camila L. Camargo (LNNano, CNPEM) 11:50 - 12:10 Microfluidic devices combining dielectrophoresis trapping and Surface Enhanced Raman Spectroscopy Gabriela Brito Almeida (IQ-Unicamp) 12:10 - 12:30 Liquid-liquid partial solvent extraction using a 3D flow focalization device Houari Cobas Gomez (IPT-SP) 12:30 - 14:00 Almoço 14:00 - 14:30 Ultra-Highly Sensitive Electrical Detection of Breast Cancer Biomarkers Using Graphene Field Effect Transistors Decorated with Metal Nanoparticles Dra. Cecilia C. C. Silva (MackGraphe-Graphene and Nanomaterials Research Center, Mackenzie Presbyterian University, São Paulo) 14:30 - 15:00 Integrando papel e sensores químicos visando à aplicação nos setores forense, alimentício e ambiental Dr. Thiago R. L. C. Paixão (IQ, USP-SP) Miniaturização de bioeletrodos implantáveis baseados em fibras de carbono para biocélula a combustível de glicose/O ₂ Fernanda C. P. F. Sales (IQSC, USP) Fabrication of Conductive Tracks Using 3D Printing Technology Gabriel Gaal (IFGW-Unicamp)	09:30 - 10:30	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
Problemas Direto, Inverso e Medidas não-Intrusivas Dra. Carolina P. N. Cotta (Universidade Federal do Rio de Janeiro – COPPE/UFRJ) 11:30 - 11:50 Turbulência em microfluídica: fabricação, caracterização e aplicações Camila L. Camargo (LNNano, CNPEM) 11:50 - 12:10 Microfluidic devices combining dielectrophoresis trapping and Surface Enhanced Raman Spectroscopy Gabriela Brito Almeida (IQ-Unicamp) 12:10 - 12:30 Liquid-liquid partial solvent extraction using a 3D flow focalization device Houari Cobas Gomez (IPT-SP) 12:30 - 14:00 Almoço 14:00 - 14:30 Ultra-Highly Sensitive Electrical Detection of Breast Cancer Biomarkers Using Graphene Field Effect Transistors Decorated with Metal Nanoparticles Dra. Cecilia C. C. Silva (MackGraphe-Graphene and Nanomaterials Research Center, Mackenzie Presbyterian University, São Paulo) 14:30 - 15:00 Integrando papel e sensores químicos visando à aplicação nos setores forense, alimentício e ambiental Dr. Thiago R. L. C. Paixão (IQ, USP-SP) 15:00 - 15:20 Miniaturização de bioeletrodos implantáveis baseados em fibras de carbono para biocélula a combustível de glicose/O ₂ Fernanda C. P. F. Sales (IQSC, USP) Fabrication of Conductive Tracks Using 3D Printing Technology Gabriel Gaal (IFGW-Unicamp)	10:30 - 11:00	dispositivos eletroanalíticos em plataformas de papel	
aplicações Camila L. Camargo (LNNano, CNPEM) 11:50 - 12:10 Microfluidic devices combining dielectrophoresis trapping and Surface Enhanced Raman Spectroscopy Gabriela Brito Almeida (IQ-Unicamp) 12:10 - 12:30 Liquid-liquid partial solvent extraction using a 3D flow focalization device Houari Cobas Gomez (IPT-SP) 12:30 - 14:00 Almoço Ultra-Highly Sensitive Electrical Detection of Breast Cancer Biomarkers Using Graphene Field Effect Transistors Decorated with Metal Nanoparticles Dra. Cecilia C. C. Silva (MackGraphe-Graphene and Nanomaterials Research Center, Mackenzie Presbyterian University, São Paulo) 14:30 - 15:00 Integrando papel e sensores químicos visando à aplicação nos setores forense, alimentício e ambiental Dr. Thiago R. L. C. Paixão (IQ, USP-SP) 15:00 - 15:20 Miniaturização de bioeletrodos implantáveis baseados em fibras de carbono para biocélula a combustível de glicose/O ₂ Fernanda C. P. F. Sales (IQSC, USP) Fabrication of Conductive Tracks Using 3D Printing Technology Gabriel Gaal (IFGW-Unicamp)	11:00 - 11:30	Problemas Direto, Inverso e Medidas não-Intrusivas Dra. Carolina P. N. Cotta (Universidade Federal do Rio de Janeiro –	
and Surface Enhanced Raman Spectroscopy Gabriela Brito Almeida (IQ-Unicamp) 12:10 - 12:30 Liquid-liquid partial solvent extraction using a 3D flow focalization device Houari Cobas Gomez (IPT-SP) 12:30 - 14:00 Almoço 14:00 - 14:30 Ultra-Highly Sensitive Electrical Detection of Breast Cancer Biomarkers Using Graphene Field Effect Transistors Decorated with Metal Nanoparticles Dra. Cecilia C. C. Silva (MackGraphe-Graphene and Nanomaterials Research Center, Mackenzie Presbyterian University, São Paulo) 14:30 - 15:00 Integrando papel e sensores químicos visando à aplicação nos setores forense, alimentício e ambiental Dr. Thiago R. L. C. Paixão (IQ, USP-SP) 15:00 - 15:20 Miniaturização de bioeletrodos implantáveis baseados em fibras de carbono para biocélula a combustível de glicose/O ₂ Fernanda C. P. F. Sales (IQSC, USP) 15:20 - 15:40 Fabrication of Conductive Tracks Using 3D Printing Technology Gabriel Gaal (IFGW-Unicamp)	11:30 - 11:50	aplicações	
focalization device Houari Cobas Gomez (IPT-SP) 12:30 - 14:00 Almoço 14:00 - 14:30 Ultra-Highly Sensitive Electrical Detection of Breast Cancer Biomarkers Using Graphene Field Effect Transistors Decorated with Metal Nanoparticles Dra. Cecilia C. C. Silva (MackGraphe-Graphene and Nanomaterials Research Center, Mackenzie Presbyterian University, São Paulo) 14:30 - 15:00 Integrando papel e sensores químicos visando à aplicação nos setores forense, alimentício e ambiental Dr. Thiago R. L. C. Paixão (IQ, USP-SP) 15:00 - 15:20 Miniaturização de bioeletrodos implantáveis baseados em fibras de carbono para biocélula a combustível de glicose/O ₂ Fernanda C. P. F. Sales (IQSC, USP) 15:20 - 15:40 Fabrication of Conductive Tracks Using 3D Printing Technology Gabriel Gaal (IFGW-Unicamp)	11:50 - 12:10	and Surface Enhanced Raman Spectroscopy	
14:00 - 14:30 Ultra-Highly Sensitive Electrical Detection of Breast Cancer Biomarkers Using Graphene Field Effect Transistors Decorated with Metal Nanoparticles Dra. Cecilia C. C. Silva (MackGraphe-Graphene and Nanomaterials Research Center, Mackenzie Presbyterian University, São Paulo) 14:30 - 15:00 Integrando papel e sensores químicos visando à aplicação nos setores forense, alimentício e ambiental Dr. Thiago R. L. C. Paixão (IQ, USP-SP) 15:00 - 15:20 Miniaturização de bioeletrodos implantáveis baseados em fibras de carbono para biocélula a combustível de glicose/O ₂ Fernanda C. P. F. Sales (IQSC, USP) 15:20 - 15:40 Fabrication of Conductive Tracks Using 3D Printing Technology Gabriel Gaal (IFGW-Unicamp)	12:10 - 12:30	focalization device	
Cancer Biomarkers Using Graphene Field Effect Transistors Decorated with Metal Nanoparticles Dra. Cecilia C. C. Silva (MackGraphe-Graphene and Nanomaterials Research Center, Mackenzie Presbyterian University, São Paulo) 14:30 - 15:00 Integrando papel e sensores químicos visando à aplicação nos setores forense, alimentício e ambiental Dr. Thiago R. L. C. Paixão (IQ, USP-SP) 15:00 - 15:20 Miniaturização de bioeletrodos implantáveis baseados em fibras de carbono para biocélula a combustível de glicose/O ₂ Fernanda C. P. F. Sales (IQSC, USP) 15:20 - 15:40 Fabrication of Conductive Tracks Using 3D Printing Technology Gabriel Gaal (IFGW-Unicamp)	12:30 - 14:00	Almoço	
nos setores forense, alimentício e ambiental Dr. Thiago R. L. C. Paixão (IQ, USP-SP) 15:00 - 15:20 Miniaturização de bioeletrodos implantáveis baseados em fibras de carbono para biocélula a combustível de glicose/O ₂ Fernanda C. P. F. Sales (IQSC, USP) 15:20 - 15:40 Fabrication of Conductive Tracks Using 3D Printing Technology Gabriel Gaal (IFGW-Unicamp)	14:00 - 14:30	Cancer Biomarkers Using Graphene Field Effect Transistors Decorated with Metal Nanoparticles Dra. Cecilia C. C. Silva (MackGraphe-Graphene and Nanomaterials	
fibras de carbono para biocélula a combustível de glicose/O ₂ Fernanda C. P. F. Sales (IQSC, USP) 15:20 - 15:40 Fabrication of Conductive Tracks Using 3D Printing Technology Gabriel Gaal (IFGW-Unicamp)	14:30 - 15:00	nos setores forense, alimentício e ambiental	
Technology Gabriel Gaal (IFGW-Unicamp)	15:00 - 15:20	fibras de carbono para biocélula a combustível de glicose/ ${\cal O}_2$	
15:40 - 17:00 Apresentação de Pôsteres e Coffee-Break	15:20 - 15:40	Technology	
	15:40 - 17:00	Apresentação de Pôsteres e Coffee-Break	

	21 de Julho	
09:00 - 10:00	Nanossensores fluorescentes baseados em sílica de Stöber Dr. Ivo M. Raimundo Jr. (IQ-Unicamp)	
10:00 - 10:30	On-Chip Graphene for Electrochemical Devices Dr. Frank N. Crespilho (IQSC, USP)	
10:30 - 11:00	Triboelectric effect as a novel tool for the development and reversible sealing of paper-based analytical devices Dr. Everson Thiago Santos Gerôncio da Silva (IQ-UNICAMP)	
11:00 - 11:20	Gravity-assisted distillation on a chip: a novel concept for sample preparation in microfluidics Gabriela F. Giordano (LNNano, CNPEM)	
11:20 - 11:40	A Simple and Sensitive Paper-Based Device Coupling Electrochemical Sample Pre-Treatment and Colorimetric Detection Thalita G. Silva (IQ-USP, SP)	
11:40 - 12:00	Dispositivo microfluídico baseado em gradiente de concentração convectivo para o crescimento de células bacterianas Franciele Flores Vit (FEQ-Unicamp)	
12:00 - 14:00	Almoço	
14:00 - 14:30	Auto-Organização Hierárquica de Peptídeos: das Moléculas aos Nanomateriais Dr. Wendel Alves (UFABC)	
14:30 - 14:50	Dispositivos microfluídicos autorregeneráveis e híbridos irreversíveis/reversíveis Letícia S. Shiroma (LNNano, CNPEM)	
14:50 - 15:10	Ex vivo study of the adhesion and growth of Xylella fastidiosa in artificial microenvironments Jacobo Hernandez-Montelongo (IFI-Unicamp).	
15:10 - 15:30	Dispositivo microfluídico para aplicação em sensores SPR Johny Paulo Monteiro (UEM)	
15:30 - 17:00	Apresentação de Pôsteres e Coffee-Break	

22 de Julho				
09:00 - 10:00	Assembled Microfluidic Platforms and Moonshine Dr. Carlos D. Garcia (Clemson University, SC, USA)			
10:00 - 10:20	Método sem malha de SPH em aplicações de microfluídica Hugo Sakai Idagawa (FEM-Unicamp)			
10:20 - 10:40	Determinação de Fe (III) por imagens digitais para estudo de corrosão de placas metálicas usando microssistemas a base de poliestireno Juliano Passaretti Filho (UNESP)			
10:40 - 11:00	Microfluídica aplicada à obtenção de microcápsulas com flexibilidade ajustável Debora F. Nascimento (PUC-Rio)			
11:00 - 12:00	Encerramento Premiação e Apresentação do 7º Workshop em Microfluídica			
12:00 - 14:00	Almoço			
14:00 - 17:00	Minicursos Minicurso: Microfluídica no COMSOL Multiphysics (COMSOL). Local: Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, Bloco B – Sala de Informática – 2º Piso – Sala 3. Minicurso: Fluidodinâmica de Sistemas de Microfluídica Monofásico – Prof. Dr. Osvaldir Pereira Taranto Local: Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, Bloco D – Auditório – 2º Piso.			



VI Workshop em Microfluídica

20 a 22 de julho de 2016 Campinas, São Paulo

Resumos

Patrocínio

Realização













Avaliação do uso de imagens obtidas por uma *webcam* para a detecção óptica em microssistemas de análise em fluxo

Alexandre Fonseca, Hadassa de Souza R. P. Moura, Gerson Francisco da Silva Neto

afonseca@unb.br; gerson-sn@hotmail.com, had.miudinha@gmail.com

Resumo: Este trabalho descreve a realização de medidas ópticas na região visível do espectro empregando-se uma webcam para a detecção do sinal analítico e a avaliação desta estratégia na determinação de paracetamol em medicamentos por supressão de quimiluminescência, determinação da dureza de águas minerais por fluorescência molecular e determinação de sulfato ferroso em vitamínicos por absorção molecular. Um programa de computador, escrito em Visual Studio 2013, permitiu a detecção contínua dos parâmetros R, G e B de imagens de regiões específicas das células de detecção, previamente selecionadas pelo usuário, e o registro dos sinais transientes para estes parâmetros. Para todas as aplicações foram observadas elevadas correlações (R²>0,99) entre as concentrações estudadas e a altura dos picos e precisões adequadas para as determinações (< 8%,) não sendo observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos para as concentrações nas amostras na comparação entre os métodos propostos e os métodos de referência empregados.

Palavras-Chaves: imagens digitais; microssistemas de análise em fluxo; detecção óptica

Introdução: A detecção óptica em microssistemas de análise em fluxo pode ser considerada um desafio no que se refere à portabilidade dos dispositivos e aos custos necessários para a sua implementação. Parte desta dificuldade está relacionada à necessidade de arranjos ópticos, algumas vezes complexos, que permitam medir as interações da radiação eletromagnética com a matéria nos pequenos canais, o que torna o sistema analítico, como um todo, pouco portátil e ampliam a necessidade de materiais mais onerosos. Paralelamente, tem sido demonstrado que parâmetros de imagens digitais, como a do sistema de cores RGB podem ser utilizados para medidas analíticas qualitativas e quantitativas com desempenho adequado para muitas aplicações. Porém, em sistemas microfluídicos de análise, esta estratégia é ainda pouco explorada e quase sempre limitada a medidas colorimétricas de sensores imobilizados sobre o substrato de fabricação do dispositivo e não a medidas em fluxo contínuo. Nesse contexto, o presente trabalho relata o desenvolvimento e avaliação de uma estratégia de detecção por imagens que permita realizar medidas de quimiluminescência, fluorescência e absorção molecular em microssistemas de análise em fluxo contínuo baseada em imagens digitais obtidas com uma webcam, tornando o sistema de detecção mais compacto e de menor custo.

Procedimento experimental: Microssistemas de análise em fluxo com células de detecção específicas para as determinações foram desenvolvidos em resiste de Uretano-Acrilato por fotolitografia profunda no ultravioleta¹. Os dispositivos foram alocados em uma pequena caixa escura e conectados à válvulas solenoides e à uma bomba peristáltica para controle do fluxo das soluções de trabalho. Uma webcam de uso geral (Multilaser) foi adaptada na parte superior da caixa escura e alinhada com a célula de detecção do microdispositivo à uma distância de aproximadamente 1,0 cm acima do microssistema. Medidas de supressão da quimiluminescência do sistema luminol/hipoclorito foram utilizadas para a determinação do fármaco acetoaminofeno (paracetamol) em formulações farmacêuticas injetando-se paralelamente soluções do analito (100 a 500 mg L⁻¹) e de hipoclorito de sódio (500 mg L⁻¹) com posterior confluência da mistura com uma solução de luminol (2,0 mmol L⁻¹ em pH 11). Para a determinação fluorimétrica da dureza de águas minerais utilizou-se um LED azul (470 nm) como fonte de excitação e fibras ópticas plásticas (diâmetro de 250 µm) para guiar esta radiação à célula de detecção. Amostras e padrões de Ca²⁺ (125 a 625 µmol L⁻¹) foram injetados no dispositivo paralelamente à uma solução de calceína (500 mg L⁻¹ em KOH 0,02 mol L⁻¹), sendo o segmento carregado por uma solução de KOH 0,02 mol L⁻¹ até a célula de detecção. Medidas de absorção molecular na região do visível foram empregadas para a determinação de sulfato ferroso em vitamínico. Para isto, um LED azul (470 nm) foi posicionado abaixo do microdispositivo fluídico, alinhado com a célula de detecção e com a webcam. Soluções das amostras e de padrões de Fe²⁺ (5,0 a 25,0 mg L⁻¹) foram injetadas de forma paralela com uma solução de 1,10 -fenantrolina (0,1 % em pH 4,5) e carregadas com uma solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ até a célula de detecção. Um programa de computador para sistema operacional Windows foi desenvolvido em Visual Studio 2013 para o controle do sistema fluídico e detecção do sinal RGB das imagens de forma contínua. Neste programa, o usuário préseleciona a área da célula de detecção do microssistema a ser monitorada e o número de medidas a serem realizadas para obtenção de um sinal médio que represente cada ponto da medida.

Resultados e discussão: A seleção de regiões específicas da imagem das células de detecção possibilitou o registro de sinais analíticos úteis para todas as aplicações propostas. Para a determinação de paracetamol por quimiluminescência, a componente B das imagens proporcionou a melhor resposta, com linha de base estável, boa linearidade para a faixa estudada (R² = 0.997), precisão de 8,0 % para injeções sucessivas do padrão menos concentrado e erros relativos menores que 5,5 % na comparação do método proposto com os valores descritos nos rótulos dos medicamentos. Para a determinação fluorimétrica da dureza de águas minerais, a componente G proporcionou a melhor resposta analítica. Ajustando-se parâmetros da webcam como brilho e saturação foi possível manter a linha de base em zero de sinal, indicando a ausência de efeitos decorrentes da radiação espúria de excitação (LED azul). A curva analítica apresentou linearidade adequada (R²= 0,993) com precisão de 2,2 % para cinco injeções do padrão com 375 µmol L⁻¹ de Ca²⁺. Para todas as seis amostras de águas minerais analisadas foram determinados erros relativos menores que 5,0 % ao se comparar as durezas encontradas pelo método proposto com aquelas determinadas por volumetria de complexação. Para a determinação de sulfato ferroso em vitamínicos, a componente B da imagem foi monitorada durante as medidas sendo observada a sua atenuação transiente causada pela absorção da radiação do LED pelo complexo Fe(fenantrolina)3. Para esta determinação, ajustou-se o brilho do LED de forma a obter um sinal constante e elevado para a linha de base, o que permitiu a construção de uma curva analítica com linearidade adequada ($R^2 = 0.998$) e precisão de 6,0 % para injeções sucessivas de um padrão com 15,0 mg L^{-1} em Fe^{2+} . Erros relativos menores que 5,0 % foram obtidos para a determinação de sulfato ferroso em medicamentos, comparando-se o método proposto com a determinação por espectrofotometria UV/Vis.

Conclusões: O trabalho demonstrou que imagens digitais obtidas com uma webcam podem ser utilizadas para determinações analíticas baseadas em medidas de quimiluminescência, fluorescência e de absorção molecular realizadas em sistemas miniaturizados de fluxo contínuo. Para as determinações por fluorescência, foi constatado ainda que o ajuste dos parâmetros da imagem, previamente às leituras, permite eliminar o sinal de fundo da fonte de excitação, dispensando o uso de filtros ópticos para este propósito. Os estudos realizados indicaram também uma redução no tamanho do sistema de detecção como um todo, proporcionando um maior grau de portabilidade ao microssistema

Referências e agradecimentos:

Referências: [1] A. Fonseca, Anal. Chim. Acta 60 (2007).

Agradecimentos: Ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – processo 573894/2008-6), ao CNPq/PIBIC-UnB pela bolsa concedida e à CAPES pela bolsa concedida.

Produção contínua de micropartículas de alginato de cálcio por microfluídica de gotas

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

alinefurtado@feq.unicamp.br; reinaldo@cca.ufscar.br; latorre@feq.unicamp.br

Resumo: O objetivo deste trabalho foi empregar a microfluídica de gotas para produção de micropartículas de alginato de cálcio com potencial para encapsular biocatalisadores. A possibilidade de mistura de soluções numa única gota, torna esta tecnologia atraente para aplicações biotecnológicas. Diante disso, foi construído um sistema microfluídico com microcanais configurados em formato "T" para produção contínua de micropartículas de alginato de cálcio. Para formar as gotas, na fase dispersa foi usado uma mistura das soluções de alginato de sódio, água ultra-pura e solução de CaCl₂. Já na fase contínua foi usado óleo de milho com poliglicerol polirricinoleato (PGPR) que garantiu a quebra e estabilidade das gotas. Neste sistema, foram obtidas micropartículas de 115 µm e monodispersas. Como prova de conceito, foi adicionado à fase dispersa uma suspensão de células bacterianas e notado a eficácia de encapsulação, mostrando o potencial de aplicações desta técnica para área biotecnológica.

Palavras-Chaves: microfluídica de gotas; micropartículas; alginato de cálcio

Introdução: Microfluídica de gotas consiste na compartimentalização de reagentes usando um fluido contínuo, como uma fase oleosa, para encapsular pequenos volumes de reagentes aquosos em gotículas [1], [2]. Neste processo, são produzidos micropartículas de baixa polidispersidade, formato esférico e o tamanho controlado em função das vazões das fases, que nem sempre são obtidos facilmente pelos métodos convencionais [3], [4]. As geometrias dos microcanais podem ser configuradas para gerar a mistura de diferentes reagentes em uma única gota, a fim de avaliar reações químicas ou otimizar um processo de mistura [5]. Assim, as gotas geradas nos microcanais podem ser empregues para produzir micropartículas poliméricas com gelificação ainda nos microcanais. Além disso, é possível gerar uma produção contínua de micropartículas com encapsulação de agentes biológicos [4]. Desta forma, este trabalho teve como objetivo estudar a produção contínua de micropartículas de alginato de cálcio em sistema microfluídico de gotas com mistura de soluções e ainda, avaliar a possibilidade de encapsular células bacterianas nestas micropartículas.

Procedimento experimental: O dispositivo microfluídico de gotas foi configurado numa geometria de microcanais em formato de "T", em que a fase continua (Q_C) escoa no canal perpendicular à fase dispersa (Q_D) promovendo a quebra das gotas. Nesta geometria, a fase dispersa foi composta por uma junção de três microcanais, onde foram injetadas diferentes soluções, incluindo as soluções de alginato de sódio e o agente gelificante, que se unem num único canal até a intersecção com o canal da fase contínua. Posterior à esta região, as gotas formadas percorreram um canal em serpentina que promoveu a mistura entre as soluções presentes na gota, favorecendo o processo de gelificação no interior dos microcanais microfluídicos (Figura 1).

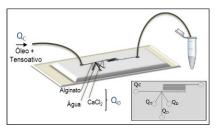


Figura 1: Esquema do dispositivo e geometria dos microcanais.

O dispositivo foi construído em poli dimetilsiloxano (PDMS) e a base em vidro, sendo produzido pela técnica de litografia macia, conforme a metodologia descrita por Duffy e McDonald (1998) [6]. Para induzir a formação de gotas e a gelificação de micropartículas de alginato foram empregados o óleo de milho com PGPR a 4 % (m/m) (58,5 mPa.s) na corrente contínua e, para a fase dispersa, a solução de alginato de sódio (2% m/v; 8,19 mPa.s), água ultra-pura (em substituição a uma possível suspensão celular) e solução de cloreto de cálcio (CaCl₂.2H₂O a 30 mM). A capacidade de formação de gotas estáveis foi analisada em função das razões de taxas de fluxo ($R = Q_D/Q_C$) e do número de Capilar (Ca), que indica as forças atuantes no processo de quebra. As vazões foram variadas entre 1 e 3 μ L/min para Q_C e entre 0,4 e 1,5 μ L/min, para Q_D . Após estabelecer as condições para geração de gotas, foram determinados o diâmetro médio e o coeficiente de variação (CV), em que indica a monodispersidade das micropartículas para um valor de CV menor do que 5% [7].

Como prova de conceito, foi inserido na corrente central da fase dispersa uma solução de suspensão celular de *Bacillus subtilis* NRRL B 14819 a uma concentração de 10⁶ cél/mL e avaliado o potencial de encapsulação nas micropartículas de alginato de cálcio.

Resultados e discussão: O estudo de regime de formação de gotas e potencial de mistura de gotas foi investigado inicialmente utilizando corantes nas soluções da fase dispersa, em que mudança das colorações ao longo dos microcanais mostra o potencial de mistura de soluções em gotas (Figura 2B). As diferentes razões entre taxas de fluxos estudadas apontaram para a formação de gotas em três diferentes regimes: *squeezing*, gotejamento e jateamento [8]–[10], sendo que formação de gotas estáveis é caracterizada pelo regime de gotejamento (Figura 2).

Neste estudo a região de gotejamento foi obtida em valores de R entre 0,3 e 0,6. Além disso, analisando a dinâmica de forças que atuam sobre o corte das gotas, dado pelo número

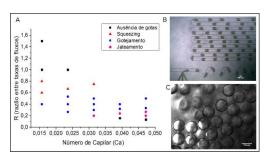


Figura 2: Estudo da capacidade de formação de gotas: A) regime de formação de gotas em função de R e Ca; B) regime de gotejamento e mistura de soluções observada com corantes nas soluções; C) produção de micropartículas de alginato no regime de gotejamento.

de Capilar (Ca), nota-se que o tamanho das gotas foi resultado de um equilíbrio de tensões interfaciais e viscosas, tendo um valor de Ca ≥ 0.02 (Figura 2A). Portanto, foi estabelecido a formação de gotas pelo regime de gotejamento empregando uma razão de taxa de fluxo de R = 0,4 (sendo 2 μ L/min para Q_C e 0,8 μ L/min, para Q_D), num Ca de 0,031, sendo observado que nesta região foram geradas gotas de tamanhos menores e distribuídos de forma mais homogênea. Nestas condições, foi possível produzir micropartículas de alginato de cálcio de forma contínua e com alta estabilidade da emulsão, proporcionado pela adição do tensoativo PGPR ao óleo de milho (Figura 2C). As micropartículas apresentaram diâmetro médio de 115,09 \pm 0,38 μ m e obtida um CV = 3,28%, indicando a monodispersidade das micropartículas.

Diante disso, foi investigada a capacidade de encapsular a cepa de *Bacillus subtilis* no interior de micropartículas de alginato pelo sistema microfluídico de gotas, sendo inserida a suspensão celular na corrente central da fase dispersa juntamente com as demais soluções. Assim, as células foram misturadas às soluções de alginato (2% m/v) e solução gelificante (CaCl₂ a 30 mM) e estas ficaram confinadas no interior das micropartículas, conforme ilustra a microscopia das micropartículas na Figura 3.

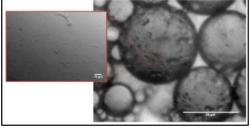


Figura 3: Micropartículas de alginato de cálcio contendo células de <u>Bacillus subtilis NRRL B 14819</u>.

Conclusões:

O sistema microfluídico de gotas com mistura de soluções foi capaz de produzir continuamente micropartículas de alginato de cálcio de monodispersas e ainda foi possível encapsular células bacterianas nas micropartículas. Este tipo de sistema microfluídico pode ser considerado uma ferramenta para processos de encapsulação de biocatalisadores, contribuindo para a elevação da produtividade em bioprocessos.

Referências:

- [1] E. Y. Basova and F. Foret, Analyst **140**, 22 (2015).
- [2] M. T. Guo, A. Rotem, J. a Heyman, and D. A Weitz, Lab Chip 12, 2146 (2012).
- [3] B. Kintses, L. D. van Vliet, S. R. A. Devenish, and F. Hollfelder, Curr. Opin. Chem. Biol. 14, 548 (2010).
- [4] S.-Y. Teh, R. Lin, L.-H. Hung, and A. P. Lee, Lab Chip **8**, 198 (2008).
- [5] G. F. Christopher and S. L. Anna, J. Phys. D. Appl. Phys. 40, R319 (2007).
- [6] D. Duffy and J. McDonald, Anal. Chem. **70**, 4974 (1998).
- [7] S. Xu, Z. Nie, M. Seo, P. Lewis, E. Kumacheva, H. a. Stone, P. Garstecki, D. B. Weibel, I. Gitlin, and G. M. Whitesides, Angew. Chemie Int. Ed. **44**, 724 (2005).
- [8] C. N. Baroud, F. Gallaire, and R. Dangla, Lab Chip 10, 2032 (2010).
- P. Garstecki, M. J. Fuerstman, H. A Stone, and G. M. Whitesides, Lab Chip 6, 437 (2006).
- [10] M. De Menech, P. Garstecki, F. Jousse, and H. A. Stone, J. Fluid Mech. 595, 141 (2008).

Agradecimentos: Ao suporte financeiro da Fapesp (Projeto 2014/26814-7), à Faculdade de Engenharia Química/Unicamp e ao Laboratório de Microfabricação/CNPEM pelo suporte técnico para a construção dos dispositivos microfluídicos.

Desenvolvimento de Processo Microfluídico para Produção de Nanopartículas de Quitosana e Adenosina Trifosfato

Amanda C. S. N. Pessoa; Caroline C. Sipoli; Lucimara G. de la Torre.

amandanoro@gmail.com; carolinesipoli@gmail.com; latorre@feq.unicamp.br

Resumo: Este trabalho apresenta o desenvolvimento de processos microfluídicos para a produção de nanopartículas de quitosana (CHI) de baixa massa molar através de gelificação ionotrópica com adenosina trifosfato (ATP). A síntese de nanopartículas CHI/ATP foi conduzida em dispositivo microfluídico baseado em focalização hidrodinâmica, construído em polidimetilsiloxano(PDMS)/vidro, empregando uma corrente central aquosa e duas correntes laterais compostas por CHI e ATP. A partir disso, investigou-se a influência da concentração de CHI (C_{CHI}) e da relação mássica CHI/ATP ($R_{CHI/ATP}$), entre 0,5 e 1,5, nas características físico-químicas finais das nanopartículas CHI/ATP. Para $R_{CHI/ATP}$ de 1,0 e C_{CHI} de 1,0 mg/mL, foram produzidas nanopartículas de 43,6 ± 15,2 nm de diâmetro, 0,22 ± 0,02 de índice de polidispersidade (PDI) e +21,8 ± 2,5 de potencial zeta. Assim, pretende-se contribuir para a produção de nanopartículas de quitosana visando aplicações em sistemas de liberação gênica ou de fármacos.

Palavras-Chaves: Quitosana; Nanopartículas; Microfluídica.

Introdução: A quitosana (CHI) é um polímero catiônico linear obtido da desacetilação parcial da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza[1]. Ela é conhecida por sua excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, que a tornam uma candidata adequada para sistemas não-virais de carreamento de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e fármacos[2]. O método mais empregado para produção de nanopartículas de CHI é a gelificação ionotrópica[2], que se baseia na interação eletrostática com polieletrólitos de íons de carga negativa, como adenosina trifosfato (ATP)[3]. Quando comparado às técnicas convencionais de produção de partículas, o emprego de dispositivos microfluídicos promove a operação em regime contínuo e escoamento em regime laminar[4], possibilitando avanços tecnológicos na síntese de nanopartículas em processos reprodutíveis. Assim, este trabalho tem como objetivo a investigação da influência da concentração de CHI (C_{CHI}) e da relação mássica CHI/ATP (R_{CHI/ATP}) sobre as propriedades físico-químicas das nanopartículas CHI/ATP formadas em processo microfluídico utilizando dispositivo de focalização hidrodinâmica.

Procedimento experimental: A produção de nanopartículas CHI/ATP foi conduzida em dispositivo microfluídico de focalização hidrodinâmica, empregando uma corrente central de água acidificada (pH 4) sob vazão de 40 μL/min, e duas correntes laterais de CHI e ATP, sob vazão de 25 μL/min (Fig. 1). Investigou-se o efeito do aumento da concentração de CHI (0,5 a 1,5 mg/mL) para três condições de relação mássica (R_{CHI/ATP}) de 0,5, 1,0 e 1,5. A Tabela 1 apresenta as concentrações de CHI e ATP utilizadas para cada condição estudada.

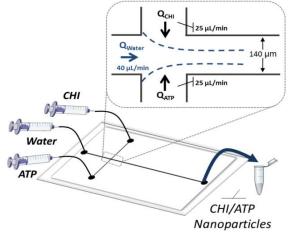


Fig. 1. Esquema da produção de nanopartículas CHI/ATP utilizando dispositivo microfluídico de focalização hidrodinâmica construído de PDMS/vidro.

Tabela 1 — Concentrações de CHI e ATP empregadas na corrente de entrada do processo microfluídico para formação de nanopartículas de $R_{\text{CHI/ATP}}$ de 0,5, 1,0 e 1,5.

R _{CHI/ATP}	C _{CHI} (mg/mL)	C _{ATP} (mg/mL)
	0,5	1,0
0,5	1,0	2,0
	1,5	3,0
	0,5	0,5
1,0	1,0	1,0
	1,5	1,5
	0,5	0,33
1,5	1,0	0,67
	1,5	1,0

Resultados e discussão: Para investigar a influência do aumento da concentração de CHI na produção de nanopartículas CHI/ATP, foi necessário elevar concomitantemente a concentração de ATP para uma mesma R_{CHI/ATP}. Logo, os efeitos no tamanho, índice de polidispersidade e potencial zeta das nanopartículas formadas podem ser compreendidos como decorrência do aumento da concentração total do sistema (Fig. 2).

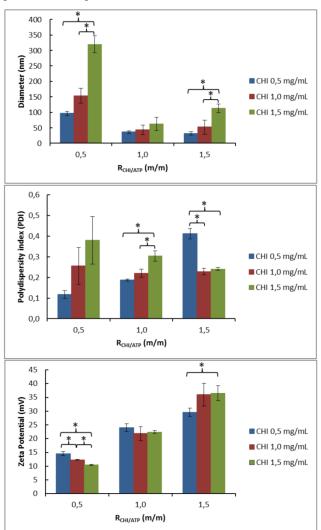


Fig. 2. Influência da concentração de CHI e ATP em diferentes $R_{\text{CHI/ATP}}$ na formação de nanopartículas CHI/ATP por processo microfluídico empregando dispositivo de focalização hidrodinâmica. (*) p<0,05 entre os pares.

Foi possível verificar que o aumento da concentração total do sistema levou ao aumento do diâmetro das nanopartículas para todas as $R_{\text{CHI/ATP}}$ estudadas. Esse resultado está de acordo com Bulmer, Margaritis e Xenocostas (2012)[5], que estudaram a caracterização de nanopartículas CHI/Tripolifosfato de sódio (TPP) para relações mássicas $R_{\text{CHI/TPP}}$ entre 3,0 e 7,0, visando sua aplicação para sistemas de liberação sustentada do fármaco eritropoetina humana recombinante.

A provável justificativa para esse aumento no tamanho das nanopartículas está relacionada às diferentes interações polímero-polímero resultantes do incremento da concentração do sistema, o que reflete em como o sistema se complexa. Em condições de maior interligação entre as cadeias poliméricas, o agente reticulante será capaz de complexar uma proporção maior de polímero por partícula, levando ao aumento do tamanho. Esse evento também pode justificar o aumento do PDI em condições de mesma R_{CHI/ATP}, pois para soluções mais concentradas (polímeros mais associados) a complexação entre CHI e ATP será menos uniforme, resultando em populações mais heterogêneas. Com exceção para a condição de $R_{CHI/ATP} = 1,5$ e $C_{CHI} = 0,5$ mg/mL, para a qual ocorreu um aumento do PDI devido à formação de agregados no tubo de coleta.

Já o potencial zeta apresentou um incremento linear proporcional ao aumento da $R_{\rm CHI/ATP},$ resultado do maior conteúdo de cargas positivas de CHI nas partículas. No entanto, para uma mesma $R_{\rm CHI/ATP},$ o aumento da concentração total do sistema causou a diminuição do potencial zeta, exceto para a condição de agregação anteriormente comentada ($R_{\rm CHI/ATP}=1,5$ e $C_{\rm CHI}=0,5$ mg/mL). Este evento também pode ser atribuído ao modo de complexação CHI/ATP em sistemas mais concentrados. Polímeros mais intimamente ligados

provavelmente levaram à menor exposição das aminas protonadas provenientes da CHI no arranjo final da nanopartícula CHI/ATP, acarretando em cargas superficiais ligeiramente inferiores.

Os menores diâmetros encontrados para as nanopartículas de $R_{CHI/ATP} = 1,0$, quando comparados às $R_{CHI/ATP}$ de 0,5 e 1,5, fazem parte de uma tendência já observada na formação de nanopartículas CHI/ATP [3].

Conclusões: A partir dos resultados para uma mesma relação mássica, verificou-se que o aumento da concentração do sistema acarretou na modificação da interação CHI/ATP, gerando nanopartículas com maior tamanho e polidispersidade, e menores valores de potencial zeta. Esse sistema microfluídico proporcionou a síntese de nanopartículas CHI/ATP para diferentes relações mássicas em processos reprodutíveis.

Referências e agradecimentos: [1]A. Anitha, et al., Prog. Polym. Sci., 39, 1664 (2014)

- [2]C. Carrillo, et al., Biomed. Pharmacother., **68**, 775 (2014).
- [3]G. Giacalone, E. Fattal, and H. Hillaireau, Biomacromolecules, 14, 737 (2013).
- [4]G. M. Whitesides, Nature, 442, 368 (2006).
- [5]C. Bulmer, A. Margaritis, and A. Xenocostas, Biochem. Eng. J., 68, 61 (2012).

Oligomerização proteica para adsorção de enzimas em microfibras flexíveis de carbono

Andressa Ribeiro Pereira, Frank Nelson Crespilho

andressa.arp@gmail.com; frankcrespilho@iqsc.usp.br

Resumo: Nos últimos anos, nosso grupo tem proposto a utilização de fibras flexíveis de carbono para o desenvolvimento de biodispositivos enzimáticos. No entanto, a imobilização de proteínas em superfícies de carbono requer a funcionalização dos eletrodos visando melhorar a interação entre eles. Assim, nosso grupo tem estudado tanto a modificação da superfície das fibras, quanto a alteração da estrutura proteica utilizando procedimentos de oligomerização. Propõe-se aqui uma rota para a produção do homooligômero da GOx (Ol-GOx) pela reação com o ácido trifluorometanosulfônico. A Ol-GOx exibe propriedades importantes, como alta hidrofobicidade, que faz com que ela tenha propriedades de superfície ideal para a imobilização no eletrodo, um passo importante na fabricação de biodispositivos. Como consequência, quando aplicada na eletroquímica, a Ol-GOx apresenta a constante heterogênea de transferência de elétrons sete vezes superior à da GOx nativa, evidenciando melhor desempenho do eletrodo quando a Ol-GOx é utilizada como biocatalisador no eletrodo modificado.

Palavras-chave: glicose oxidase; oligomerização; fibras flexíveis de carbono.

Introdução: Microdispositivos eletrônicos flexíveis englobam uma área de grande importância, uma vez que eles podem ser deformados em formas complexas, enquanto mantêm um alto desempenho [1]. Assim, nosso grupo tem se concentrado no estudo das fibras flexíveis de carbono (FFC) como um eletrodo eficiente para o desenvolvimento de biodispositivos enzimáticos. No entanto, é conhecido que a maneira como a enzima é imobilizada em uma superfície pode influenciar de forma significativa sua interação com o substrato e com a superfície do eletrodo [2]. Dessa forma, para obtermos biodispositivos enzimáticos mais eficientes, é necessário melhorar a interação entre o eletrodo e a proteína utilizada. Nesse estudo utilizou-se a glicose oxidase (GOx), uma enzima redox, responsável pela catálise da glicose a ácido glicônico e que vem sendo bastante utilizada como biocatalisador no desenvolvimento de biossensores para o controle de diabetes. Portanto, é proposto aqui um método para a oligomerização da GOx (Ol-GOx), uma vez que interfaces oligomerizadas oferecem formas geométrica e eletrostática que aumentam a especificidade da interação. Além disso, a oligomerização pode conferir vantagens à proteína: os erros com os quais elas são sintetizadas são menores do que para uma cadeia proteica única e proteínas maiores são mais resistentes a desnaturação e a degradação.

Procedimento experimental: A Ol-GOx foi produzida a partir da reação do ácido trifluorometanosulfônico (TFMS) pré-resfriado com a GOx nativa em tampão fosfato de sódio (pH 7,5) durante 30 minutos a 20 °C. Após esse tempo, a mistura reacional foi colocada em membranas de diálise a fim de remover o ácido residual e para purificar a amostra. Utilizaram-se dois procedimentos de diálise, ambos com o tampão fosfato de sódio (pH 7,5) e durante três horas. A primeira diálise foi realizada com agitação e em temperatura ambiente e a segunda foi realizada sem agitação e a 4 °C. A Ol-GOx foi então removida da membrana e armazenada a 4 °C.

Para os experimentos eletroquímicos, as FFC após a adsorção da GOx ou da Ol-GOx foram utilizadas como eletrodo de trabalho, sendo os eletrodos modificados preparados pela adsorção física da enzima. Realizaram-se os experimentos em um sistema de três eletrodos com os bioeletrodos como eletrodo de trabalho, platina como contra eletrodo e Ag/AgCl saturado como eletrodo de referência. Como eletrólito foram utilizados 20 mL de tampão fosfato de sódio (0,10 mol L⁻¹, pH 7,5), no qual foi borbulhado argônio durante 30 minutos antes das medidas. Para a bioeletrocatálise, borbulhou-se gás oxigênio por 10 minutos antes das medidas.

Resultados e discussão: A Ol-GOx tem se demonstrado um biocatalisador promissor quando comparado com a GOx nativa. Isso se deve a hidrofobicidade e ao tamanho da Ol-GOx que faz com que essa enzima apresente propriedades de superfície ideal para a imobilização no eletrodo, um passo importante na fabricação de biodispositivos. Superfícies de carbono têm sido utilizadas para a produção de bioeletrodos para estudos fundamentais e desenvolvimento de biossensores. Assim, a eletroquímica direta da Ol-GOx foi estudada utilizando o conceito de voltametria de filme proteico (PFV) com a GOx ou a Ol-GOx adsorvidas fisicamente ao eletrodo de FFC. Os voltamogramas cíclicos obtidos estão mostrados nas figuras 1a e 1b. Nesse caso, a transferência direta de elétrons (TDE) ocorre do cofator FAD para a superfície do eletrodo. A reação

eletroquímica envolve dois elétrons para a eletrooxidação do FADH₂ a FAD e o aumento linear das correntes faradaicas com o aumento da velocidade de varredura indica que o processo é limitado por transferência de carga. Para a Ol-GOx as correntes faradaicas são maiores do que para a proteína nativa. A constante heterogênea de transferência de carga obtida para a GOx foi 380 s⁻¹, enquanto que para a Ol-GOx foi 2630 s⁻¹. Dessa forma, nota-se que a transferência de elétrons é sete vezes maior quando a Ol-GOx é utilizada como biocatalisador no eletrodo modificado.

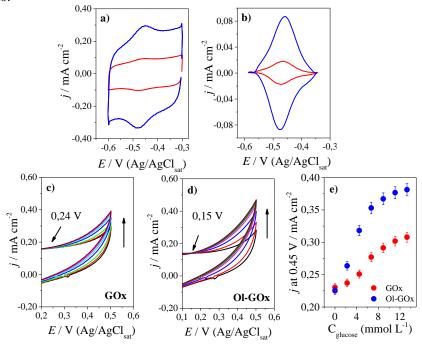


Figura 1. Voltamogramas cíclicos (a) dos bioeletrodos FFC-GOx (linha vermelha) e FFC-Ol-GOx (linha azul). Velocidade de varredura: 100 mVs⁻¹. Atmosfera saturada com argônio; (b) relativos a (a) após a subtração da corrente capacitiva. Região ampliada da resposta catalítica dos bioeletrodos (c) FFC-GOx e (d) FFC-Ol-GOx, ambos na presença de oxigênio, na ausência de glicose (linha preta) e após adições sucessivas de glicose. Velocidade de varredura: 50 mVs⁻¹; (e) Gráfico da concentração de glicose versus densidade de corrente em 0,45 V para a GOx (pontos vermelhos) e Ol-GOx (pontos azuis). Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio (0,10 mol L⁻¹, pH 7,5). Temperatura: 25 °C.

Além dessa enzima oligomerizada mostrar importantes propriedades para aplicações eletroquímicas, o desempenho da bioeletrocatálise também foi melhorado. As figuras 1c e 1d mostram a bioeletrocatálise da glicose pela GOx e pela Ol-GOx respectivamente. Na presença do oxigênio molecular, a glicose é convertida ao ácido glicônico com concomitante redução do peróxido de hidrogênio formado. A oxidação do peróxido de hidrogênio ocorre com *onset* em 0,24 V para a GOx e 0,15 V para a Ol-GOx, sendo que o deslocamento desse potencial indica que a Ol-GOx troca elétrons mais facilmente com o eletrodo do que a proteína nativa. Além disso, a corrente máxima para a oxidação da glicose em 0,45 V aumenta de 30 para 38 mA cm⁻², como mostrado na figura 1e.

Conclusões: O protocolo de oligomerização utilizando o TFMS e a GOx nativa produziram proteínas mais eficientes tanto na TDE, quanto na bioeletrocatálise da glicose na presença de oxigênio. Observou-se um aumento nas correntes faradaicas para a Ol-GOx, além da maior constante heterogênea de transferência de carga sugerir que essa transferência é facilitada na oligoproteína. Assim, a melhora nas propriedades redox sugere que a utilização de proteínas oligomerizadas como biocatalisadores permitirá o desenvolvimento de biodispositivos mais eficientes.

Referências

[1] Pereira, A. R. et al. Application of carbon fibers to flexible enzyme electrodes. J. Electroanal. Chem. In press (2016). [2] Luz, R. A. S. et al. Enzyme Biofuel Cells: Thermodynamics, Kinetics, and Challenges in Applicability ChemElectroChem. 1, 1751-1777 (2014).

Agradecimentos: FAPESP (Projetos: 2015/16672-3, 2013/14262-7, 2013/19908-2), CNPq (Projeto: 478525/2013-3), INEO, IQSC-USP.

Simple approach for fabrication of a screen-printed carbonbased electrode for amperometric sensing in PDMS microchips

Bruno Gabriel Lucca, Jacqueline Marques Petroni, Valdir Souza Ferreira

bruno.lucca@ufes.br; jacque_petroni@hotmail.com; valdir.souza@ufms.br;

Abstract: This work describes a simple method for fabrication of screen-printed based electrodes for amperometric detection in microchip electrophoresis (ME). The procedure developed is quite simple and does not require expensive instrumentation or sophisticated protocols commonly employed for the production of amperometric sensors for ME, such as photolithography or sputtering steps. The electrodes were fabricated by manual deposition of a home-made conductive carbon ink over a patterned acrylic substrate. Morphological structure and electrochemical behavior of the carbon electrode were investigated by scanning electron microscopy and cyclic voltammetry. The amperometric sensors produced were coupled to PDMS microchips at end-channel configuration in order to evaluate their analytical performance. For this purpose, electrophoretic experiments were carried out using nitrite and ascorbic acid as model analytes. The feasibility of the proposed device for real analysis was explored by determination of nitrite in a drinking water sample.

Keywords: electrochemical detection; microfabrication; microfluidic devices; PDMS microchips;

Introduction: Lab-on-a-chip (LOC) devices were introduced in the 1990-decade aiming to integrate various chemical processes in a single device. The interest on this technology has largely increased over the past two decades due to advantages as portability, high-speed on analysis and compactness. The techniques for fabrication of LOC for microchip electrophoresis (ME) applications depend directly of the material employed. Silicon-based polymers and glass are the main substrates employed for production of LOC 1. Among the detection methods possible to be coupled with ME are laser-induced fluorescence, mass spectrometry and the electrochemical modes such as amperometry. Amperometric detection (AD) is quite attractive to be used in conjunction with ME due advantages that include versatility, adjustable selectivity, low cost, ease of miniaturization and compatibility with microfabrication techniques commonly used for production of the microchips ². The performance of AD in ME is directly dependent of the material used for fabrication of the electrodes. Metals and carbon-based materials are the most used elements employed for amperometric detection in ME³. Metal electrodes are normally fabricated by formation of conducting micrometer sized films via evaporating or sputtering the metal of interest over a substrate to form the electrode. This method requires an expensive instrumentation and is a complex process 4. On the other hand, carbon is the most common material used for fabrication of electrodes for use in normal capillary electrophoresis and ME, due to its reduced fouling, lower overpotential and larger work range for detection of organic compounds when compared to metal electrodes ⁵. The use of screen-printed technologies for fabrication of carbon electrochemical sensors is widely reported on the literature. Nevertheless, all the approaches proposed for fabrication of the electrodes require the use of technologies such as cutting plotters, semi-automatic printers, photolithography, metal deposition or micromolding steps. Such resources may not be available for many research groups. Thus, development of new strategies for fabrication of electrodes for AD in ME may be of interest for many researchers. In this context, we herein propose a novel approach for the simple fabrication of an inexpensive carbon electrode and its application as amperometric sensor in ME.

Materials and methods: Solutions: running buffer was 5 mM phosphate at pH 6.85 with 200 μM cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) surfactant. Analytes: sodium nitrite and ascorbic acid solubilized in ultrapure water. Microchip: PDMS microchips consisted of a 5 cm long separation channel and 0.75 cm long side arms. The depth of the channels was 15 μm and the width was 40 μm. Carbon working electrode fabrication: The carbon ink consisted of graphite powder and expanded polystyrene at a ratio of 95:5 (w/w). A few drops of dichloromethane were added to the graphite-polymer mixture to solubilize. For microfabrication of the carbon working electrode an acrylic plate is carefully cleaned with running water and soap. Two pieces of adhesive tape are stuck at the acrylic plate at around 400 μm of distance each other in order to form a gap and delimit the area of the electrode. Next, a layer of carbon ink is carefully spread over the area delimited by the adhesive tape using an artistic paintbrush. Subsequently, the electrode piece is allowed to rest at room temperature for 15 minutes to evaporate the dichloromethane. A smooth dry foam-sanding block is used to thoroughly polish the surface and decrease the thickness of the electrode layer through a manual process. The pieces of adhesive tape are then peeled

off the acrylic plate, which removes the excess of carbon ink and exposes the polished electrode into the gap. Then, a copper wire for electrical contact is attached to the acrylic plate near to the carbon electrode. Lastly, the contact between the carbon electrode and the copper wire is made using colloidal silver glue. After this, the electrode is ready for use and the PDMS microchip is aligned at end-channel configuration. *ME-AD apparatus:* a homemade equipment equipped with a 0 to -2kV high voltage power supply was used for experiments. An Autolab PGSTAT128N potentiostat/galvanostat equipped with extreme low current (ECD) module was used for amperometric detection and cyclic voltammetry (CV) experiments. *Electrophoresis procedure:* before use, the microchip was conditioned under vacuum with 0.1 M NaOH and running buffer during 10 min each. All experiments were performed with reverse polarity and electrokinetc injection. *Sample:* the drinking water sample was prepared by spiking with an appropriated aliquot of nitrite standard solution prepared in ultrapure water. Before injection into the microchip, the sample was diluted on the run buffer. *Surface characterization:* The microstructure of the carbon electrode developed was characterized by scanning electron microscopy (SEM)

Results and discussion: SEM technique was employed to investigate the surface morphology of the electrodes. A uniform, wrinkle and crumpled surface typical of carbon-based electrodic materials was observed. The electrochemical behavior of the electrode was investigated by CV experiments using nitrite and ascorbic acid as model analytes. Oxidation peaks for both substances could be observed, which indicates promising electrocatalytic activity for the electrode. To demonstrate the analytical performance of the electrode it was coupled to PDMS microchips and used as amperometric sensor at end-channel configuration. The microchip-electrode system was used to monitor the electrophoretic separation of the model analytes. The optimum separation was achieved when using 5 mM phosphate buffer at pH 6.85. As both analytes are negatively charged at this pH value, separations were performed under reverse polarity and the cationic surfactant CTAB was used to reverse the EOF direction. Hydrodynamic voltammograms were recorded at the range from +0.1 to +1.2 V (vs. Ag/AgCl) by increasing the detection potential in +0.1 V increments. The peak currents raised and achieved a maximum value at a detection potential of +1.1 V for nitrite and +0.9 V for ascorbate. Electrophoretic separations were carried out for a mixture of 200 µM nitrite and 400 µM ascorbate. The two analytes could be separated within 50s in well-defined peaks with good baseline resolution. The sensitivities obtained with the carbon-based electrode were 713.5 pA/µM for nitrite and 255.4 pA/µM for ascorbate. LOD values were found to be 8.2 µM and 12.7 µM for nitrite and ascorbate, respectively. A peak resolution value of 1.2 and separation efficiencies of 3000 plates/m for nitrite and 7650 plates/m for ascorbate were obtained. Repeatability was evaluated by a sequence of ten successive injections of a mixture of the analytes. Relative standard deviation (RSD) were found to be 4.3 % for nitrite and 7.2 % for ascorbate, for n=10 measurements. The reproducibility of the fabricated devices was investigated by an interelectrode study performed among five different pieces of the carbon electrode. A satisfactory electrode-toelectrode reproducibility was obtained with RSD values of 8.7 % for nitrite and 9.3 % for ascorbate concerning the peak currents. A calibration curve with good linearity was obtained with R=0.997 for nitrite and R=0.992 for ascorbate. Lastly, to investigate the feasibility of the electrode for analysis of real samples, nitrite was determined in a drinking water sample. The results obtained showed an acceptable concordance (95.4 %) when compared with the reference value. Ion-chromatography experiments were performed to validate the results.

Conclusions: In this work we report the development of a new approach for fabrication of carbon-based electrodes and the application of the obtained devices for detection in ME. The electrodes were manufactured by deposition of a carbon ink over an easily patterned acrylic substrate. All fabrication steps are very simple and do not require expensive materials, sophisticated instruments or complex procedures. The amperometric sensor was coupled to PDMS microchips in end-channel configuration to monitor the separation of nitrite and ascorbic acid. According to the data here reported, the fabricated electrodes presented satisfactory analytical performance and the proposed fabrication approach may be considered as an interesting alternative for production of carbon-based electrodes. Lastly, the analytical suitability of the fabricated electrode for real analysis was demonstrated by successfully determination of nitrite in a drinking water sample.

References and acknowledgements:

- [1] D. F. Pozo-Ayuso et al., J. Chromatogr. A 1180, 193 (2008).
- [2] A. Regel, S. M. Lunte, Electrophoresis 34, 2101 (2013).
- [3] R. A. Saylor, E. A. Reid, S. M. Lunte, Electrophoresis 36, 1912 (2015).
- [4] R. P. Baldwin et al., Anal. Chem. **74**, 3690 (2002).
- [5] A. J. Gawron, R. S. Martin, S. M. Lunte, Electrophoresis 22, 242 (2001).

The authors acknowledge financial support provided by the Brazilian funding institutions CAPES and CNPq.

Turbulência em microfluídica: fabricação, caracterização e aplicações

<u>Camila L. Camargo</u>, Angelo L. Gobbi, Luis Carlos S. Vieira, Letícia S. Shiroma, Gabriela F. Giordano, Leandro Y. Shiroma, Renato S. Lima

<u>camila.camargo@lnnano.cnpem.br;</u> angelo.gobbi@lnnano.cnpem.br; luis.vieira@lnnano.cnpem.br; leticia.shiroma@sememail.br; gabriela.giordano@lnnano.cnpem.br; leandroyoshio@hotmail.com; renato.lima@lnnano.cnpem.br

Resumo: Neste trabalho, propomos um método de fabricação que gera dispositivos de peças únicas de PDMS, sem quaisquer interfaces. Essa filosofia exibiu uma rotina experimental simples (requer basicamente uma estufa), barata (livre do uso de 'sala limpa') e rápida (menos de 1 h). A técnica é baseada em duas etapas: polimerização e remoção de scaffold. Desse modo, os dispositivos apresentaram forças de adesão altas, suportando as vazões necessárias para formação de turbulência. O uso desse fluxo é uma alternativa eficaz no tocante à solução de um dos desafios atuais da microfluídica: a capacidade de mistura. A relevância do fluxo de turbulência foi mostrada no desenvolvimento de extrações líquido-líquido ultrarrápidas e na formação de microemulsões.

Palavras-Chaves: PDMS; fluxo; high-throughput, microemulsão; extração líquido-líquido.

Introdução: A turbulência em canais microfluídicos é um tema no estado da arte e irá contribuir para uma nova gama de aplicações. O uso desse fluxo é uma alternativa eficaz no tocante à solução de um dos desafios atuais da microfluídica: a capacidade de mistura. Áreas cujo desempenho varia fortemente com a capacidade de geração de misturas homogêneas e rápidas incluem: síntese química, enovelamento de proteínas, cromatografia liquida de alta pressão, emulsificação e cinética ultrarrápida. Contudo, a geração de fluxo turbulento em microcanais exige o bombeamento dos fluidos a vazões excessivamente altas. Neste contexto, uma limitação crucial para a aplicação da turbulência em microfluídica são as forças de adesão comumente baixas dos dispositivos. A criação de chips que suportem maiores valores de vazão surge, então, como uma área essencial das pesquisas em microfluídica [1]. Neste trabalho, propomos um novo conceito para a fabricação de dispositivos com força de adesão suficiente para suportar as vazões exigidas para criação de turbulência nos microcanais. extração líquido-líquido (LLE)

Procedimento experimental: A técnica é baseada principalmente em duas etapas: i) polimerização e ii) remoção de *scaffold (polymerization and scaffoldremoval method*, PSR). A **Figura 1** (a) mostra as etapas principais para a construção do dispositivo PSR de PDMS visando à realização de misturas de 3 fluidos por turbulência. Três fios de nylon enrolados manualmente foram usados como *scaffold*. Esse enrolamento foi completado quando o fio individual central (entrada) alcançou 15 mm de comprimento. O fio enrolado (misturador) exibiu comprimento de 40 mm. Os monômeros de PDMS e seu agente de cura foram despejados na razão 10:1 m/m sobre a estrutura metálica cobrindo integralmente o *scaffold* de nylon. Após a cura do PDMS a 95 °C por 40 min em estufa, os fios de nylon foram mecanicamente removidos usando um alicate como mostra a **Figura 1** (b). Nesse caso, uma leve tensão foi aplicada sobre o fio e mantida por alguns segundos o que causou um descolamento gradual do nylon em relação ao canal. Isso reduziu a resistência de fricção e, logo, os fios puderam ser removidos facilmente do PDMS.

A relevância do fluxo de turbulência em microfluídica foi mostrada no desenvolvimento de extrações líquido-líquido (LLE) ultrarrápidas e na formação de microemulsões (MEs). A **Figura 1** (b) ilustra microdispositivos PSR com 3 e 2 entradas os quais foram aplicados em microemulsificação e LLE, respectivamente. Em LLE, as fases doadora e receptora foram ácido oleico e ácido acético 0,4 mmol L⁻¹ em água, respectivamente. O analito foi MEG 50,0 mmol L⁻¹ em ácido oleico. A homogeneização de MEG no óleo foi obtida por agitação vigorosa a 1000 rpm em um homogeneizador TURRAX. As fases doadora e receptora foram bombeadas (através de bombas-seringas) a uma razão de vazão entre ácido acético e ácido oleico igual a 40%. A vazão total foi de até 25 mL min⁻¹, criando uma alta transferência de energia por turbulência. No que concerne à microemulsificação em microfluídica, os componentes das dispersões foram água (fase hidrofílica, W), ácido oleico (fase hidrofóbica, O) e etanol (fase anfifílica, AP) foram bombeados no interior dos canais com o auxílio de bombas-seringas.

Resultados e discussão: Desenvolvemos um método de microfabricação que gerou dispositivos de peça única de PDMS. Os canais de entrada e de mistura dos microdispositivos foram produzidos preservando a estrutura original dos fios de nylon. Imagens de estereoscopia e microscopia eletrônica revelaram o diâmetro global dos canais na

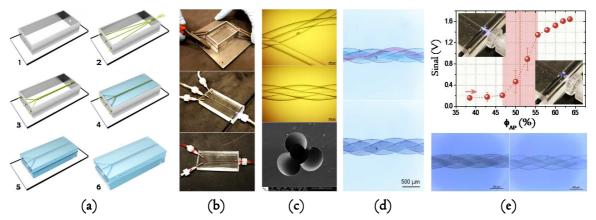


Figura 1: Etapas da microfabricação por PSR (a), remoção do *scaffold* e microdispositivos (b), microscopias do topo e da seção transversal do microcanal enrolado PSR (c), fluidos de corante a vazões de 600 μL min⁻¹ (mistura não homogênea no topo) e 58,5 mL min⁻¹ (mistura homogênea abaixo) (d), e dados referentes à etapa de microemulsificação (e). Em (a), temos: peça de vidro e alumínio (1), inserção dos fios de nylon (2), confecção do *scaffold* mediante enrolamento manual (3), adição do PDMS recobrindo o *scaffold* de nylon (4), cura do polímero e remoção mecânica dos fios de nylon (5) e dispositivo final (6). Em (b), as dimensões dos chips foram: 34 mm x 10 mm x 57 mm. Em (e), o gráfico no topo apresenta o sinal de tensão de turbidimetria ao longo do processo de microemulsificação. O aumento do sinal deve-se à redução drástica da turbidez do meio, que muda de turvo (emulsão) para transparente (ME). As fotos mostradas neste gráfico mostram uma ampliação da zona de detecção contendo emulsão (à esquerda) e ME (à direita). Por fim, as microscopias na parte inferior de (e) mostram microcanais com essas mesmas dispersões; emulsão turva à esquerda e microemulsão transparente à direita.

região de mistura de 450 µm. Além disso, observamos bordas bem definidas e baixa rugosidade nas paredes dos canais de PDMS como mostra a **Figura 1** (c). Também avaliamos a deformação elástica dos canais de PDMS a altas vazões. As razões de expansão dos diâmetros dos canais foi de apenas 3,84% a 40 mL min⁻¹ de vazão total. Canais de PDMS obtidos por método convencional apresentam níveis de deformação maiores, de até 25% [2].

Soluções de corante foram introduzidas no dispositivo com 3 entradas a vazões de até 58,5 mL min⁻¹ para avaliar a geração de turbulência. Para tal, a eficiência de mistura foi investigada por observação direta a partir de um microscópio como apresenta a **Figura 1** (d). A uma vazão de 58,5 mL min⁻¹, a homogeneização dos líquidos foi observada logo após a região de entrada dos fluidos o que indica a formação de turbulência. Adicionalmente, a geração desse regime de fluxo foi suportada pelo valor de R_e, calculado como 1855. Em microfluídica, a transição de regime laminar a turbulento ocorre entre 1700 e 1900 [3].

No que concerne aos testes em LLE, o MEG foi extraído com tempo de residência de apenas 0,01 s e a eficiência foi similar àquela obtida pelo método convencional de agitação do funil de separação com extrações em triplicata nesse último caso. Em relação à microemulsificação, MEs bicontínuas foram obtidas com vazões iguais das fases W e O. A vazão da fase AP foi elevada gradualmente até obtermos a microemulsificação que caracterizase pela conversão turvo-transparente como mostra a **Figura 1** (e). A mistura das fases foi alcançada por turbulência em vazões da ordem 15 mL min⁻¹ (valor global). Esse valor está acima da pressão de ruptura dos microdispositivos obtidos por métodos de microfabricação convencionais. O monitoramento da formação de MEs foi realizado por turbidimetria. Visando a minimizar as perdas de sensibilidade pelo espalhamento da radiação, fibras ópticas foram incorporadas ao microdispositivo e alinhadas ao microcanal (zona de detecção) atuando como guias de radiação.

Conclusões: O método PSR é capaz de resolver uma limitação relevante da microfluídica moderna, qual seja, a capacidade de mistura através da formação de fluxo turbulento. A turbulência em microfluídica é um tema no estado da arte e irá contribuir para uma nova gama de aplicações nos próximos anos. Estudos em emulsificação, por exemplo, mostraram uma redução no tamanho e na polidispersidade das gotículas com o aumento da vazão das fases da dispersão [1]. Ademais, estudos em cinética ultrarrápida revelaram uma melhora substancial no rendimento das reações ao aumentar a vazão de seus reagentes a temperatura ambiente [4]. Por fim, o método PSR é um avanço significativo na simplificação do processo de microfabricação de plataformas microfluídicas. Sua rotina é simples (requer basicamente uma estufa), barata (livre do uso de 'sala limpa') e rápida (menos de 1 h), eliminando o uso de solventes, métodos convencionais de construção do canal e a etapa de selagem.

Referências:

- [1] You, J. B. et al. PDMS-based turbulent microfluidic mixer. Lab Chip 15, 1727–1735 (2015).
- [2] Sollier, E.; Murray, C.; Maoddi, P.; Di Carlo, D. Lab Chip 2011, 11, 3752.
- [3] Li, H.; Olsen, M. G. Int. J. Heat Fluid Fl. 2006, 27, 123.
- [4] Ren, W.; Kim, H.; Lee, H. J.; Wang, J.; Wangand, H.; Kin, P. Lab Chip 2014, 14, 4263.

THE INFLUENCE OF TITANIUM DIOXIDE ON DIAMOND-LIKE CARBON BIOCOMPATIBILITY FOR DENTAL APPLICATIONS

<u>Cristiane da Costa Wachesk</u>, Vladimir Trava-Airoldi, Newton Soares da Silva, Anderson Oliveira Lobo, Fernanda Roberta Marciano

<u>Cris_cw@hotmail.com</u>; vladimir.airoldi@inpe.br; nsoares@univap.br; aolobo@univap.com; femarciano@uol.com.br

Abstract: Diamond-like carbon (DLC) films are commonly used for implanted medical and odontologica linterest due physical and chemical characteristics, showing good interactions with biological environment. However, these properties can be significantly enhanced when nanoparticles are present in the film structure, such as titanium dioxide (TiO_2). The goal of this work is study the main osteoblast attachment and spreading on DLC coatings when TiO_2 nanoparticles are incorporated at different concentration. The films were growth on 304 stainless steel substrates using plasma enhanced chemical vapor deposition. Raman scattering spectroscopy characterized the samplestructure. As the concentration of TiO_2 increased, the films increased the osteoblast viability (MTT assay), becoming more thermodynamically favorable to cell spreading (W_{Ad} values became more negative). This was evidenced through the increasing number of osteoblast nucleus indicating a higher adhesion between the cells and the films. These results show the potential use of DLC and TiO_2 -DLC films in implantable surfaces.

Keywords: diamond-like carbon, titanium dioxidenanoparticles, osteoblasts, cell adhesion, corrosion.

Introduction: Implant surface probably have the main contribution for increasing the implant dentistry. Complex reactions at the tissue-material interface determine the osseo integration and the long-term success of the implant. Hence, it is mostly necessary a surface modification to improve the biocompatibility [1]. In this scene, diamond-like carbon (DLC) coatings can impart wear resistance, hardness, and corrosion resistance to a medical device surface[2-5]. These coatings consist of dense amorphous carbon or hydrocarbon and their mechanical properties fall between those of graphite and diamond [2, 3]. Some studies reported modified-DLC films improved biocompatibility, lubricity, stability and cell adhesion [5, 6]. In an attempt to better understand the mechanisms underlying osteoblasts attachment and spreading on the coatings, the influence of titanium dioxide on diamond-like carbon coatings was for the first time studied.

Materials and methods: Commercially TiO₂ nanoparticles (Aeroxide[®] from Evonik), in anatase crystalline form (average particle size of 17 nm), were dispersed in hexane (0.1 and 0.5 g/L) to produce TiO₂-DLC films. The DLC and TiO₂-DLC films were deposited using hexane as the feed gas to a thickness of around 2.0 µm in 304stainless steel substrates (10 mm x 10 mm x 1 mm)using plasma enhanced chemical vapor deposition technique [7]. Raman Scattering Spectroscopy (Renishaw 2000 system with an Ar⁺-ion laser ($\lambda = 514$ nm) in backscattering geometry) analyzed the atomic arrangement of the films. Cells from newborn (2-4 days) wistar rat calvaria were harvested using the enzymatic digestion process [8], the cells were plated on samples in 24-well polystyrene plates (density of 2.10⁴ cells/well) using α-mem (GIBCO), supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO), 50 mg/ml gentamicin (GIBCO), 5 μg/l ascorbic acid (SIGMA) and 7mmβ-Glycerophosphate (SIGMA). During the experiment, cells were incubated (37 °c) in a humidified atmosphere (5% co2) and the medium was changed every three days. a progression of cultures was examined by inverted microscope (ck40 Olympus). The cell viability assay monitors the response and health of cells quantifying the mitochondrial activity by analyzing formazan crystals formed by reducing the salt 3-[(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] (MTT) (SIGMA-ALDRICH), after treatment, 0.5 mg/ml of mtt was added to the cultures, which were incubated for 1 h (37 °c) followed by 30 min gentle agitation in 200ml of Dimethyl Sulfoxide. The plates were read with a 570 nm filter in an ELISA Spectracount reader (packard instrument). Phosphate-buffered saline (PBS) washed the cells. They were incubated for 10 min at room temperature with

300 nm 4'6-diamidino-2-phenylindoleanddihydrochloride (DAPI; Molecular Probes). For fixing, 200 ml Paraformaldehyde (SIGMA-ALDRICH) at 4% was added to the wells and the plate incubated at room temperature for 10 min. fluorescence microscope (DMLB LEICA) examined the cells and a digital video camera (LEICA DFC 300 fx) took the images. The statistical differences were analyzed by one-way anova (graph pad prism 6[®]). The populations from stainless steel, DLC and Tio₂-DLC films were obtained with normal distribution and independent to each experiment. P-values less than 0.05 were considered to indicate statistical differences.

Results and discussion: Raman scattering spectroscopy was used to evaluate the chemical structure of the DLC films. The spectra are composed of two broad bands, centered approximately ~1330 cm⁻¹ (D band) and ~1550 cm⁻¹ (D band), for visible light[9]. The D and D band positions were determined by subtracting a linear background and fitting a Gaussian function to the peak of the Raman spectrum. Shows the mitochondrial activity for all the studied samples. Stainless steel substrates show a significant difference when compared to control (osteoblast cells). The decrease number of viable cells on stainless steel characterizes cell death. There was no significant difference among DLC, TiO₂-DLC (0.1 g/L) and the control. An increase concentration of TiO₂ nanoparticles in DLC films enhanced the mitochondrial activityon these samples, which are evidently non-toxic. TiO₂-DLC (0.5 g/L) is significantly different (P < 0.05) compared to DLC andextremely significant (P < 0.001) when compared to stainless steel. To visualize the cell nuclei, they werelabeled with DAPI (blue) during 24 h. A high cell attachment was obtained on all the TiO₂-DLC samples. As observed in MTT, the DAPI test show a strong compatibility of the TiO₂-DLC films. The quantity of cells on stainless steel is considered different from DLC films (P < 0.05) and very different from TiO₂-DLC films (P < 0.01). There was an increase in the number of cells on the samples according with the increase concentration of TiO₂ nanoparticles in DLC films. TiO₂-DLC films are considered different from DLC films (P < 0.05).

Conclusions: In this paper, the osteoblast attachment and spreading on DLC coatings was studied when TiO_2 nanoparticles are incorporated at different concentration. The presence of TiO_2 nanoparticles increases the graphite-like bonds and decreases the DLC disorder. As the concentration of TiO_2 increased, the films increased the osteoblast viability (MTT assay). This was evidenced through the increasing number of osteoblast nucleus indicating a higher adhesion between the cells and the films. These results show the potential use of DLC and TiO_2 -DLC films in implantable surfaces for dental applications.

References: [1] E. Salgueiredo, M. Vila, M.A. Silva, M.A. Lopes, J.D. Santos, F.M. Costa, R.F. Silva, P.S. Gomes, M.H. Femandes, Diamond and Related Materials 17 (2008) 878-881. [2] J. Robertson, Materials Science & Engineering R-Reports 37 (2002) 129-281. [3] C. Donnet, J. Fontaine, T. Le Mogne, M. Belin, C. Heau, J.P. Terrat, F. Vaux, G. Pont, Surface & Coatings Technology 120 (1999) 548-554. [4] D.Y. Yun, W.S. Choi, Y.S. Park, B. Hong, Applied Surface Science 254 (2008) 7925-7928. [5] A. Shirakura, M. Nakaya, Y. Koga, H. Kodama, T. Hasebe, T. Suzuki, Thin Solid Films 494 (2006) 84-91. [6] R. Hauert, Diamond and Related Materials 12 (2003) 583-589. [7] M. Saini, Y. Singh, P. Arora, V. Arora, K. Jain, World Journal of Clinical Cases: WJCC 3 (2015) [8] P.T. de Oliveira, A. Nanci, Biomaterials 25 (2004) 403-413. [9] J. Pino-Mínguez, A. Jorge-Mora, R. Couceiro-Otero, C. García-Santiago, Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (English Edition) 59 (2015) 122-128.

Paper-based microchip electrophoresis with integrated contactless conductivity detection: a simple, low-cost, and fully disposable device for separation of biomolecules

Cyro L. S. Chagas, Fabrício R. de Souza, Thiago M. G. Cardoso, Roger C. Moreira, José A. F. da Silva, Dosil P. de Jesus, and Wendell K. T. Coltro.

cyrolucas@gmail.com; frsouza_88@yahoo.com.br; tmgcgyn@gmail.com; moreirarc2@gmail.com; fracassi@iqm.unicamp.br; dosil@iqm.unicamp.br; wendell@ufg.br.

Abstract: We describe for the first time the fabrication of a paper-based microchip electrophoresis (pME) device with integrated hand-drawn pencil electrodes to perform capacitively coupled contactless conductivity detection (C^4D). This low-cost device (less than \$0.10) revealed great capability to dissipate heat, good injection-to-injection repeatability, and easiness to attach pencil-drawn electrodes on the separation channel. The feasibility of the proposed pME- C^4D device was successfully demonstrated with the separation of bovine serum albumin and creatinine within 150 s with baseline resolution. The limits of detection values for albumin and creatinine were 20 and 35 μ mol L^{-1} , respectively. These biomolecules present clinical relevance to evidence kidney failure. The proposed pME- C^4D have offered great potential to be explored in the diagnosis of diabetes mellitus and heart diseases.

Keywords: clinical assays; electrochemical detection; lab-on-a-chip; paper microfluidics.

Introduction: Paper platform was an important tool for the separation of biomolecules in the 1950's decade contributing positively for the advances on electrophoresis systems. [11] In the last years, paper has been rediscovered for the development of microfluidic paper—based analytical devices (μ PADs). Applications involving sensing, flow injection analysis and chromatographic devices are commonly found in literature. [21] Most recently, an electrophoretic separation of dyes was reported using colorimetric detection. [31] In this report, we describe for the first time the fabrication of paper microchip electrophoresis (pME) integrated with pencil electrodes for capacitively coupled contactless conductivity detection (C⁴D). The feasibility of the proposed pME-C⁴D device was demonstrated with the separation of biomolecules.

Results and discussion: pME devices were fabricated in Whatman paper through CO_2 laser cutting in a cross geometry (Fig. 1a). Injection and separation channels were 2 cm and 5.5 cm, respectively. All channels were 1 mm wide. pME devices were thermally laminated (Fig. 1b) with a thermosensitive polyester film (pouch film) to provide the electrical insulation with pencil electrodes attached at their bottom surface (Fig. 1c). Pencil electrodes were hand-drawing on office paper sheets, as described elsewhere. [4]

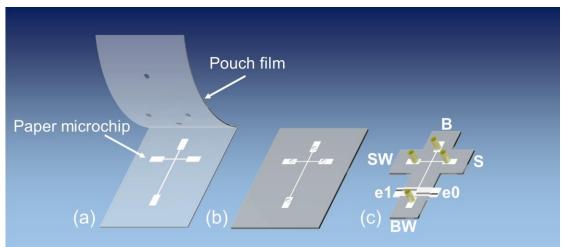


Figure 1. Fabrication process of pME devices showing the (a,b) lamination of laser-cut paper with perforated polyester films and (c) integration with electrodes for C^4D and solution reservoirs.

Sample injection was performed under floating mode applying the voltage of 2.3 kV at the injection channel for 50 s. Afterwards, separation was carried out under a voltage of 2.5 kV. Separations were monitored using a labmade C^4D system.^[5] A mixture containing albumin (Alb) and creatinine (Cre) was prepared in running buffer composed of lactic acid (20 mM) and histidine (2 mM) at pH 3.1. A calibration curve was performed ranging the concentrations from 100 μ M to 300 μ M showing good linear correlations ($R^2 > 0.879$) for both analytes. Figure 2 displays the electropherograms recorded using the proposed device. Alb and Cre were separated within 120 s with baseline resolution and satisfactory repeatability.

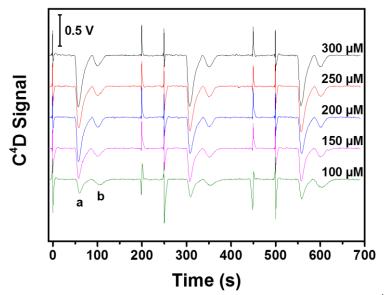


Figure 2. Electropherograms showing the separation of albumin (Alb) and creatinine (Cre) on pME- C^4D devices in different concentration levels. Detection parameters: 300-kHz-sinusoidal wave with excitation voltage of 1 V (peak-to-peak).

Conclusions: pME-C4D devices have exhibited great capability to separate biomolecules with suitable repeatability for clinical assays. Based on the achieved results, the proposed device can be used for microalbuminuria diagnosis in biological fluids.

References and acknowledgements:

Acknowledgements: CNPq, CAPES, FAPEG and INCTBio.

References: [1] Mackay, I. R. et al., J. Clin. Invest., 33, 855-866 (1954).

- [2] Coltro, W.K.T. et al., Electrophoresis, 35, 2309-2324 (2014).
- [3] Xu, C.; et al., Electrophoresis, doi: 10.1002/elps.201500321 (2015).
- [4] Chagas, C. L. S.; et al., Electrophoresis, 36, 1837-1844 (2015).
- [5] da Silva, J. A. F.; do Lago, C. L., Anal. Chem., 70, 4339-4343 (1998).

Microfluídica aplicada à obtenção de microcápsulas com flexibilidade ajustável

Débora F. do Nascimento¹, <u>Paula A. Cardoso</u>¹, Bruno A. de Azevedo¹, Wynter J. Duncanson², Márcio S. Carvalho^{1*}

- 1 PUC-Rio, Departamento de Engenharia Mecânica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil 2 - Nazarbayev University, 53 Kabanbay Batyr Avenue, Astana, Kazakhstan 010000
 - *msc@puc-rio.br

Resumo: Microcápsulas com membranas flexíveis podem ser aplicáveis em diversas áreas, como na recuperação de óleos em reservatórios de petróleo ao atuarem na mobilização de gânglios de óleo aprisionados e na mimetização de compostos sanguíneos para o estudo do efeito de marginalização. Esse trabalho visou obter microcápsulas com propriedades mecânicas específicas a partir do estudo das diferentes vazões possíveis de serem empregadas no dispositivo de microfluidos além de diferentes proporções de polímero para o agente de reticulação. O polímero usado para a composição das membranas das microcápsulas foi o PDMS (Sylgard 184®), um elastômero comercialmente disponível e muito usado na fabricação de dispositivos de microfluídica.

Palavras-Chaves: microcápsulas; microfluídica; marginalização; EOR

Introdução: Microcápsulas que possuem membranas com flexibilidade ajustável podem ser aplicáveis em diversas áreas, como a mimetização de compostos sanguíneos para o estudo do efeito de marginalização ¹, e a melhora na recuperação de óleos (EOR) em reservatórios de petróleo ao atuarem na mobilização de gânglios de óleo aprisionados². A microfluídica aplicada à produção dessas microcápsulas, ao contrário de sistemas de vazões contínuas, lida com cápsulas discretas com controle preciso de volume e de composição, com dispersão restrita e com limitada contaminação cruzada, o que proporciona modelos ideais para a fabricação de sistemas complexos com os parâmetros necessários em microescala. O objetivo desse trabalho é o de obter microcápsulas com propriedades mecânicas específicas a partir do emprego de diferentes vazões no dispositivo de microfluidos e de diferentes proporções de polímero para o agente de reticulação.

Procedimento experimental: O dispositivo de microfluídica utilizado para a produção das microcápsulas é composto por capilares de vidro e foi fabricado no laboratório com o emprego de uma lâmina de vidro como base, um capilar de vidro quadrado com 4 cm de comprimento e com 1,05mm de diâmetro interno e dois capilares cilíndricos de vidro de 1mm de diâmetro externo e 580μm de diâmetro interno, além de duas agulhas e cola epoxi (Figura 1A). Um dos capilares cilíndricos foi tracionado e aquecido simultaneamente com o emprego do equipamento Micropippette puller para produzir uma ponta cônica que foi lixada para a obtenção de uma abertura de 150μm (Figura 1B). Os dois capilares cilíndricos foram alinhados coaxialmente no interior do capilar quadrado a uma distância de 190μm e a cola epoxi foi usada para a fixação das estruturas.

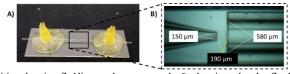


Figura 1 – A) Imagem do dispositivo de microfluídica usado para a produção de microcápsulas flexíveis; e B) Imagem microscópica da geometria interna do dispositivo microfluídico com as dimensões empregadas para a obtenção das microcápsulas

As microcápsulas foram preparadas a partir de gotas de emulsão dupla água-em-óleo-em-água (A/O/A) usadas como *templates*, compostas por: (1) fase interna: água MilliQ – Millipore® e corante; (2) fase intermediária: elastômero (PDMS) e agente reticulante; (3) fase externa: álcool poli(vinílico) 10wt%. O mecanismo de funcionamento do dispositivo de microfluídica está esquematizado na Figura 2.



Figura 2- Ilustração esquemática do mecanismo de fabricação das microcápsulas poliméricas

O polímero usado para a composição das membranas das microcápsulas foi o Sylgard 184® da *Dow Corning*, um poli(dimetil siloxano) (PDMS), que é um elastômero comercialmente disponível e muito usado na fabricação de dispositivos de microfluídica. A vazão dos fluidos foi controlada com o uso de bombas de seringa Harvard Apparattus e o tamanho das microcápsulas foi determinado pela geometria do dispositivo e pela combinação das vazões. A produção das cápsulas foi monitorada em microscópio óptico Leica DMi8 acoplado a câmera de alta velocidade colorida Photron. A fase interna flui pelo capilar cilíndrico com ponta cônica enquanto a fase intermediária escoa no interstício deste capilar com o capilar quadrado no mesmo eixo e na mesma direção caracterizando um escoamento coaxial. A fase externa escoa no interstício entre o capilar de coleta e o capilar quadrado na direção oposta configurando o regime de focalização hidrodinâmica (Figura 2). As microcápsulas são coletadas em água à temperatura ambiente e mantidas em movimento até a cura completa do elastômero.

Resultados e discussões: Nesse trabalho foram obtidas as seguintes proporções de polímero base para agente de reticulação: 5:1; 10:1; 12,5:1; 15:1; 17,5:1 e 20:1. As cápsulas com a proporção de 5:1 são as mais rígidas enquanto que as 20:1 são as mais flexíveis, e as espessuras são variáveis dentro de cada proporção, as quais foram controladas com o ajuste da vazão da fase intermediária. Na Figura 3A é possível observar o dispositivo microfluídico em funcionamento na obtenção das cápsulas de proporção 17,5:1. As vazões obtidas para o funcionamento do dispositivo foram: 2000μ L/h a vazão da fase interna (Q interna); 5000μ L/h a vazão da fase externa e 100, 500, 900, 1300 e 1700μ L/h as vazões da fase intermediária (Qm) para alcançar espessuras crescentes de membranas das cápsulas. As cápsulas obtidas foram monodispersas com diâmetros médios de $706 \pm 5,14$; $724 \pm 3,11$; $723 \pm 2,48$; $727 \pm 3,17$ e $730 \pm 2,45\mu$ m e as espessuras de membranas obtidas foram de $23,7 \pm 1,9$; $31,2 \pm 2,4$; $39,8 \pm 2,0$; $48,7 \pm 2,5$; $57,7 \pm 1,8$ respectivamente. Na Figura 3B estão as imagens microscópicas da fabricação das microcápsulas com as demais proporções obtidas 5:1,10:1,12.5:1,15:1 e 20:1 respectivamente. Houve variação das espessuras em cada proporção.

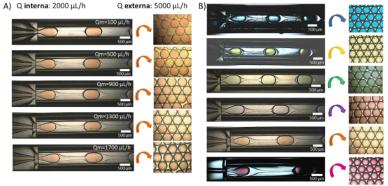


Figura 3 – A) Imagens microscópicas da fabricação das microcápsulas de proporção 17,5:1 com as vazões utilizadas nas fases interna, externa e o aumento da vazão intermediária proporcionando a formação de cápsulas com diferentes espessuras; e B) Imagens microscópicas da fabricação das microcápsulas com as proporções 5:1, 10:1, 12.5:1, 15:1 e 20:1 respectivamente

Uma das aplicações possíveis é a melhora na recuperação de óleo pode ser obtida pelo escoamento dessas dispersões em meios porosos para bloqueio de caminhos preferenciais da água aumentando a diferença de pressão exercida em poros com óleo residual aprisionado. O estudo inicial pode ser realizado em capilares com contrições acoplados a medidores de pressão para estudar o comportamento dessas cápsulas e das suas diferenças de rigidez com as constrições variadas. Uma segunda possível aplicação é a avaliação do efeito de marginalização das microcápsulas que pode ser estudado com fluido específico e vazões determinadas para alcançar a interação entre cápsulas de diferentes flexibilidades durante o escoamento em tubo de vidro. As cápsulas de maior rigidez tendem a migrar para as paredes do tubo, enquanto que as cápsulas mais flexíveis tendem a ficar centralizadas.

Conclusões: Foi possível concluir que o trabalho é promissor para a obtenção de microcápsulas com propriedades controladas com diferentes possíveis aplicações.

Referências e agradecimentos:

- Kumar, A., Henríquez Rivera, R. G. & Graham, M. D. Flow-induced segregation in confined multicomponent suspensions: effects of particle size and rigidity. J. Fluid Mech. 738, 423–462 (2013).
- Cobos, S., Carvalho, M. S. & Alvarado, V. Flow of oil-water emulsions through a constricted capillary. Int. J. Multiph. Flow 35, 507–515 (2009).

O presente trabalho é financiado com recursos da BG Brasil.

Método sem malha de SPH em aplicações de micro-fluídica

Edgar Andrés Patiño Nariño, Hugo Sakai Idagawa, Luiz Otávio Ferreira Saraiva

eapatinon@fem.unicamp.br; idagawa@fem.unicamp.br; lotavio@fem.unicamp.br;

FEM - Faculdade de Engenharia Mecânica, Unicamp

Resumo: O método Smoothed Particle Hydrodynamics (*SPH*) tem-se mostrado um método inovador para aplicações de fluidos em escoamentos com superfície livre, especialmente em aplicações de dimensões macroscópicas. Porém, nos últimos anos com a implementação de tensão superficial usando a formulação *Continuum Surface Force (CSF)* e a metodologia General Equation for the Nonequilibrium Reversible-Irreversible Coupling (GENERIC) que permitem implementar flutuações térmicas, possibilitando a integração com a escala mesoscópica. Assim, o SPH tem-se tornado uma alternativa de interesse para a implementação em micro-fluidos e simulações de micro-dispositivos. Nesse contexto, este trabalho utilizou o método SPH, com resultados promissores, em aplicações de formação de gotículas e escoamento de fluidos em micro-canais para a formação de emulsões bifásicas.

Palavras-Chaves: Micro-canais, fluido bifasico, Smoothed Particle Hydrodynamics.

Introdução: Pelo fato das técnicas tradicionais de *Computational Fluid Dynamics* e as simulações com *Molecular Dynamics* não serem muito adequadas para os micro-fluidos, os pesquisadores estão procurando cada vez mais uma série de relativamente novas técnicas que ofereçam a possibilidade de incluir parâmetros relevantes no espaço e na escala de tempo, entre os níveis atômico e macro. Dessa forma, um modelo desejável deverá ter um caráter multi-escala que acoplará a parte do fluxo entre os estados microscópicos e macroscópicos [1]. Para superar este limitante, tem-se realizado o estudo com os métodos sem malha em escala mesoscópica, tornando-se uma importante alternativa.

Dentro deste contexto destaca-se o método *SPH* . que tem sido bem-sucedido em simulações de problemas multi-escala e multi-fase em microcanais. No método SPH o fluido é representado por um grupo de partículas que interagem entre si e as equações de *Navier-Stokes* são discretizadas e resolvidas nas posições de tais partículas usando um polinômio de interpolação conhecido como *kernel* [2]. Para o desenvolvimento do estado mesoscópico em *SPH* emprega-se o formalismo termodinâmico denominado GENERIC, que estabelece o estado geral das equações de evolução de um sistema através das duas primeiras leis da termodinâmica e o teorema de flutuação-dissipação. Através desse formalismo termodinâmico se obtém um modelo geral do fluido usando partículas, que fornece um guia para incluir as flutuações térmicas de maneira consistente. Além disso, fluidos multi-fasicos, sofrem a influencia da tensão superficial, que deve ser incorporada de forma semelhante a uma membrana fina sobre tensão. Assim, a evolução da interface entre os fluidos tem sido uma tarefa dificil para simulações numéricas. Como solução, emprega-se o modelo de força de superficie contínua *CSF* [3].

Nesse contexto, este trabalho implementou o método SPH utilizando GENERCIC e CSF, obtendo resultados promissores para as aplicações de formação de gota uma e duas fases (Figura 1), os problemas de fluxo de Couvette e fluxo de Poiseuille para duas fases escoando com uma delas em formato circular (Figura 2).

Resultados e discussão: A Figuras 1 apresenta os resultados do simulador *SPH* para o caso de deformação de uma gota sujeita a tensão superficial. Conforme era esperado a gota assume uma forma circular.

A Figuras 2 mostra o escoamento de dois fluidos em um micro-canal simulado em *SPH* para o caso *fluxo de Couvette* e *fluxo de Poiseuille*. Observa-se a deformação da gota imersa em outro fluido devido aos efeitos da tensão superficial.

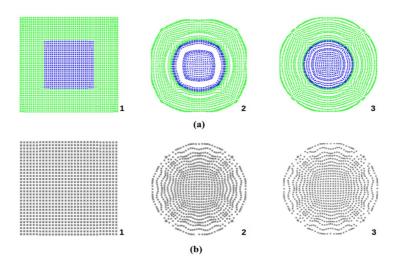


Figura 1. Deformação de uma gota sujeita a tensão superficial: (a) duas fases; (b) uma fase.

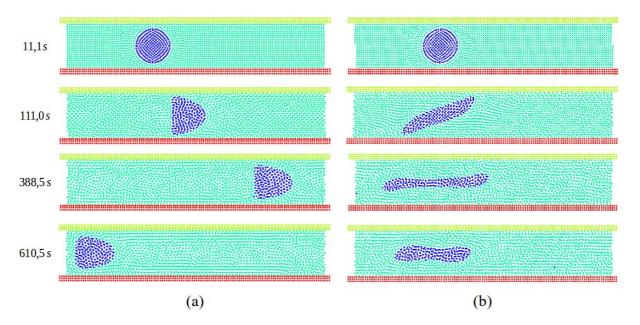


Figura 2. Escoamento de uma gota dentro de um micro-canal: (a) fluxo de Couvette; (b) fluxo de Poiseuille.

Conclusões: Conseguiu-se desenvolver partes fundamentais para a simulação de micro-fluidos na meso-escala empregando o método CSF e as flutuações térmicas integrando a metodologia GENERIC. Também validou-se o simulador com problemas clássicos da literatura como *fluxo de Couvette* e o *fluxo de Poiseuille* para fluidos com duas fases.

Referências

- [1] S. Adami, X. Y. Hu, and N. a. Adams, J. Comput. Phys., 229, 5011 (2010).
- [2] M. B. Liu and G. R. Liu, Arch. Comput. Methods Eng., 17, 25 (2010).
- [3] X. Y. X. Y. Hu and N. a. a. Adams, J. Comput. Phys., 213, 844 (2006).

Implementação do método SPH para criação de emulsões em dispositivo microfluídico

¹E.A. Patiño-Nariño, ²D. S. de Lara, ²S. Moshkalev, ¹L.O.S. Ferreira.

eapatinon@fem.unicamp.br; dslara@unicamp.br; stanisla@unicamp.br; lotavio@fem.unicamp.br;

¹FEM - Faculdade de Engenharia Mecânica, Unicamp, ²CCS-Nano - Centro de Componentes Semicondutores e Nanotecnologias, Unicamp, Rua Pandiá Calógeras, 90, Campinas, SP, Brasil

Resumo: Este trabalho pretende apresentar a implementação do método sem malha de Smoothed Particle Hydrodynamics para a simulação de micro-canais usando micro-fluidos em duas fases, com propriedades tais como tensão superficial usando o método Continuum Surface Force e a metodologia General Equation for the Nonequilibrium Reversible-Irreversible Coupling para adicionar o comportamento mesoscópico do problema com a integração da flutuação térmica. Este trabalho apresenta a simulação do dispositivo em cruz com três entradas, uma saída e com dois fluidos diferentes e imiscíveis. A proposta mostrada neste trabalho, é comparar as etapas iniciais de formação de gota em um dispositivo em cruz, apresentando comportamentos semelhantes de forma qualitativa da simulação e o resultado experimental.

Palavras-Chaves: Métodos de partículas livres de malha, Micro-fluidos, Smoothed Particle Hydrodynamics.

Introdução: Nos sistemas com micro-fluidos aproveitam-se dois atributos principais, a miniaturização e o fluxo laminar (geralmente com número de Reynolds menor de 100), o que permite um melhor controle do processo. Assim, tem uma destacada área de aplicação como os MEMS, as células de combustão, a recuperação de petróleo, os dispositivos de análise química e biológica, e a biomedicina [1].

A criação de emulsões geradas por dispositivos microfluídicos vem sendo crescentemente utilizada devido a suas potencialidades nas áreas de biotecnologia e química [2], entre elas está o estudo de células individuais. A focalização hidrodinâmica com a criação de gotas de volume controlado permite uma grande quantidade de comparações que podem levar a dados relevantes [3].

Os métodos Lagrangianos sem malha de particulas de smoothed Particle Hydrodynamics (*SPH*) usando as equações de continuidade de Navier-Stokes (*NS*) além de integrar as metodologias de *CSF e GENERIC* para o estado mesoscópico com tensão superficial em duas fases e a flutuação térmica, apresentam-se como uma nova alternativa para a simulação de micro-fluidos em microdispositivos, em comparação aos métodos tradicionais de malha e os métodos de Dinâmica Molecular [5].

Este trabalho apresenta a simulação do dispositivo em cruz com três entradas, uma saída e com dois fluidos diferentes e imiscíveis (ver Figura 1 (a)). O objetivo deste dispositivo é permitir a injeção de uma camada de interface entre o líquido que corre no centro do canal e os outros dois que correm à margem, permitindo diversas configurações de injeção. Portanto, a saída seletiva permite que a combinação de fluxos ou partículas injetadas sejam separadas na saída.

A litografia macia foi usada para construção do dispositivo de vidro com PDMS (polidimetilsiloxano). O molde, que dá forma aos canais, foi construído utilizando um substrato de silício de 3" de diâmetro fotolitogravado com SU-8 na espessura de 50μm por escrita direta laser (Direct laser writing). O equipamento utilizado neste processo foi uma μPG101 Heidelberg pertencente ao Laboratório multiusuário do Instituto de Física da Unicamp (Lamult- IFGW). O microdispositivo gerado tem canais de largura de 300μm com profundidade de 50μm (Figura 1 (b)). Um setup de experimental contando com bombas de seringa e microscopia ótica foi montado para observação do comportamento dinâmico dos líquidos. Desse modo, o objetivo deste trabalho é comparar as

etapas iniciais do dispositivo em cruz na formação de gota, e comparação qualitativa da simulação e o resultado experimental.

Resultados e discussão: Temos três entradas e uma saída como observa-se na Figura 1 (a): os fluidos de entrada das margens (2 e 3) são iguais, no entanto o fluido do centro (1) é diferente e imiscível com os fluidos 2 e 3. Os fluidos escoam em função de uma relação $f_1 = 10 f_2 = 10 f_3$. Na Figura 2 observa-se o resultado da simulação e da experimentação do dispositivo em cruz. Mostrando semelhança no comportamento na interação entre os dois fluidos.

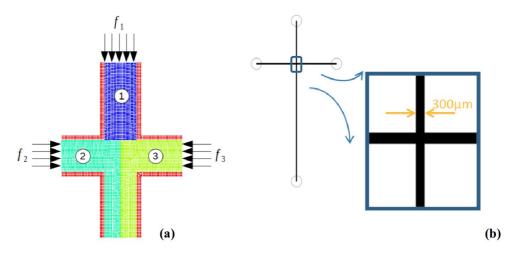


Figura 1. (a) Disposição inicial da simulação do dispositivo em Cruz. **(b)** Configuração de dimensões do dispositivo em Cruz.

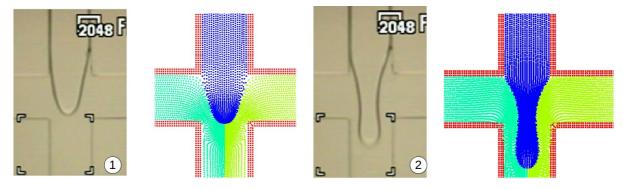


Figura 2. Comparação qualitativa entre a simulação e resultado experimental para dois instantes diferentes de formação na interação entre o fluido central e os fluidos do margem.

Conclusões: O trabalho apresenta um simulador usando o método *SPH* e as metodologias CSF e GENERIC para um micro-dispositivo em cruz. A comparação entre o caso experimental e a simulação apresentam comportamentos semelhantes de forma qualitativa. Assim, a configuração implementada neste trabalho com *SPH* mostra indícios para se tornar um ferramenta novel na simulação de micro-fluidos e micro-dispositivos.

Referências:

- [1] T. M. Squires and S. R. Quake, Rev. Mod. Phys., 77, 977 (2005).
- [2] Bertie, J.; Silberzan, P, Microfluidics for biotecnology, Artech House (2010).
- [3] Wang, B. L.; Ghaderi, A.; Zhou, H.; Agresti, J.; Weitz, D. A.; Fink, G. R.; Stephanopoulos, G., *Nature Biotechnology*, **32**, 473 (2014)..
- [4] S. Adami, X. Y. Hu, and N. a. Adams, J. Comput. Phys. 229, 5011 (2010).

Miniaturização de bioeletrodos implantáveis baseados em fibras de carbono para biocélula a combustível de glicose/O₂

Fernanda C. P. F. Sales, Frank N. Crespilho

fcsales@iqsc.usp.br; frankcrespilho@iqsc.usp.com

Resumo: A biocélula a combustível (BFC) de glicose/O₂ representa uma alternativa para conversão de energia elétrica e aplicação em dispositivos médicos implantáveis, como bombas de insulina, marca-passos e biossensores. No entanto, a miniaturização dos bioeletrodos é uma das principais etapas para o seu desenvolvimento. Assim, nosso Grupo tem proposto utilizar microfibras flexíveis de carbono (FCF) esfoliadas e tratadas quimicamente, visando obter eletrodos enzimáticos miniaturizados, tanto bioânodos como biocátodos. Como exemplo, apresentam-se dois tipos de eletrodos implantados, um em mamífero (rato) e em um inseto (formiga). Esses compõem duas BFC de glicose/O₂ miniaturizadas e dispostas dentro de cateteres de vidro ou polímero. Para a BFC implantada em mamífero, ênfase foi dada para imobilização da enzima glicose oxidase (GOx) utilizando um mediador redox polimérico. Já para a BFC miniaturizada e implantada em insetos, avaliouse o biocátodo contendo a enzima bilirrubina oxidase (BOx) e o mediador ABTS²⁻.

Palavras-Chaves: bioeletrodos implantáveis; glicose oxidase; glicose desidrogenase; bilirrubina oxidase

Introdução: As principais características em bioeletrodos implantáveis, visando aplicação em biocélula a combustível (BFC) de glicose/O₂, são o tamanho e a eficiência biocatalítica. Uma questão associada à complexidade desses bioeletrodos é o próprio processo de implante em si, envolvendo procedimentos cirúrgicos com intuito de alojá-los em determinada região do organismo [1]. BFCs implantadas em organismos vivos atuam como conversores de energia química em energia elétrica para alimentar dispositivos, como marca-passo, bioestimuladores elétricos, carreadores de fármacos, biossensores e bombas de insulina [2, 3]. Dentre os combustíveis aplicáveis em BFC, a glicose vem sendo explorada [3], pois apresenta a vantagem de estar presente nos fluídos biológicos. Por exemplo, a concentração de glicose no sangue está no intervalo de 3 a 5 mmol L⁻¹, enquanto que a de oxigênio é de aproximadamente 45 μmol L⁻¹, possibilitando o desenvolvimento de BFC de glicose/O₂ com bioeletrodos de fibras flexíveis de carbono (FCF) para implantes bioeletrônicos. Assim, apresentam-se aqui dois tipos de eletrodos implantados, um em mamífero (rato) e em um inseto (formiga). Ênfase foi dada na obtenção das curvas de potências *in vivo*.

Procedimento experimental: Para implante em mamíferos (Fig. 1a-d), a BFC consiste em FCF inseridas em um cateter de polietileno (diâmetro interno 0,5 mm e diâmetro externo 0,9 mm) delimitadas com resina epóxi (Fig. 1d). Para preparação do bioânodo, depositou-se o mediador vermelho neutro na superfície das fibras. Em seguida, imobilizou-se a enzima glicose oxidase (GOx) no eletrodo modificado. Para obtenção do cátodo, nanopartículas de platina estabilizadas com o dendrímero poliamidoamina foram adsorvidas nas FCF. Já para implante em insetos (Fig. 1e), inseriram-se os bioeletrodos no cateter de vidro (diâmetro interno 0,5 mm e diâmetro externo 0,3 mm), resultado em uma BFC com 25 mm², utilizando como eletrólito natural a hemolinfa. No bioânodo, as fibras foram tratadas quimicamente, seguidas da eletropolimerização do mediador vermelho neutro. Por ultimo, imobilizou-se a enzima glicose desidrogenase (GDh) na superfície das fibras. Para o biocátodo, a enzima bilirrubina oxidase (BOx) e o mediador ABTS²- foram imobilizados por aprisionamento com Náfion®. Para estudos *in vitro*, verificou-se a eficiência bioeletrocatalítica dos eletrodos em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L¹-1).

Resultados e discussão: O desempenho da BFC *in vivo* dentro da veia jugular do rato apresentou uma densidade de potência máxima de 95 μ W cm⁻² em 80 mV e um potencial de circuito aberto de 125 mV (Fig. 1g). Além disso, em um estudo de estabilidade por 24 horas (dado não apresentado) se observou que a densidade de potencia máxima permaneceu praticamente estável, com pequenas oscilações em torno de 95 μ W cm⁻² em 80 mV. Já o desempenho da BFC implantada na formiga (parte superior da cabeça), a densidade de potência máxima foi 5,0 μ W cm⁻² em 320 mV, com potencial de circuito aberto de 500 mV (Fig. 1g).

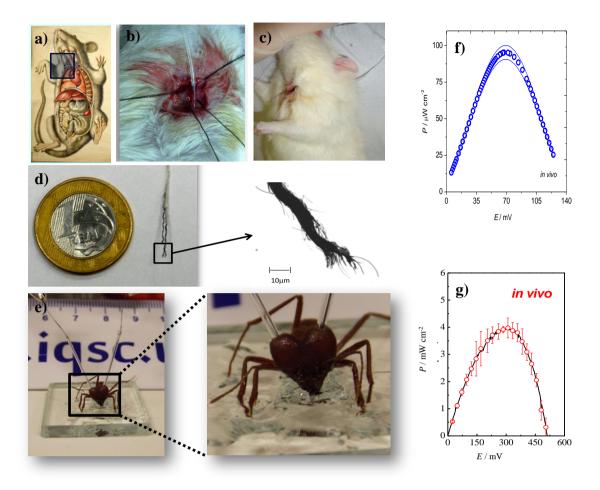


Figura 1 – **a)** Ilustração esquemática do local do implante em mamíferos (veia jugular). **b, c)** fotografia da BFC implantada na jugular do rato da espécie *Rattus norvegicus* (Comitê de ética em experimentação animal CEUA/UFABC – protocolo nº. 001/2010). **d)** bioeletrodos inseridos em um cateter de polietileno para o implante no mamífero. **e,f)** imagem da BFC implantada na cabeça da formiga da espécie *Atta sexdens rubopilosa*. **g, h)** BFC operando *in vivo*, implantada na veia jugular do rato e na cabeça da formiga, respectivamente.

Conclusões: Esse estudo reporta um conceito de bioeletrodos miniaturizados baseados em fibras flexíveis de carbono utilizando cateteres de polietileno e vidro. O biodispositivo inserido no cateter polimérico apresenta flexibilidade, o que facilita a manipulação e implante da BFC em regiões específicas, como a veia jugular de um rato. Já para locais mais rígidos, como é o caso da cabeça da formiga, a utilização de cateter de vidro é mais viável. Outra característica importante das BFCs desenvolvidas nesse trabalho são as FCF, por serem flexíveis e também biocompatível, possibilitando o desenvolvimento de biodispositivos implantáveis.

Referências e agradecimentos:

[1] F.C.P.F. Sales; R.M. Iost; M.V.A. Martins; M.C. Almeida; F.N. Crespilho, Lab on a Chip, 13, 468-474 (2013).

[2] R.M. Iost; F.C.P.F. Sales; M.V.A. Martins; M.C. Almeida; F.N. Crespilho, ChemEletroChem, 2, 518-521 (2015).

[3] R. A. S. Luz; A. R. Pereira; J. C. P. de Souza; F.C.P.F. Sales; F.N. Crespilho, ChemEletroChem, 1, 1751-1777 (2014).

FAPESP (F. C. P. F. Sales, n°. do projeto: 2013/07829-0; F. N. Crespilho, n°. dos projetos: 2015/16672-3 and 2013/14262-7), CNPq (F. N. Crespilho, n°. do projeto: 478525/2013-3), INEO, Nanomedicine Network NanoBioMed-Brasil, CAPES.

Dispositivo microfluídico baseado em gradiente de concentração convectivo para o crescimento de células bacterianas.

<u>Franciele Flores Vit</u>, Aline Furtado Oliveira, Marcelo Lancellotti, Lucimara Gaziola de la Torre

fran.flores@hotmail.com; alinefurtado@feq.unicamp.br; lancellotim@gmail.com; latorre@feq.unicamp.br

Resumo: Microfluídica é a ciência que explora o escoamento em canais de dimensões micrométricas, permitindo a redução de tempo de investigação e o consumo de reagentes. Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de um dispositivo microfluídico com sistema de membranas, capaz de gerar um gradiente de concentração convectivo. O dispositivo permitiu o monitoramento do crescimento celular da bactéria Escherichia coli, estabelecendo assim estratégias para estimativa de parâmetros cinéticos. Para isso, foi desenvolvido um microdispositivo construído todo de polidimetilsiloxano laminado (PDMS_{LAM}). Como prova de conceito foi utilizada a Escherichia coli que contem em seu interior um gene de plasmídeo GFP que possibilita a emissão de fluorescência. Por meio de microscopia de epifluorescência foi possível correlacionar o número de células com a intensidade de fluorescência emitida. Com isso, foi possível obter os perfis de velocidades específicas de crescimento (μ_x) para o microdispositivo projetado, comparando-o com o crescimento em sistema batelada.

Palavras-Chaves: microfluídica ,bactérias, bioprocessos, microdispositivo.

Introdução: Microfluídica é um ramo da hidrodinâmica, em que o interesse científico e o desenvolvimento tecnológico têm sido foco de estudo durante a última década, devido sua rápida evolução no campo de sistemas reacionais. A microfluídica trata de fluidos em sistemas miniaturizados e têm aplicações nas áreas de engenharia química, farmacêutica e, biotecnológicas [1]. A biotecnologia aplicada diretamente à microbiologia pode se beneficiar de técnicas microfluídicas, contribuindo para desenvolvimento de novos processos. Exemplos são: o estudo de cinética celular, monitoramento das reações intracelulares, quantificação do crescimento microbiano [2]. O emprego de microdispositivos possibilita análises precisas de reações químicas e bioquímicas utilizando, quantidades mínimas de reagentes [3]. No entanto, estudos sistemáticos de populações bacterianas em ambientes microfluídicos, são escassos, especialmente para casos em que um gradiente de concentração é aplicado para a obtenção de parâmetros cinéticos. Neste contexto, o objetivo desse trabalho consiste fabricação de dispositivo microfluídico construído em Polidimetilsiloxano laminado (PDMS_{LAM}). Esse foi utilizado para a estimativa dos parâmetros cinéticos da bactéria *Escherichia coli*, neutralizando o efeito da quimiotaxia. O cultivo em dispositivo microfluídico foi comparado ao do sistema em batelada, mostrando sua potencialidade de aplicação.

Procedimento experimental: Construção do dispositivo microfluídico: O dispositivo foi projetado utilizando o software Corel Draw®. Para a fabricação dos canais e das laterais das câmaras de cultivo foram utilizados PDMS laminado espessura de 50 μm (Stockwell Elastomerics-EUA), o elastômero foi cortados utilizando a técnica de ablação em máquina de laser de CO₂ L-Solution 100 (Gravograph-EUA), numa potência de 35 W. Para haver o geração do gradiente convectivo, foi construída uma rede de canais responsáveis por levar o substrato até as câmaras de cultivo[4,5]. A profundidade das câmaras de cultivo do microdispositivo foram mantidas em 50μm.

Obtenção da velocidade específica de crescimento em sistema batelada: O cultivo das células ocorreu em meio Luria –Bertani (LB), com concentração inicial de 75 células/mL. O sistema foi mantido a 37°C, sob agitação constante. O número de células foi obtido através da análise da fluorescência emitida pela bactéria. Foram obtidas amostras em intervalos de tempo de 15 a 30 minutos (triplicatas independentes), utilizando microscopia de epifluorescência com objetiva de 10 x de aumento. A velocidade específica de crescimento foi obtida nas fases de crescimento exponencial.

<u>Cultivo das bactérias em dispositivo microfluídico:</u> As bactérias foram inoculadas nas câmaras de cultivo microfluídico, na mesma concentração de células do sistema batelada. O meio de cultura foi bombeado (bomba seringa) pelos canais durante 5 horas, monitorando o comportamento da bactéria por meio de microscopia de epifluorescência, adquirindo imagens no mesmo intervalo de tempo que o cultivo batelada. Utilizando o software

de analise de imagens Image J, a fluorescência média foi obtida e foram construídas as curvas de crescimento específico para o microdispositivo.

Resultados e discussão: Construção e concepção do dispositivo microfluídico: Os dispositivos microfluídicos foram projetados de modo a: (i) garantir a aquisição de dados sobre o crescimento microbiano em diferentes concentrações de substrato limitante e (ii) utilizar câmaras de cultivo que inibam a quimiotaxia das bactérias. Os detalhes da construção do dispositivo estão apresentados na Figura 1, dividindo o dispositivo em duas regiões principais: Superior (canais de distribuição de meio de cultura) e inferior (câmara de cultivo). A Região superior (Figura 1 A) tem como função distribuir de meio de cultura. Para permitir que ocorra a paralelização e avaliação em diferentes concentrações de substrato, o projeto contemplou a divisão dos canais seguindo o conceito de resistências elétricas. Já Região inferior, Figura 1A estão localizadas as câmaras de cultivos (diâmetro médio de 630 μm, e profundidade de 50 μm), onde as células foram inoculadas durante o processo de montagem. Essas câmaras foram separadas da Região superior, por meio de uma membrana de policarbonato de 470nm (diâmetro dos poros). A membrana semipermeável permitiu a passagem do meio de cultura na Região superior para a Região inferior, retendo as bactérias nas câmaras de cultivo. Em cada um desses canais, foram construídas três câmaras de cultivo em sequência, para que as triplicatas fossem obtidas simultaneamente.

Crescimento *E.coli* em sistema microfluídico em comparação com o sistema batelada: A Figura 1B apresenta as curvas de crescimento da bactéria em sistema convencional batelada e em dispositivo microfluídico. Os parâmetros operacionais adotados para o microdispositivo foram os mesmos que os realizados em batelada convencional (temperatura e número de células iniciais). As intensidades foram normalizadas com a fluorescência inicial e as velocidades específicas de crescimento microbiano na fase de crescimento exponencial foram obtidas (Figura 1B). As velocidades específicas para do microdispositivo apresentaram valor similar, sem diferença estatisticamente significativa (p>0.05), quando comparado ao sistema batelada.

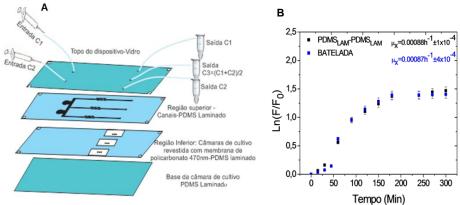


Figura 1-A) Diagrama esquemático da funcionalidade do dispositivo microfluídico. Vista tridimensional apresentando o esquema de montagem do microdispositivo. (i) tampa de vidro, contendo duas entradas e três saídas. A tampa permite o encaixe de mangueiras, o qual é responsável pelo escoamento de meio de cultura para a Região superior. (ii) Região superior: onde ocorre a geração do gradiente convectivo, responsável por alimentar as câmaras de cultivo presente na Região inferior. (iii) Região inferior: câmaras de cultivos, onde houve a inoculação de forma manual das células bacterianas, sendo separadas da corrente de escoamento superior por membrana semipermeável.(iv) base do dispositivo. B) Curvas de crescimento específico do microdispositivo em comparação com a curva do sistema batelada convencional. A concentração inicial de células foi de 75 células/mL, cultivadas em 25 mL em meio LB, a 37°C, durante 5 horas. As barras significam desvio padrão entre as triplicatas independentes.

Conclusões: Com base nos valores da velocidade específica do dispositivo microfluídico, quando comparado aos sistemas convencionais de cultivo microbiológico (batelada), consegue-se mimetizar as mesmas condições de funcionamento. Isso atesta a eficácia do uso de dispositivos microfluídicos para a obtenção de parâmetros cinéticos de bactérias, o que demonstra a sua potencialidade para aplicações biotecnológicas.

Referências e agradecimentos:

Referências: [1]G.M. Whitesides, Nature 442, 368 (2006).

- [2] J. Atencia; D.J. Beebe, Nature, 437, 648 (2005).
- [3] A.F. Oliveira. et al ,Biochemical Engineering Journal, 105, 288(2016).
- [4] N.L.JEON. et al, Langmuir, **16**, 8311(2000)
- [5] J.DIAO. et al, Lab on a chip, **6**, 381(2006).

Agradecimentos: A Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

FABRICATION OF CONDUCTIVE TRACKS USING 3D PRINTING TECHNOLOGY

Gabriel Gaal, Antonio Riul Jr, Varlei Rodrigues.

gaal@ifi.unicamp.br; riul@ifi.unicamp.br; varlei@ifi.unicamp.br

Abstract: The simple, fast and efficient prototyping process offered by 3D printing technology makes it suitable across diverse applications and an emerging alternative to traditional approaches. We present here the use of a home-made fused deposition modelling 3D printer for rapid prototyping of interdigitated electrodes with a conductive graphene-based Poly(Lactic Acid) filament, integrate with 3D printed microchannels with transparent Poly(Lactic Acid). In particular, a fully 3D-printed device was easily built in less than 1h, enabling the distinction of basic tastes below the human threshold.

Keyword: 3D printing; Graphene-based PLA; Microchannels; Microfluidic.

Introduction: Nowadays, one of the biggest issues addressed to sensor fabrication is build up efficient electrodes as an alternative to the complex and expensive processes required by traditional techniques. Within this context, printed electronics arises as an interesting alternative due its simplicity and robustness to put electrodes on various surfaces. *Inkjet* printers still dominate the electrodes fabrication as an alternative methodology, however, the machinery required and the conductive ink are too expensive for a broader dissemination. Fused Deposition Modeling (FDM) 3D printing can be widely explored as a cheap and accessible technology to fabricate electrodes, with global growing interest and demand. We show here the fabrication of a 3D printed microfluidic device using a home-made FDM 3D printer and a commercial graphene-based PLA filament to assembly electrodes for microfluidic capacitance-based sensors.

Experimental Methods & Results: It was used a standard home-made 3D printer (Mendel90) with a commercial hot nozzle of 0.4 mm in diameter to extrude thermoplastic filaments of 1.75 mm in diameter. We extruded transparent PLA at 200°C and a graphene-based PLA at 175°C, with the molten filament further deposited on a hot bed (60°C) having (200 x 200) mm², using a mirror as the heated platen to ensure a flat and smooth printing surface. Extruder and hot table are moved by stepper motors following Cartesian coordinates, printing the object in a layer-by-layer process (see Figure 1).

The graphene-based PLA filament was characterized by Raman spectroscopy to verify the presence of the characteristic D, G and 2D graphene peaks. We also carried out preliminary electric characterizations to determine the contact resistance (183 \pm 10 Ω) and sheet resistance (6.0 \pm 0.3 Ω / \square) of a thin film (~15 μ m) of the extruded graphene-based PLA used to fabricate 3D printed interdigitated electrodes (IDEs).

Finally, a simple sensor fully 3D printed and capable to distinguish basic tastes by measuring the impedance of samples flowing onto graphene IDEs comprising 8 pairs of fingers, 20 mm long, 600 μ m width and separated 600 μ m each other. The IDEs were also used as walls for a microchannel having 600 μ m in height, with the whole chip 3D printed in less than 1 hour. We measured the impedance response of the device in the frequency range 1Hz-1MHz, easily distinguishing solutions at 1mM representing basic tastes.

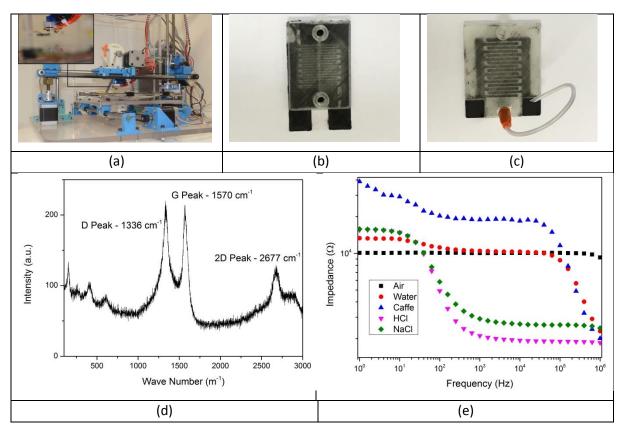


Figure 1 – (a) Home-made 3D printer (Mendel90) used to print the conductive tracks. (b) Microfluidic device fully 3D printed with graphene-based IDEs. (c) Microfluidic device fully 3D printed with graphene-based IDEs with 600 μm in height used as microchannel. (d) Raman spectrum of extruded conductive graphene-based PLA. (e) Impedance response of a fully 3D printed microfluidic device.

Conclusions: Conductive tracks 3D printed with a graphene-based PLA enabled a rapid prototyping and reduction in the steps for the fabrication process of a microfluidic device within a few minutes. A good electrical response, evidenced by the relative low contact and sheet resistance of the 3D printed electrodes, permitted the assembly of a capacitance-based microfluidic sensor distinguishing basic tastes below the human threshold.

Acknowledgments: Authors are grateful to FAPESP (2014/03691-7), CNPq and FAEPEX for financial grants.

Microfluidic devices combining dielectrophoresis trapping and Surface Enhanced Raman Spectroscopy

Gabriela Brito Almeida, Ronei Jesus Poppi, José Alberto Fracassi da Silva

gabrielabr.almeida@gmail.com; fracassi@iqm.unicamp.br; ronei@iqm.unicamp.br

Abstract: Dielectrophoresis (DEP) is the electrokinetic movement of non-charged particles when submitted to non-uniform electric field. This is a growing area, which can be used for trapping, concentration and separation of different particles. Some works have been reported with the intention of trapping metal particles to optimize the Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) effect. In this paper, we use DEP with insulating structures (iDEP) to generate non-uniform electric field for trapping gold nanoparticles (AuNP). The system was coupled to a Raman spectrometer for detection of violet crystal by SERS effect.

Key-words: Dielectrophoresis; Gold nanoparticles; SERS effect

Introduction: Dielectrophoresis (DEP) is the electrokinetic motion of particles produced by polarization effects when the particle is exposed to non-uniform electric field, resulting on the transport of both neutral and charged species. In DEP the separation is based on the size and shape of the particle, in addition to the intrinsic properties of the material and the suspending medium [1]. Most of DEP systems uses microelectrode arrays and alternate current to generate a non-uniform electric field. An alternative to the use of electrodes is the DEP with insulating structures (iDEP), where the voltage is applied across two electrodes connected to the channel and is used a continuous current [2]. The use of DEP to aggregate metal particles has been applied and demonstrated potential to optimize the SERS effect. [3].

Experimental procedure: Gold nanoparticles (AuNP) were synthesized according to Lee [4]. The templates of microdevices were fabricated in silicon wafer by conventional lithography using negative photoresist SU-8. The design of the microchannels was based on literature [3], and the microdevices were fabricated in Polydimethylsiloxane (PDMS). The setup used for iDEp trapping and SERS is shown in Figure 1b. The microdevice was filled with 25 mmol/L phosphate buffer with 3 mmol/L of SDS and 100 ppm of violet crystal and the inlet was filled with 40 μL de AuNP.

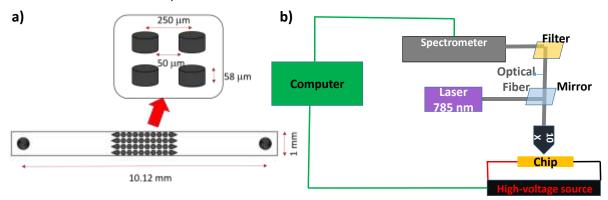


Figure 1: a) Design of the microdevices; b) Setup used to iDEP trapping and Raman spectroscopy.

Results and discussion: Firstly, we had optimized conditions for the trapping of Polystyrene (PS) particles. Concerning the pH of the running buffers, we observed increased stability of the particles in acidic medium, pH 4 and 5. At pH 6 and 7 the particles agglomerated easily. During the experiments we observed different flow regimes, depending on the applied potential. Up to 100 V, there was only the generation of electroosmotic flow. By increasing the applied voltage, stream lines of PS particles were formed (stream regime). Finally, using voltages around 300 V the particles were trapped between the pillars.

Using AuNP it was able to verify the "appearance" of agglomerated particles from 260 V. With the passage of time and increased applied potential there is an increase in the number of AuNP agglomerates formed, making possible the visualization of particles clusters (Figure 2). A solutions containing 100 ppm crystal violet in pH 4

phosphate buffer was used as model for the coupling between iDEP and SERS. Initially, the crystal violet presents no signal, but as the voltage is increased, increases the number of agglomerated AuNP inside the microchannel, causing the intensification of the Raman signal (Figure 3). Thus it appears that the potential influence on the degree of agglomeration of AuNP, and thus can control the number of hot spots with the application of the voltage, enhancing the SERS effect.

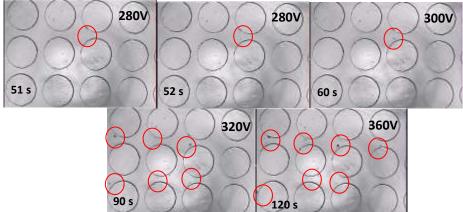


Figure 2:Image of the channel filled with AuNP during DEP experiment (pH 4). The circled areas in red between 51 and 60 seconds, show the emergence of AuNP clusters, while in the other frames one can check new clusters emerge.

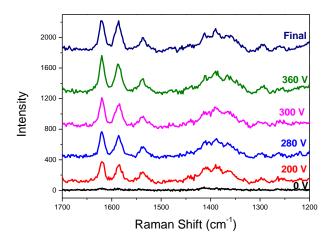


Figure 3: Raman spectra of Crystal Violet 100 ppm 25 mmol/L phosphate buffer containing 3 mmol / L of SDS at pH 7 during iDEP varying the applied potential, obtained in the Raman Station 400 equipment (Perkin Elmer) laser excitation of 785 nm and 250 mW (laser 100%, 2 exhibition 2s-25 cycles). The spectrum identified as the end was obtained after shutdown of the applied voltage.

Conclusions: Through the analysis of the spectra, it was found it is possible to detect Raman with SERS effect directly on the device. Moreover, we have demonstrated the use of DEP to trap AuNP and control the SERS effect.

References e Acknowledgments:

- [1] Qian, C., Huang, H., Chen, L., Li, X., Ge, Z., Chen, T., Yang, Z., Sun, L.; Int. J. Mol. Sci. 2014, 15, 18281-18309
- [2] Yamaguchi, A., Fukuoka, T., Takahashi, R., Hara, R., Utsumi, Y.; Sensors Actuators B 2016, 230, 94-100.
- [3] Martínez-López, J. I., Moncada-Hernández, H., Baylon-Cardiel, J. L., Martínez -Chapa, S. O., Rito-Palomares, M., Lapizco-Encinas, B. H. Anal. Bioanal. Chem. 2009, 394, 293-302.
- [4] Lee, P. C., & Meisel, D. (1982). Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. The Journal of Physical Chemistry, 86(17), 3391-3395.

Authors thank Maria H. O. Piazzeta and Angelo L. Gobbi of LMF (LNNano, CNPEM) for the use of microfabrication laboratory and CNPq and FAPESP for financial support.

Gravity-assisted distillation on a chip: a novel concept for sample preparation in microfluidics

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

gabriela.giordano@lnnano.cnpem.br; luis.vieira@lnnano.cnpem.br; angelo.gobbi@lnnano.cnpem.br; kubota@iqm.unicamp.br; renato.lima@lnnano.cnpem.br

Abstract: We address for the first time the fabrication of a totally integrated microfluidic distiller in accordance with the conventional flash distillation apparatuses connected in series: heating, distillation flask, condenser, and collect of the distillate. Its microfabrication was based on 3D impression, preparation of scaffold, cure of PDMS, and removal of the scaffold.

Keywords: lab-on-a-chip; thermistor; condenser; number of plates; distillate

Introduction: The distillation process was developed by the alchemist Jabir Ibn Hayyan (Geber) in the Middle Ages around the year 800. Nowadays, such approach is widely used in industrial processes and laboratories for sample pretreatment. Disadvantages of this set up include chemical-consuming, slow, manual, laborious, and non-portable assays. Such features undermine parameters such as analytical frequency, precision, simplicity, cost, green chemistry, and in-situ tests. In this case, the macro-to-microscale conversion is a powerful alternative [1]. Despite the relevance of the distillation and the consequent gains with the miniaturization, little attention has been paid to deploy microfluidic distillers [2,3]. The major challenges for miniaturizing the distillation are: phase separation and vapor driving, integration of the functional steps in a single microdevice, complexity and cost of microfabrication, and separation efficiency. Herein, we address for the first time the fabrication of a totally integrated microfluidic distiller in accordance with the conventional flash distillation apparatuses connected in series: heating, distillation flask, condenser, and collect of the distillate. Its microfabrication was based on 3D impression, preparation of scaffold, cure of PDMS, and removal of the scaffold. This process eliminates the use of clean room, high temperature, and the bonding step presenting an operational time of only approximately 1 h. The 3D impression allowed us to construct a distillation chamber with inner volume of 900 µL. As a consequence of such high dimension, the gravity took over the surface forces, thus driving the heated vapor phase during the distillation and eliminating the use of inert carrier gas to control the gas as happen in other microfluidic distillers.

Experimental: The devices were fabricated in PDMS using the polymerization and scaffold-removal method (PSR) [4]. Briefly, a scaffold containing the channel template was initially shaped. Afterwards, PDMS monomers and curing agent at 10:1 w/w ratio were poured onto a pool covering the scaffold altogether. Following the cure of this polymer at 95 °C for 40 min in a laboratory oven, the scaffold was removed creating a bulky device that is composed of a PDMS single block with incorporated distillation units. We focused on the flash mode as proof-of- concept of the totally integrated microdistiller, termed as distiller-on-a-chip (DOC). The scaffold was composed of both sacrificial (distillation chamber, sample inlet, and distillate collect microchannel) and permanent parts (heating component and cooling microchannel). A thermistor and a tube of stainless steel with 200 µm (i.d.) were used as source of heating and water-cooled condenser, respectively. Regarding the sacrificial scaffold, the distillation chamber consisted of a hollow ABS piece that was obtained by 3D impression. The sample inlet was defined by a stainless steel needle (500 µm i.d.), whereas a wire of nylon (800 μm i.d.) produced the collect microchannel. For assembling the scaffold, the piece of ABS (distillation chamber) was placed over the thermistor. The needle was connected to the ABS. The top of the ABS presented a hole to put the wire of nylon. Positive photoresist was added in all of the ABS connections (with thermistor, needle, and nylon) to avoid the filling by PDMS liquid. The removal of the sacrificial scaffold was performed by first dipping the device into acetone. This procedure was intended to get rid of the photoresist. Next, the wire of nylon and the needle of stainless steel were easily withdrawn out by mechanical pressure. Finally, the device was dipped into acetone ultrasound for 4 h to dissolve the piece of ABS. The final flash DOC is shown in Figure 1 (a). The Figure (b) illustrates the instrumentation employed in this work. To evaluate the performance of the flash DOC, this system was applied for screening mixtures composed of 70:30 mol% (50:50 v/v) watermonoethylene glycol (MEG). The volume of the mixtures was approximately 500 µL. The tension values ranged from 5.2 up to 6.2 V. For the water-cooled condenser, water at room temperature was pumped into the tube of stainless steel at 150 µL min⁻¹. The distillations were conducted in batch during 1 h. After, the volume of distillate was collected and its mass was measured. The water concentration in this liquid was determined through the microemulsification-based method (MEC) [5].

Results and discussion: The distillate collect microchannel presented rounded shape and soft walls as depicted in the scanning electron microscopies of the Figure 1 (c). Figures 1 (d) and (e) show IR images of the DOC filled with the previously described mixture of water-MEG at 5.5 V from 1 min to 60 min for air- (A_{CC}) and water-cooled (W_{CC}) condensers, respectively. The temperature gradient enlarges with the time in both these cases. Nonetheless, the temperatures at the region of the condenser remain lower than those values close to the heating source even after 1 h. This result allows the successful accomplishment of the subsequent processes of vaporization and condensation (required for distillation) into a single microdevice even without the circulation of cooling water in condenser. Here, it is worthwhile to underline the importance of the low thermal conductivity of the PDMS (0.16 W mK⁻¹) for achieving such temperature gradients. The Figure 1 (f) presents the temperatures of the water-MEG mixture into the distilling chamber at 5.2, 5.5, and 6.0 V for 1 h utilizing Acc and Wcc condensers. The throughputs changed between 28 and 110 μ L min⁻¹. For a same tension, the throughputs observed when utilizing Wcc were lower than the values obtained with Acc because the excessive condensation of the water in the first mode. In relation to the separation efficiency, water-pure distillates were attained in all of the situations. As depicted in Figure 1 (g), the number of theoretical plates was approximately 1.

Conclusions: Besides the advantages of fabrication, the integration of multi-steps into a single gravity-assisted microdistiller is a remarkable feature by promoting the construction of lab-on-a-chip platforms. Furthermore, the assembling of the microscale platform in agreement with the conventional apparatus will likely contribute for a further growing of distillation-based separations in microfluidics because the possibility to transfer the knowledge acquired from macroscale processes. This knowledge relates to aspects such as dimension of the distillation path, choice of the condenser (air- or water-cooled), modes to control the boiling preventing the bumping contamination (stones or stirring), heating rate (balance between vaporization and condensation).

References:

- [1] B. Stanisch, et al., Chemie Ingenieur Technik 87, 1207 (2015).
- [2] Y. Zhang, et al., Chemical Communications 2750 (2009).
- [3] K. F. Lam, et al., Lab on a Chip 11, 1311 (2011).
- [4] V. Saggiomo and A. H. Velders, Advanced Science 2, 1500125 (5pp) (2015).
- [5] R. S. Lima, et al., Analytical Chemistry 86, 9082 (2014).

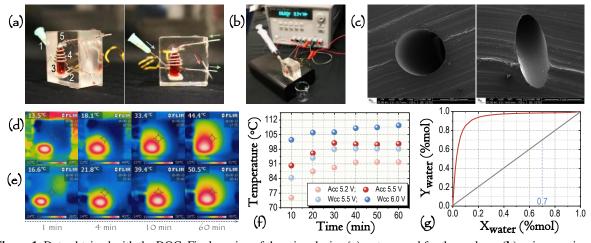


Figure 1. Data obtained with the DOC. Final version of the microdevice (a); set up used for the analyses (b); microscopies of the cross section of the collect channel (c); IR images of the distiller for Acc (d) and Wcc (e) from 1 up to 60 min; temperatures of the mixture into the distilling chamber at 5.2, 5.5, and 6.0 V using Acc and Wcc (f); and composition phase diagram of the water-MEG media (g). In (a): 1, sample inlet; 2, heating component; 3, distilling chamber; 4, condenser; and 5, collect microchannel. The arrows in (a) indicate the flow of inlet (blue), cooling water (green), and distillate (red). The blue dotted lines in (g) indicate the number of theoretical plates that was calculated for the distillations performed herein.

Eletrólise externa em microchips de eletroforese acoplados com detecção condutométrica sem contato

<u>Gerson Francisco Duarte-Junior</u>, Eulício de Oliveira Lobo Junior, Íris Medeiros Junior e Wendell Karlos Tomazelli Coltro

gduartejr16@gmail.com

Resumo: Uma das estratégias para a separação de carboidratos por eletroforese envolve a utilização de um eletrólito de alta condutividade e força iônica. Essas condições favorecem a ocorrência da eletrólise devido a aplicação do potencial. A eletrólise causa uma mudança no pH podendo comprometer a ionização desses compostos bem como levar à variação no tempo de migração. Este trabalho propõe o uso de reservatórios separados para eletrólise externa em microssistemas com o objetivo de minimizar os efeitos da eletrólise na separação eletroforética. A utilização desses reservatórios conferiu ao sistema uma melhor reprodutibilidade e resolução para separação de cinco açúcares.

Palavras-Chaves: detecção C⁴D, carboidratos, microchips

Introdução

A aplicação de potencial em eletrólitos de alta condutividade e força iônica na eletroforese, pode levar a uma variação no tempo de migração (t_m) das espécies comprometendo a reprodutibilidade de uma análise eletroforética. Isso porque ocorre a eletrólise, que leva a uma mudança no pH da solução, aumentando a acidez do reservatório do ânodo e também a alcalinidade do cátodo [1,2]. Com o intuito de minimizar este efeito, foi reportado por de Jesus e coautores, o uso de reservatórios adicionais para eletrólise externa em eletroforese capilar. Com o uso desses reservatórios, eles conseguiram uma maior estabilidade no t_m e resolução em separações eletroforéticas [3].

A separação eletroforética de carboidratos apresenta algumas limitações, uma vez que estas espécies se apresentam naturalmente na forma neutra. Algumas estratégias têm sido propostas para a separação de carboidratos, e uma destas estratégias inclui a utilização de um eletrólito alcalino (pH >12) que garante a ionização destes compostos. Para se utilizar desta estratégia são utilizados eletrólitos com alta concentração de NaOH e adição de compostos para aumentar a força iônica afim de garantir uma boa separação destes compostos [4]. Desta forma, o presente trabalho propõe, pela primeira vez, a implementação de um sistema de eletrólise separada para eletroforese em microssistemas. Esses efeitos foram avaliados na separação de cinco carboidratos utilizando um tampão fortemente alcalino.

Procedimento experimental

As separações eletroforéticas de uma mistura contendo frutose (FRU), galactose (GAL), glicose (GLI), lactose (LAC) e sacarose (SAC) 5 mmol/L cada, foram realizadas em um equipamento comercial de eletroforese em microchips (modelo ER455 Quad MCE System, eDAQ pty, Austrália). Este equipamento é composto por um detector C⁴D modelo ER225, fonte de alta tensão modelo ER230, uma plataforma microfluídica modelo ET225. Foi utilizado microchip comercial de vidro com 90 mm de comprimento modelo T85100C4D (Micronit Microfluídics, Holanda). O eletrólito utilizado para a separação foi composto por NaOH (75 mmol/L) e Na₃PO₄ (10 mmol/L). Foram utilizados quatro reservatórios para eletrólise separada feitos com tubos polipropileno de 1,5 mL. As conexões entre os reservatórios da eletrólise e os reservatórios da plataforma microfluídica foram realizadas de mangueiras de polietileno (0,4 mm d.i.) com pedaço de 2 cm de capilar (75 µm d.i.) na extremidade que conecta à plataforma[3]. As amostras foram injetadas eletrocineticamente pela aplicação de 1 kV de potencial por 10 s. A separações foram realizadas sob potencial de 2,4 kV. A detecção foi realização pela aplicação de um sinal alternado de 200 kHz de frequência e 100 V_{p-p} de amplitude.

Resultados e discussão

O eletrólito utilizado para a separação dos açúcares apresenta alta condutividade e força iônica, fatores que contribuem para a ocorrência da eletrolise. Por esse eletrólito apresentar um pH muito próximo ao da ionização dos açúcares, uma pequena variação pode levar à não ionização destas espécies. A figura 1a mostra representa uma sequência de dez eletroferogramas obtidos sequencialmente para a separação de açúcares sem a utilização dos reservatórios para eletrólise. Observa-se nesta sequência que a partir da sétima análise, o pico referente à sacarose se junta ao pico referente ao marcador do fluxo eletrosmótico (água), mostrando que a partir deste ponto a sacarose não se encontra ionizada devido à diminuição do pH. Na tentativa de solucionar este problema os eletrólitos foram renovados entre cada análise. A Figura 1b mostra uma sequência de três eletroferogramas obtidos ainda sem os reservatórios adicionais. Nestes eletroferogramas o t_m teve uma variação da ordem de 4%.

Considerando que os analitos possuem mobilidades muito próximas, mesmo essa pequena variação é suficiente para comprometer a precisão do método. Outro fator a se observar foi a resolução de separação para os pares LAC/GAL e GAL/GLI, que neste caso ficaram inferior a 1 (ver tabela 1). Para melhorar a reprodutibilidade no $t_{\rm m}$ e uma melhor resolução, recorreu-se à estratégia utilizada por de Jesus e coautores[3], onde quatro reservatórios para eletrólise separada foram utilizados. A Figura 1c apresenta os eletroferogramas registrados com eletrólise separada sob as mesmas condições experimentais já descritas. A variação no tm foi inferior a 1% e a resolução obtida para os pares apresentou valores superiores a 1, como pode ser observado na tabela 1

Tabela1 – Valores de resolução calculados para os eletroferogramas comparando a utilização ou não do sistema de eletrólise separada

Pares	Sem eletrolise separada	Com eletrólise separada			
SAC/LAC	2,17 ± 0,06	2,83 ± 0,09			
LAC/GAL	0,82 ± 0,14	1,21 ± 0,03			
GAL/GLI	0,79 ± 0,09	1,03 ± 0,02			
GLI/FRU	1,38 ± 0,02	1,50 ± 0,02			

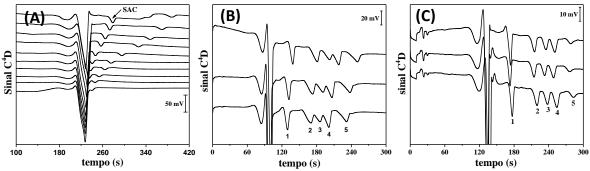


Figura 1 - Eletroferogramas obtidos para separação de uma mistura de açúcares (5 mmol/L cada) em eletrólito composto por NaOH/Na₃PO₄ 75/10 mmol/L. A mistura foi injetada pela aplicação de um potencial de 1 kV por 10 s e a separação ocorreu sob potencial de 2.4 kV. Foi utilizado um sistema comercial de eletroforese em microchips acoplados com detecção C⁴D (modelo ER455 Quad MCE System (eDAQ, Austrália) e microchip comercial de vidro modelo T85100C4D (Micronit Microfluidics, Holanda). Em A não houve substituição do eletrólito enquanto em B, o mesmo foi substituído. Em A e B não foram utilizados o sistema de eletrólise separada enquanto em B foram utilizados os reservatórios adicionais. Detecção: 200 kHz, 100 V_{D-D}. (picos: 1-sacarose; 2-lactose; 3-galactose; 4-glicose; 5-frutose.)

Conclusões

A utilização de reservatórios adicionais para eletrólise externa, proporcionou à análise de carboidratos uma melhor reprodutibilidade e resolução devido à maior estabilidade no pH.

Referências

- [1] Bello M.S. J. of Chromatogr. A, 744, 81 (1996).
- [2] Kelly, M.A., et al, J. of Chromatogr. A, 768, 73, (1997).
- [3] de Jesus, D.P., et al. Analytical Chemistry, 77, 607 (2005).
- [4] Vochyánová B., et al. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 404,1549 (2012).

Agradecimentos

Petrobras, Capes e CNPq

Desenvolvimento de bioeletrodo baseado em arranjo de microfibras flexíveis de carbono e bilirrubina oxidase para redução de oxigênio

Graziela Cristina Sedenho e Frank Nelson Crespilho

graziela.cs@usp.br; frankcrespilho@gmail.com

Resumo: A reação de redução de O_2 biocatalisada pela enzima bilirrubina oxidase (BOx) é bastante estudada para emprego em biocélulas a combustível. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e avalição eletroquímica de um eletrodo baseado em BOx adsorvida em microfibras flexíveis de carbono (MFFC-BOx), o qual visa a reação de redução de O_2 , para aplicação em biocátodo de difusão de gás em biocélula a combustível. O eletrodo MFFC-BOx apresentou potencial de onset para redução de O_2 de O_2 de O_3 (vs. O_2 Ag/AgCl_{KCl(sat)}) e densidade de corrente de O_3 - O_3 mA cm⁻² a O_3 00 V (vs. O_3 Ag/AgCl_{KCl(sat)}). Além disso, pouca variação no valor de OCP foi observada em função do tempo, o que indica boa estabilidade do eletrodo. Com isso, concluiu-se que o emprego de microfibras flexíveis de carbono e BOx é uma estratégia promissora para preparação de biocátodo de difusão de gás para redução de O_2 em biocélulas a combustível.

Palavras-Chaves: reação de redução de oxigênio; bilirrubina oxidase; microfibras flexíveis de carbono.

Introdução: A reação de redução de oxigênio molecular (RRO) biocatalisada pela enzima bilirrubina oxidase (BOx) é bastante explorada para conversão de energia, principalmente como biocátodo em biocélulas a combustível de glicose/O₂. Materiais de carbono, como grafeno, nanotubos de carbono, partículas de carbono e microfibras flexíveis de carbono (MFFC), têm sido amplamente utilizados como plataforma para imobilização de enzimas, por maximizarem a interação entre proteína e superfície do eletrodo [1]. Em particular, as MFFC são excelentes para a realização de transferência eletrônica direta entre enzimas e a superfície do eletrodo, além de apresentarem características físicas notáveis, como elevada flexibilidade, resistência mecânica e boa condutividade elétrica e térmica. Essas características permitem uma variedade de aplicações, como dispositivos microfluídicos flexíveis de biocélulas a combustível e dispositivos implantáveis. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi o estudo de um eletrodo baseado na enzima BOx adsorvida em arranjos de MFFC (MFFC-BOx) para a RRO. Visando futura aplicação em eletrodo de difusão de gás em biocélulas a combustível, avaliaram-se as propriedades eletroquímicas do bioeletrodo em condições fisiológicas.

Procedimento experimental: Os experimentos eletroquímicos foram realizados em uma célula eletroquímica de único compartimento contendo três eletrodos. O eletrodo de trabalho (área = 1,30 cm²) foi constituído de duas camadas suportadas em tecido de carbono (Figura 1): uma delas formada por uma mistura de PTFE e carbono vulcan (XC72R), e a segunda camada (camada catalítica) composta por MFFC (CCS 200) e enzima BOx (proveniente de Myrothecium sp.); como eletrodo de referência utilizou-se uma placa de platina; e um eletrodo de Ag/AgCl (KCl saturado) foi utilizado como referência. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em tampão fosfato pH 7,2, como eletrólito de suporte, a temperatura ambiente. Antes de sua utilização, as MFFC foram lavadas três vezes em isopropanol, secas à temperatura ambiente e maceradas. Para o preparo do eletrodo de trabalho, foi depositada fisicamente uma camada de 3 mg cm⁻² de uma mistura de 30% de PTFE e 70% carbono vulcan sobre uma das faces do tecido de carbono. Para formação da camada catalítica, foram espalhados 3 mg de microfibras flexíveis de carbono, previamente maceradas, suspensas em 100 μL de isopropanol. Após a evaporação do isopropanol à temperatura ambiente, 40 µL de solução de BOx em tampão fosfato pH 7,2 contendo nafion e gluteraldeído foram gotejados na superfície das MFFC. O eletrodo foi armazenado a aproximadamente 8 °C por pelo menos 12 h antes de sua utilização. O contato elétrico do eletrodo de trabalho foi feito a partir de um conjunto de filamentos de fibras de carbono conectadas com auxílio de resina epóxi na superfície inferior tecido de carbono.

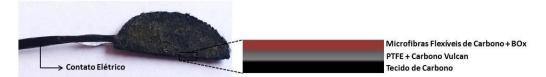


Figura 1. Configuração do eletrodo suportado em tecido de carbono, constituído em uma camada de PTFE e carbono vulcan e uma camada de microfibras flexíveis de carbono e bilirrubina oxidase.

Resultados e discussão: A Figura 2A mostra os voltamogramas cíclicos obtidos com MFFC (branco) e MFFC-BOx, a 5 mV s⁻¹, em tampão fosfato pH 7,2 saturado com N₂ ou com O₂. Com MFFC-Box, observa-se que o potencial de *onset* para a eletrorredução de oxigênio é 0,56 V (*vs.* Ag/AgCl_{KCl(sat)}), o qual corresponde a 0,76 V (*vs.* NHE, pH 7,2), valor este próximo ao potencial teórico. Em 0,00 V (*vs.* Ag/AgCl_{KCl(sat)}), observa-se uma densidade de corrente para a redução de oxigênio de -0,35 mA cm⁻². Quando se emprega o eletrodo MFFC, a redução de oxigênio se inicia em 0,02 V (*vs.* Ag/AgCl_{KCl(sat)}), com corrente faradaica de -2,56 μA cm⁻² a 0,00 V (*vs.* Ag/AgCl_{KCl(sat)}). Como mostra a Figura 2B, o potencial de *onset* obtido com o bioeletrodo é consistente com o valor do potencial de circuito aberto (OCP), -0,14 V (*vs.* Ag/AgCl_{KCl(sat)}) e 0,53 V (*vs.* Ag/AgCl_{KCl(sat)}) na ausência e na presença de O₂, respectivamente. Também, com o eletrodo MFFC-BOx, monitorou-se o comportamento transiente do OCP, em escala de hora, observando-se poucas variações no valor do potencial até 6h, como mostra Figura 2C. Assim, conclui-se que o bioeletrodo é estável em 0,52 V (*vs.* Ag/AgCl_{KCl(sat)}), o que mostra que o emprego da camada catalítica contendo microfibras flexíveis de carbono e BOx pode ser uma boa estratégia para preparação de um biocátodo enzimático de difusão de gás para a RRO.

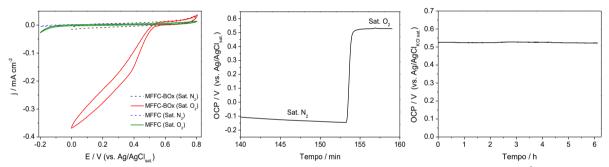


Figura 2. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo MFFC ou MFFC-BOx, a 5 mV s⁻¹, em tampão fosfato pH 7,2 na presença e ausência de oxigênio. (B) OCP utilizando eletrodo MFFC-BOx na presença e ausência de oxigênio. (C) Comportamento transiente do OCP, em atmosfera aberta, utilizando MFFC-BOx.

Conclusões: Devido a estabilidade e as ótimas propriedades biocatalíticas apresentadas pelo eletrodo MFFC-BOx frente à RRO, conclui-se que camada catalítica contendo microfibras flexíveis de carbono e BOx pode ser uma boa estratégia para preparação de um biocátodo enzimático de difusão de gás para a RRO em uma biocélula a combustível.

Referências e agradecimentos:

[1] A.R. Pereira, J.C.P. Souza, R.M. Iost, F.C.P.F. Sales, F.N. Crespilho, J. Electroanal. Chem. In press (2016).

FAPESP (2015/22973-6, 2015/16672-3, 2013/14262-7), CNPq (478525/2013-3), INEO, IQSC-USP.

Microestruturação/microfabricação usando laser de femtossegundo para o desenvolvimento de sistemas de microfluídica

Guilherme Tujera, <u>Marcos R. Cardoso</u>, Cleber R. Mendonça Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo

guilherme.tujera@usp.br; cardosomr@ifsc.usp.br; crmendon@ifsc.usp.br

Resumo: Nos últimos anos, dispositivos de microfluídica vêm se destacando devido ao seu grande potencial para aplicação em sistemas analíticos, aparelhos biomédicos, ferramentas para química e bioquímica, como também sistemas para pesquisa básica [1, 2]. A manipulação de líquidos e gases em escalas da ordem de micro/nanolitros depende da existência de canais de circulação com secção reta em escala micrométrica. A produção de canais com tais dimensões só é possível com uso de técnicas específicas de estruturação e processamento. Neste trabalho usamos laser de femtossegundo para produção de microcanais em PMMA com a possibilidade de integração de sensores. A técnica consiste basicamente na focalização de luz de alta intensidade na amostra enquanto a mesma é transladada. A alta resolução espacial da técnica nos permite produzir circuitos complexos de microcanais para integração de sensores diversos e sua aplicação em nano/microfluídica.

Palavras-Chaves: microfluídica; laser; femtossegundo; microcanais

Introdução: A produção dos microcanais é feita pela técnica de microestruturação a laser. Microestruturação por ablação a laser é um processo pelo qual se usa luz laser para produzir microestruturas na superfície ou no volume de um material. A ablação do material ocorre com a ruptura óptica causada pela transferência de energia do campo óptico para o material, ionizando-o e gerando um grande número de elétrons que, por sua vez, transferem essa energia para a estrutura da rede resultando na evolução catastrófica de danos estruturais.

Procedimento experimental: O aparato experimental consiste no uso de um oscilador laser que emite pulsos de 50 fs centrados em 800 nm a uma taxa de repetição de 5 MHz. O laser é então focalizado na amostra através de uma objetiva de microscópio com abertura numérica NA 0.65 enquanto a amostra é transladada através de estágios de translação controlados por computador.

Resultados e discussão: A técnica de microestruturação descrita acima nos permite criar microcanais com largura e profundidade de 50 e 30 micrometros respectivamente. Além disso, nos permite produzir circuitos diversos de microcanais para a integração de sensores. Devido sua alta resolução espacial característica do processo de ablação por absorção de dois fótons, o uso de laser de femtossegundo para a produção de microcanais tem se mostrado uma ferramenta bastante interessante no sentido de que podem ser fabricados detalhes com resolução da ordem de poucos microns.

Agradecimentos: Os autores agradecem as agencias de fomento pelo suporte financeiro, FAPESP, CAPES e CNPq e também ao Andre L. Romero pelo auxilio no Laboratório.

Referências:

- [1] McDonald, J.C., et al., Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). Electrophoresis, 2000. 21(1): p. 27-40.
- [2] Whitesides, G.M., et al., Soft lithography in biology and biochemistry. Annual Review of Biomedical Engineering, 2001. 3: p. 335-373.

Liquid-liquid partial solvent extraction using a 3D flow focalization device

<u>Houari Cobas Gomez</u>, Jéssica Gonçalves da Silva, Jocasta Mileski Machado, Bianca Oliveira Agio, Francisco Jorge Soares de Oliveira, Antonio Carlos Seabra, & Mario Ricardo Gongora-Rubio

hcobas_gomez@yahoo.com.br; jessicagoncalves773@gmail.com; jocasta@ipt.br; boagio@ipt.br; fjorge@ipt.br; acseabra@lsi.usp.br; gongoram@ipt.br

Abstract: A LTCC microfluidic 3D flow focalization device for partial solvent extraction is presented. The designed device ensures a centered 3D focalized solvent stream along the main channel. Output channels take the central fluid out separately from the surrounding. For a device concept proof, acetone and water were used as organic and aqueous phases. COMSOL was used for microfluidics and chemical transport simulation. The extraction efficiency parameter was used as indicator for device performance validation. Simulation results showed main channel length (L_{CD}) and output hydraulic diameter (OD_H) as the variables with stronger effect on extraction efficiency. Obtained simulated efficiencies were as high as 80.6%. A microfluidic device was fabricated with $L_{CD}=21$,4 mm and ODH=214,63 μ m. Extraction efficiency was indirectly measured using gas chromatography technique. Experimental results were in agreement with simulation, returning extraction efficiencies of 80.8% \pm 2.2%.

Key words: 3D Flow Focalization, Solvent Extraction, Microfluidics, LTCC Technology.

Introduction: Liquid-liquid extraction with microfluidic devices is based on contacting two different liquids flowing through a microchannel. At the contacting interface a diffusion gradient is established allowing the material diffusion from the highest concentration liquid to the lower one. Different microfluidic approach has been used, as an example H channels configuration can be mentioned [1]. The 3D flow focalization has showed to be an interesting alternative for the diffusion process improvement [2-5]. Unfortunately, 3D microfluidics devices already reported in the scientific literature does not allow the solvent extraction because devices have just only one output.

The present work shows the possibility to use a 3D flow focalization device in a partial solvent extraction scheme. In order to attain this goal a microfluidic device with two inputs and two outputs was projected and built with LTCC technology.

Device Layout and working principle: Proposed device is shown in Fig. 1a. It is composed by three parts, the inputs and outputs channels distribution and the main channel ($L_{CD} = 21,4$ mm and $D_H = 772 \mu m$). The device has two inputs for the organic and aqueous phases and two outputs for sample and discard solutions.

A 3D hydrodynamic organic phase focalization along the main channel is assured thanks to the projected input channels, Fig. 1b [5]. Outputs channels configuration allows for partial solvent extraction, Fig. 1c. Along the main channel a conical like diffusion pattern is expected thanks to 3D hydrodynamic flow focalization and fluid motion. As far as fluids travel by the main channel, solvent diffuses radially from the channel center to the walls. As consequence, a solvent spread out at the main channel cross section output is expected. A wisely located output channel ($D_H = 214.63 \mu m$) collects the focalized stream. The diffused solvent flows out the device by the discard outputs channels. In this way the focalized stream reduces partially its solvent

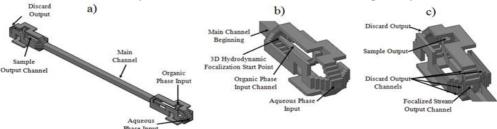


Fig. 1 Microfluidic device tridimensional project. a) Full device; b) Inputs channels section details; c) Output channels section details.

Experimental Design: The study was conducted in two stages. First, simulations were done with five devices configurations. Then experiments were done with the device which showed better simulation results. A factorial experimental planning with central point was used to access the effect of process variables on the extraction efficiency. For simulations, those variables were flow rate ratio (R_Q), total flow rate (Q_T), main channel length (L_{CD}) and focalized stream channel output hydraulic diameter (OD_H). By its time, physical experiments used R_Q and Q_T as process variables. Experiments were conducted in triplicate for statistical analysis.

Results: The Pareto Chart obtained from simulation results, Fig. 2a, shows that extraction efficiency is highly influenced by the process variables OD_H (inversely proportional) and L_{CD} (directly proportional). Simulations predict means extraction efficiencies values better than 53.8%. The best configuration was obtained for the lowest OD_H and highest L_{CD} values (predicted mean extraction efficiency value of 80.6%). For the second experimental stage, a device with $OD_H = 214.63~\mu m$ and $L_{CD} = 21.4~\mu m$ mas fabricated. Experimental results show the Q_T as the process variable influencing the extraction efficiency (inversely proportional), Fig. 2b. The Fig. 2c shows the mean value, the standard deviation from triplicate data and the Peclet number for used combinations. Extraction efficiencies in the order of $80.8\% \pm 2.2\%$ were obtained for $Q_T = 1~\mu L/\mu m$. For higher Q_T values, the best results were obtained for the higher R_O values.

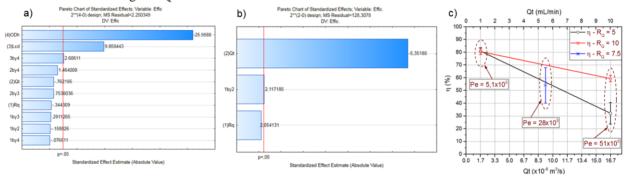


Fig. 2 Obtained results. a)Pareto Chart for simulation results; c) Pareto Chart for experimental results; c) Experimental data mean value and standard deviation.

Conclusions: This work presents a LTCC 3D flow focalization device for partial solvent extraction. Simulation results show the focalized stream channel output hydraulic diameter and the main channel length as the process variables influencing the extraction efficiency. Predicted mean extraction efficiency values as high as 80.6% were obtained. Experimental trials with the device with better simulation results point the total flow rate as the variable influencing the extraction efficiency. The best scenario for higher extraction efficiency is a total flow rate ratio of 1 mL/min. For this process conditions extraction efficiency in the order of $80.8\% \pm 2.2\%$ is obtained.

References and Acknowledgments:

References: [1] N. Assmann, A. Ladosz, and P. Rudolf von Rohr, "Continuous Micro Liquid-Liquid Extraction," *Chemical Engineering and Technology*, vol. 36, pp. 921-936, 2013.

- [2] J. N. Schianti, N. P. N. Cerize, A. M. Oliveira, S. Derenzo, and M. R. Góngora-Rubio, "3-D LTCC microfluidic device as a tool for studying nanoprecipitation," 8th Ibero-American Congress on Sensors, IBERSENSOR 2012, vol. 421, 2013.
- [3] M. R. Gongora-Rubio, J. d. N. Schianti, H. Cobas, and A. d. C. Teves, "LTCC-3D Coaxial Flow Focusing Microfluidic Reactor for Micro and Nanoparticle Fabrication and Production Scale-Out," Journal of Microelectronic & Electronic Packaging, vol. 10, 2013.
- [4] 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, "Development of a LTCC Micro Spray Dryer," in Sensors (IBERSENSOR), 2014 IEEE 9th Ibero-American Congress on, 2014, pp. 1-5.
- [5] H. C. Gomez, M. R. Gongora-Rubio, B. O. Agio, J. De Novais Schianti, V. Tiemi Kimura, A. M. De Oliveira, L. Wasnievski Da Silva De Luca Ramos, and A. C. Seabra, "3D focalization microfluidic device built with LTCC technology for nanoparticle generation using nanoprecipitation route," Journal of Ceramic Science and Technology, vol. 6, pp. 329-338, 2015.

Acknowledgments: We acknowledge FINEP contract N°01.11.0108.00 and CAPES for financial support. Andre Luiz Nunis from the Institute for Technological Research for COMSOL simulations facilities.

Sistemas microfluídicos para a incorporação de small interfering rna (sirna) em lipossomas catiônicos e para transfecção in vitro de células de mamíferos

<u>Ismail Es</u>, Meryem Ok, Marianna Teixeira de Pinho Favaro, Marcelo Szymanski, Adriano Rodrigues Azzoni, Lucimara Gaziola de la Torre

ismailes@feq.unicamp.br; dreameryem7@gmail.com; marianna.nani@gmail.com; detoledo.mas@gmail.com; adriano.azzoni@usp.br; latorre@feq.unicamp.br

Resumo: Esse trabalho visou o desenvolvimento tecnológico de sistemas lipossomas catiônicos (LCs) de dimensões nanométrica para incorporar small interfering RNA (siRNA-silenciador) usando microfluídica a fim de obter vetores não-virais, visando aplicações na área de terapia gênica. A microfluídica é uma técnica que utiliza o escoamento em canais da ordem de micrômetros e permite o controle de moléculas no espaço e tempo. Lipossomas catiônicos (LCs) foram produzidos em dispositivo microfluídico. Em seguida, foi avaliado o estudo da complexação eletrostática entre LCs e siRNA em processo convencional "bulk", sendo comparado ao processo microfluídico. O estudo de transfecção estática na células HeLa foi realizado em placa de Elisa e a citotoxicidade do complexo foi medida. Também foram avaliadas as propriedades físicoquímicas e bioquímicas dos complexos (LCs, LCs-siRNA). O valor ótimo de razão molar de cargas foi determinado como R±70.

Palavras-Chaves: microfluídica; lipossomas catiônicos; silenciamento; siRNA; terapia gênica

Introdução: A terapia gênica é uma técnica que vem sendo investigada desde 1962, quando Waclaw Szybalski realizou primeiro estudo de transferência gênica em células mamíferos (Wirth et al. 2013) e esta se baseia na inserção de ácidos nucleicos capazes de corrigir algum defeito genético pela própria célula do indivíduo, viabilizando a cura de doenças (Miller, 1998). A utilização de moléculas pequenas de RNA, denominadas siRNA (small interfering RNA, silenciador), tornou-se uma ferramenta promissora para o knock-down (silenciamento) pós-transcricional de genes defeituosos (Tuschl, 2001). No entanto, a entrega dos ácidos nucleicos no interior das células requer a superação de várias barreiras (extra e intracelulares), sendo o emprego de vetores não virais uma estratégia promissora. Dentre os vetores não virais, destacam-se os lipossomas catiônicos. Os lipossomas são sistemas coloidais formados a partir da autoagregação de lipídios, formando vesículas que mimetizam as membranas celulares (Lasic & Barenholz, 1996). Várias técnicas têm sido investigadas para garantir a produção de lipossomas nas propriedades físico-químicas apropriadas, tais como diâmetro e polidispersidade. Nesse contexto, a microfluídica emerge como uma técnica promissora. Microfluídica é um campo multidisciplinar que opera dispositivos em escala micrométrica e trabalha com pequenas quantidades de fluidos, apresentando grandes vantagens em relação aos sistemas convencionais (Halldorsson et al., 2015). O ambiente dentro de sistemas microfluídicos permite um controle preciso e a otimização de vários processos. Isto leva a uma das aplicações mais importantes de microfluídica, que é a síntese, formação e auto-agregação de nanopartículas e lipossomas.

Procedimento experimental:

Microfabricação do dispositivo microfluídico: A fabricação dos dispositivos microfluídicos de Polidimetilsiloxano (PDMS)/vidro foi realizada no Laboratório de Microfabricação (LMF), Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Métodos de Fotolitografia UV convencional foram empregados para fabricação dos moldes de replicação e os microcanais de PDMS foram moldados utilizando Litografia Macia. A selagem entre a lâmina de vidro e o PDMS com os canais microfluídicos foi realizada via plasma de oxigênio (Balbino et al, 2013).

Formação de lipossomas catiônicos em microcanais: Os lipossomas foram obtidos em dispositivos microfluídicos de focalização hidrodinâmica, de acordo com a metodologia previamente estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa (Balbino et al., 2013), usando lipídeos EPC:DOTAP:DOPE (2:1:1 molar).

Complexação de siRNA/LC pelo método convencional "bulk": A formação dos complexos foi realizada através de uma complexação eletrostática, a qual é tradicionalmente utilizada em laboratórios. Basicamente, a solução de RNA foi adicionada à solução de carreadores (LC) em diferentes razões molares de carga (R±). A complexação foi realizada em processo "bulk" a partir da mistura em eppendorf e a homogeneização foi realizada por simples pipetagem.

Complexação de siRNA/LC em microcanais: A solução de siRNA (em tampão aquoso) e os lipídeos (dispersos em etanol) foram introduzidas no dispositivo microfluídico por bombas (Harvard Apparatus) de seringa (Hamilton Company). A complexação de lipossomas com siRNA foi realizada acordo com método descrito anteriormente (Balbino et al. 2013) utilizando siRNA

Estudo de transfecção estática na células HeLa: As células HeLa foram cultivadas em placa de Elisa de 24 poços. As células foram transfectadas com complexo de LC/siRNA. Após 24 horas de transfecção, a atividade enzimática de luciferase foi avaliada acordo com Promega Luciferase Assay Protocol.

Caracterização físico-química do complexo de lipossomas catiônicos/siRNA (siRNA/LC): Os lipossomas catiônicos, carregando siRNAs foram caracterizados nos seguintes parâmetros: (1) diâmetro médio e distribuição de tamanhos (índice de polidispersidade – PI) por Dynamic Light Scattering (DLS), densidade de carga superficial (potencial zeta) e estabilidade física ao longo da estocagem, utilizando equipamento Zetasizer da Malvern

Resultados e discussão:

Efeito de proporção de carga-molar em propriedades físico-química do complexo de siRNA/LC:

O diâmetro e potencial zeta de lipoplexo (siRNA/LC) produzido em *bulk* foi R \pm = 60. Similarmente, o índice de polidispersidade (PdI) e potencial zeta estavam estáveis onde a média de PdI era abaixo de 0.2, a qual corresponde para R \pm = 60 ou acima.

Ensaio de fluorescência: O efeito da carga molar em relação à acessibilidade de siRNA foi investigado utilizando brometo de etídio (EtBr) como uma sonda fluorescente.

Transfecção de células HeLa: A transfecção das células HeLa, que foi primeiro realizada com pVAX - LUC e em seguida com lipoplexo, teve resultado satisfatório na entrega do siRNA. Depois de 24 horas de transfecção, a atividade enzimática de luciferase das células transfectadas com lipoplexos estava significativamente mais baixa do que a de células transfectadas com lipossoma ou Lipofectamine.

Conclusões: No presente estudo, a complexação de siRNA/LC foi realizada em bulk e sistema microfluídico. A razão molar de cargas foi otimizada e definida como R±70 e esse valor foi utilizado para avaliar o efeito em trasfecção e citotoxicidade. Os lipoplexos produzidos em dois sistemas apresentaram as propriedades físico-químicas estáveis. Contudo, os complexos produzidos com sistema microfluídico apresentaram o tamanho menor do que produção em bulk e a polidispersidade foi similar para os dois sistemas. Após a transfecção de células com os lipoplexos, o efeito de silenciamento foi observado. A citotoxicidade causada por lipoplexos era de baixo nível e aceitável na aplicação em terapia génica.

Agradecimentos:

Ismail Es agradece pela bolsa de estudo da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Número de processo: 2015/14468-0).

Referências e agradecimentos:

[1]BALBINO, T. A.; AOKI, N. T.; GASPERINI, A.A.; OLIVEIRA, C.L.; AZZONI, A. R.; CAVALCANTI, L.P.; DE LA TORRE, L. G. Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. Chem. Eng. J., v. 15, n. 226, p. 423-33, 2013.

[2]HALLDORSSON, S.; LUCUMI, E.; GÓMEZ-SJÖBERG, R.; FLEMING, R. M. Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. Biosens. and Bioelectron., v. 63, p. 218-231, 2015. [3]MILLER, A. D. Cationic liposomes for gene therapy. Angewandte Chemie Int. Ed., v. 37, n. 13-14, p. 1768-1785, 1998.

[4]LASIC, D. D.; BARENHOLZ, Y. Handbook of nonmedical applications of liposomes, from gene delivery and diagnosis to ecology. CRC Press, v. 4. p. 31-40, 1996.

[5]TUSCHL, T. RNA interference and small interfering RNAs. Eur. J. of Chem. Biol., v. 2, n. 4, p. 239-245, 2001. [6]WIRTH, T.; PARKER, N.; YLA-HERTTUALA, S. History of gene therapy. Gene, v. 525, n. 2, p. 162-169, 2013.

Resultados preliminares da formação de nanopartículas de ouro sobre papel na detecção colorimétrica de Hg⁺²

<u>Jacqueline Arguello¹</u>, Vanessa C. Ribas¹, Thiago M. G. Cardoso², Wendell K. T. Coltro²

¹Instituto de Química, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

jacqueline.arguello@ufrgs.br; v.ribas.vr@gmail.com; tmgcgyn@hotmail.com; wendell@ufg.br

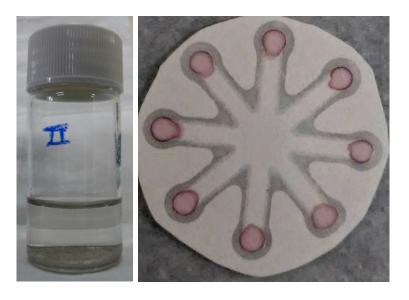
Resumo: Este trabalho descreve o desenvolvimento de um sensor colorimétrico para detecção de Hg^{+2} utilizando dispositivos microfluídicos de papel ($\mu PADs$). A mudança de incolor a rosa devido à reação de redução de Au^+ a Au^0 foi utilizada para a detecção colorimétrica.

Palavras-Chaves: Hg^{+2} , detecção colorimétrica, nanopartículas de ouro

Introdução: Nanopartículas de ouro (AuNPs) vem sendo amplamente utilizadas em uma variedade de aplicações biomédicas e analíticas. Devido a sua excelente biocompatibilidade, condutividade elétrica e elevada relação superficie/volume, são especialmente úteis na liberação de fármacos, tratamento fototérmico de células cancerosas, imagens, sensores, entre outras. Soluções coloidais de ouro podem ser facilmente obtidas a partir da redução química do ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) em solução aquosa na presença de um agente estabilizante que evita a aglomeração das partículas. As AuNPs exibem cores diferentes dependendo da sua forma e tamanho; este fenômeno pode ser explicado considerando às oscilações dos elétrons da banda de condução em ressonância com a luz incidente, denominada ressonância dos plasmons de superfície. Entorno de 100 nm elas apresentam uma cor púrpura, enquanto que as de 20 nm são mais avermelhadas. A mudança de cor devido à agregação ou a corrosão das AuNPs tem sido amplamente utilizada na detecção colorimétrica de íons metálicos. O método é simples, rápido e de baixo custo. Para detecção de Hg⁺², uma nova abordagem foi proposta, a qual consiste na reação de desproporcionamento de Au⁺ a Au⁰ + Au⁺³ induzido pelo Hg⁺².

Procedimento experimental: Uma solução contendo 5,3 mM de AuCl₄ foi preparada na presença de 0,5 % do polímero cloreto de 3-n-propil(4-metilpiridinio)silsesquioxano (SiMePyCl) e 1% do polímero brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB). Ácido ascórbico foi utilizado como agente redutor. A solução ficou imediatamente laranja e posteriormente incolor. Foram depositados 0,5 μL da solução na zona de detecção e deixadas secar a temperatura ambiente, essa operação foi repetida três vezes. Os μPADs utilizados consistiram de oito zonas de detecção conectadas por canais microfluídicos e uma zona central para aplicação da amostra.³

Resultados e discussão: Uma solução incolor foi obtida pela redução de AuCl₄ com acido ascórbico na presença de CTAB e e SiMePyCl como mostra a imagem abaixo. Após 18 dias a cor da solução não foi alterada. O ensaio para Hg⁺² foi realizada adicionando uma alíquota da amostra na região central do dispositivo, a qual foi rapidamente distribuída através dos canais por ação capilar, revelando a cor rosa na zona de detecção.



Conclusões: O trabalho encontrasse em estagio inicial, mas a estabilidade da solução de Au⁺ e a mudança de coloração observada demonstram o potencial de aplicação do sensor.

Referências: [1] Lev Dykmana and Nikolai Khlebtsov, Chem. Soc. Rev., 2012, 41, 2256

[2] S. Anandhakumar, R. Rajaram, J. Mathiyarasu, Analyst, 2014, 139, 3356

[3] Thiago M. G. Cardoso, Paulo T. Garcia, Wendell K. T. Coltro, Anal. Methods, 2015, 7, 7311

Agradecimentos: INCTBio, PROPESQ-UFRGS

Dispositivo microfluídico para aplicação em sensores SPR

Johny Paulo Monteiro, Sheila Maria Predabon, Emerson Marcelo Girotto

johnymonteiro@utfpr.edu.br; sheilapredabon@hotmail.com; emgirotto@uem.br

Resumo: O efeito de ressonância de plasmon de superficie (SPR) utilizando arranjos de nanoburacos construídos em filmes finos de ouro tem sido utilizado para a construção de biosensores com sucesso. Essas plataformas sensitivas podem ser acopladas a sistemas microfluídicos fabricados em PDMS; sua utilização proporciona vantagens operacionais quando comparados a sistemas macroscópicos de análise. Nesse trabalho foi proposto um dispositivo plasmônico microfluídico que se mostrou com alta sensibilidade a variações de índice de refração sobre a superfície do metal. O arranjo óptico experimental permitiu o monitoramento da intensidade de luz transmitida pelos nanoburacos. A sensibilidade média obtida de quatro arranjos testados foi de 4146 unidades de intensidade/UIR, um valor excepcional quando comparado a outros sistemas. Isso mostra que o dispositivo possui alto potencial para ser aplicado como biosensor SPR.

Palavras-Chaves: biosensores; arranjos de nanoburacos; SPR; plasmon de superfície; microfluídos.

Introdução: O efeito de ressonância de plasmon de superfície (SPR) consiste de uma interação ressonante dos elétrons da banda de condução de um metal com o campo elétrico da luz presa na superfície desse metal. Uma maneira conveniente de excitar os plasmons de superfície (SPs) é através da incidência de luz sobre um filme fino de ouro contendo arranjos de nanoburacos [1]. Os SPs possuem elevada sensibilidade frente a variações do índice de refração na interface metal/dielétrico onde o campo eletromagnético dos SPs permanece extremamente confinado [2]. Essa característica fez com que biosensores ópticos SPR tivesses sido desenvolvidos para caracterização e quantificação de eventos de ligação que ocorrem próximos à superfície do metal. Além disso, os sensores SPR baseados em arranjos de nanoburacos (que possuem área sensorial micrométrica) podem ser acoplados a sistemas microfluídicos. Esses sistemas consistem de canais e estruturas fabricadas em escala micrométrica as quais executam a entrega de fluídos de interesse sobre a plataforma sensorial. Sistemas que operam com microfluídos utilizam pequenas quantidades de reagentes, propiciam aumento na velocidade da análise além de permitir análises de múltiplos analitos ao mesmo tempo. A estrutura de microcanais normalmente é fabricada em polidimetilsiloxano (PDMS) por meio da técnica denominada soft litography [3]. Nesse trabalho foi proposto a construção de um sistema de microfluídos em PDMS a qual foi acoplado em um substrato plasmônico baseado em arranjos de nanoburacos de ouro objetivando um dispositivo óptico de elevada sensibilidade à variações de índice de refração para aplicação como biosensor SPR.

Procedimento experimental: Os arranjos de nanoburacos foram fabricados por FIB conforme já descrito pelo nosso grupo [1]. Foram construídos 4 arranjos quadrados idênticos em filme de ouro com 100 nm de espessura suportado em placa de vidro comum (2,5 x 2,5 cm e 1,0 mm de espessura). Os arranjos possuem uma distância entre si de 400 µm. O substrato foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para obtenção da estrutura de microcanais microfluídicos, uma placa de vidro comum (2,5 x 2,5 cm e 1,0 mm de espessura) inicialmente foi limpa com "solução piranha" (H₂SO_{4conc}:H₂O₂ 30 volumes, 3:1). Na sequência foram realizadas etapas (conforme relatado por Carneiro e colaboradores [4]) que permitiram a obtenção de uma peça de PDMS contendo uma estrutura de microcanais. Após sua obtenção, os microcanais foram alinhados com os arranjos de nanoburacos presentes no substrato com a ajuda de um microscópio óptico (Quimis, Q738MIT) trinocular equipado com lente objetiva e ocular com magnificação de 10x cada. O conjunto (substrato e PDMS) foi montado em uma cela de alumínio e acoplado em um sistema experimental composto de laser He/Ne (emissão em 632,8 nm), lentes objetivas, microscópio de medição e câmera CCD montados sobre mesa óptica para obtenção de imagens dos arranjos. O fluxo de solução pelos canais foi realizado utilizando uma bomba de seringa (Harvard Apparatus, 11 Plus). Para caracterização da sensibilidade dos arranjos foram preparadas soluções aquosas de glicose com diferentes índices de refração. Cada solução de glicose foi passada sobre os arranjos (2,0 mL/h) e foram registradas 50 imagens sequencias de cada arranjo de nanoburacos imersos nas diferentes soluções de glicose. Usando o software Image J foram obtidos os valores de intensidade média transmitida pelos arranjos a partir das imagens CCD.

Resultados e discussão: As imagens obtidas por MEV dos arranjos de nanoburacos contidos no substrato estão apresentadas na Figura 1. Nas Figuras 1A e 1B são mostradas imagens dos 4 arranjos (enumerados de 1 a 4) e do arranjo #2 ampliado, respectivamente.

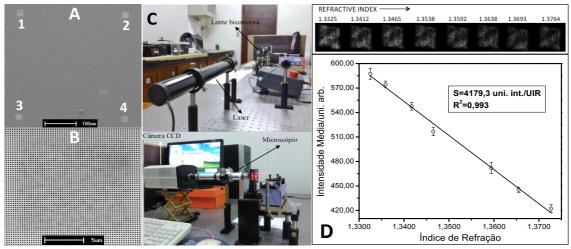


Figura 1. Em A e B são apresentadas as imagens de MEV para os quatro arranjos do substrato e para o arranjo #2 ampliado, respectivamente. As imagens fotográficas de parte do *setup* experimental empregado nas medidas ópticas estão apresentadas em C. Em D superior são apresentadas as imagens CCD obtidas para o arranjo #2 imerso em soluções aquosas de glicose com índices de refração crescentes. Uma curva de intensidade transmitida (obtidas através das imagens CCD) versus índice de refração é apresentado em D inferior (S é a inclinação da curva e R² é o coeficiente de ajuste linear).

Os arranjos possuem profundidade de 100 nm (espessura do filme de ouro), área de ca. 557 µm², buracos com diâmetro de 200 nm e periodicidade (distância entre os centros de dois buracos vizinhos no plano xy) de 400 nm. Os arranjos de nanoburacos apresentando esses parâmetros geométricos produzem uma banda de transmissão, devido a excitação de SPs, com máximo ao redor de 633 nm. Isso os tornam úteis para serem empregados em um arranjo experimental que opera com laser He/Ne e que se baseia na medida de intensidade de transmissão de luz. Utilizando o arranjo experimental apresentado na Figura 1C foi possível adquirir imagens CCD dos arranjos do substrato (do lado inverso ao de incidência de luz) imersos nas soluções de glicose (Figura 1D superior mostra imagens CCD obtidas para o arranjo #2). Essas imagens mostram que a intensidade média de luz transmitida pelos arranjos é sensível à variações de índice de refração já que a intensidade média diminuiu à medida que os índices de refração aumentaram, o que é um comportamento satisfatório. A intensidade média de luz transmitida pelo arranjo #2 foi plotada em função do índice de refração de cada solução. A curva de sensibilidade obtida está apresentada na Figura 1D inferior. A inclinação da curva é definida como o valor numérico da sensibilidade. O maior valor de sensibilidade foi alcançado para o arranjo #2, sendo de 4178 unidades de intensidade/UIR (UIR = unidades de índice de refração). Considerando todos os arranjos, o valor médio de sensibilidade foi de 4146 uni. int./UIR. Esse valor foi muito maior do que aqueles obtidos para outros substratos plasmônicos baseados em arranjos de nanoburacos reportados na literatura, os quais ficam entre 200 e 500 nm/UIR. A sensibilidade obtida aqui é comparável a sensibilidade de equipamentos SPR convencionais (configuração de Kretschmann) a qual alcança valores entre 3100 a 8000 nm/UIR.

Conclusões: A sensibilidade media de 4146 uni. int./UIR utilizando transdução óptica baseada em aquisição de imagens, obtida de 4 arranjos de nanoburacos contidos no substrato, foi considerada elevada se comparada à de outros dispositivos SPR. Assim, considera-se que o substrato plasmônico proposto tem grande potencial para ser aplicado na construção de biosensores plasmônicos empregado na detecção de pequenas concentrações de analitos.

Referências e agradecimentos:

- [1] J.P. Monteiro, J.H. Oliveira, E. Radovanovic, A.G. Brolo, E.M. Girotto, Plasmonics 11, 45 (2016).
- [2] W.L. Barnes, A. Dereux, T.W. Ebbesen, Nature 424, 824 (2003).
- [3] S.K. Sia, G.M. Whitesides, Electrophoresis 24, 3563 (2003).
- [4] L.B. Carneiro, J. Ferreira, M.J.L. Santos, J.P. Monteiro, E.M. Girotto, Applied Surface Science, 257, 10514 (2011).

A equipe agradece à UEM e UTFPR e aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pelo aporte financeiro.

Efeito da molhabilidade na saturação de óleo residual em micromodelos com tratamento de superfície

Jorge Avedano, Nicolle Lima, Marisa Bazzi, Jose Antonio Quevedo e Márcio S. Carvalho

jorge@lmmp.mec.puc-rio.br; nicolle@lmmp.mec.puc-rio.br; marisa@lmmp.mec.puc-rio.br; antonio@lmmp.mec.puc-rio.br; msc@puc-rio.br

Resumo: Métodos avançados de recuperação são altamente influenciados pela molhabilidade da rocha que contém o óleo. Nesse trabalho utilizamos um micromodelo representativo de um meio poroso, cujas superfícies foram tratadas hidrofóbica e hidrofilicamente, para visualizar o deslocamento de óleo por água. Os micromodelos compostos por canais de 100 micrometros apresentam diferentes tamanhos de constrições (85 e 63 micrometros) e são inicialmente saturados com óleo mineral. Água deionizada é injetada utilizando uma bomba de seringa à diferentes taxas de injeção, com números de capilaridade variando entre $3x10^{-7}$ e $5x10^{-5}$. Utilizando um microscópio invertido é feita uma varredura no meio poroso, através da análise das imagens obtidas é possível calcular a saturação de óleo residual ao final da injeção. Os resultados mostram a diferença nos padrões de saturação, influenciados pelo tratamento de superfície no micromodelo. Entender esse mecanismo é o primeiro passo para entender como se dá a recuperação avançada em meios porosos reais.

Palavras-Chaves: recuperação avançada de petróleo; molhabilidade; microfluídica; meios porosos

Introdução:

A molhabilidade dos reservatórios tem uma forte influência no escoamento associado ao deslocamento de fluidos em métodos avançados de recuperação. Apesar de não ser possível encontrar reservatórios naturais totalmente molháveis à água ou ao óleo, é importante entender os mecanismos associados ao escoamento bifásico em ambas condições.

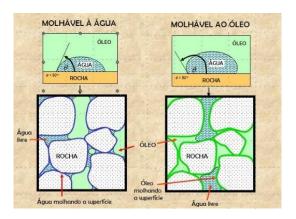


Figura 1 – Rochas molháveis à água e ao óleo (Adaptado de Crain's Petrophysical Handbook)

Procedimento experimental: A montagem experimental (Figura 2) consiste dos seguintes componentes:

- 1. Micromodelo de vidro (Figura 3): Representação artificial de um meio poroso, formado por poros e gargantas interconectados.
- 2. Sistema de injeção de fluidos: Bombas de seringa e seringas contendo os fluidos a serem injetados.
- 3. Sistema de visualização do fluxo através do meio poroso: Composto de um microscópio invertido e uma câmera.
- 4. Sistema para processamento de imagens: Computador com o software comercial ImageJ para processar as imagens.

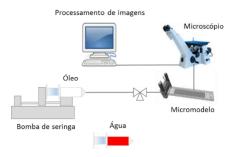


Figura 2 - Esquema da montagem experimental

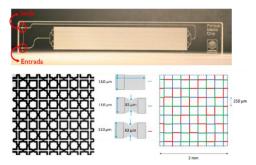


Figura 3 – Micromodelo de vidro

Resultados e discussão:

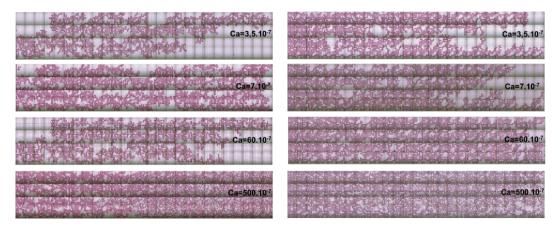


Figura 4 – Perfis de saturação após a injeção de água nos meios molháveis à água (esquerda) e ao óleo (direita)

A Figura 4 mostra os padrões de escoamento observados após a injeção de dois volumes porosos nos micromodelos com tratamento de superfície. Observamos para o micromodelo hidrofílico que o escoamento se dá principalmente por capilaridade, uma maior quantidade de caminhos preferenciais é formada e a recuperação de óleo aumenta com o aumento do número de capilaridade. Para o micromodelo hidrofóbico, pode-se observar o fenômeno de "snap-off" da fase óleo, bloqueando assim o caminho de água. Desta forma, a varredura torna-se mais uniforme, levando a maiores valores de recuperação de óleo, principalmente a baixos números de capilaridade.

Conclusões:

Meios porosos molháveis ao óleo são mais eficientes em termos de saturação de óleo residual comparados com meios molháveis à água, analisados após a injeção de água. Essa tendência pode ser observada principalmente para baixos valores de números de capilaridade (Ca), sugerindo que o escoamento ocorre devido a um gradiente de pressão. Além disso, a formação de caminhos preferenciais (para baixos números de capilaridade) nos meios molháveis à água sugere um escoamento por capilaridade.

Em todos os casos, o aumento no número de capilaridade implica em uma diminuição na saturação de óleo residual. Analisando o padrão formando pelos fluidos após o deslocamento é possível perceber também que a varredura é mais eficiente na entrada do micromodelo.

Referências:

- [1] Morrow, N. R. (2013). Wettability and Its Effect on Oil Recovery. *Journal of Petroleum Technology*, 42(12), 1476–1484.
- [2] Zhao, X., Blunt, M. J., & Yao, J. (2010). Pore-scale modeling: Effects of wettability on waterflood oil recovery. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 71(3-4), 169–178.
- [3] Thomas, S. (2007). Enhanced Oil Recovery An Overview. Oil & Gas Science and Technology Revue de l'IFP, 63(1), 9–19.
- [4] Ju, B., Fan, T., & Li, Z. (2012). Improving water injectivity and enhancing oil recovery by wettability control using nanopowders. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 86-87, 206–216.
- [5]Crain, E. R. Wettability. Crain's Petrophysical Handbook. https://www.spec2000.net/09-wettability.htm. Acesso em junho de 2016

Determinação de Fe (III) por imagens digitais para estudo de corrosão de placas metálicas usando microssistemas a base de poliestireno

<u>Juliano Passaretti Filho</u>, Marco Antônio Gomes Valente Junior , Paulo Clairmont F. de Lima Gomes, Arnaldo Alves Cardoso

<u>juliano.passaretti@gmail.com</u>, m.valentejr@yahoo.com.br, pauloclair@gmail.com, acardoso@iq.unesp.br

Resumo: Neste trabalho foi desenvolvido um método acelerado para determinação de Fe^{3+} em placas metálicas submetidas a um processo de corrosão empregando técnicas de μTAG . O método proposto consiste na reação de Fe^{3+} e tiocianato de amônio impregnado em uma folha de transparência. A detecção dos spots coloridos foi realizada de forma automática utilizando técnicas de segmentação de imagem. O método desenvolvido possibilitou acompanhar a variação de corrosão de uma placa metálica de áreas de 1.0 cm² em tempo de 0 a 21 horas exposto ao ambiente corrosivo utilizando volumes de 4 μL por spot analisado reduzindo o uso de reagentes tóxicos.

Palavras-Chaves: Corrosão Aço; Imagens digitais; Determinação de Fe³⁺

Introdução: A comercialização de metais ou ligas metálicas envolve estratégias de preservação do material nas etapas de estocagem e transporte[1]. Os problemas causados pela corrosão atmosférica que ocorrem durante o armazenamento e transporte de peças metálicas podem resultar na inviabilidade do seu uso final e resultar em prejuízos econômicos[2]. Dessa maneira, essas peças metálicas recebem proteção para evitar danos. Testes acelerados de corrosão são feitos para avaliar a resistência do material, sendo essencial a avaliação da taxa de corrosão[3]. Diversos métodos são usados para avaliar a corrosão, sendo o ensaio gravimétrico o mais usado, contudo para obter variação de massa mensurável com precisão e confiança requer o uso de grandes placas metálicas. Como alternativa, o monitoramento de Fe³⁺ pode ser feito para avaliar a corrosão da placa metálica. Dessa forma, foi desenvolvido um método para determinação de Fe³⁺ usando uma reação colorimétrica clássica da química analítica com tiocianato em meio ácido[4].

Procedimento experimental: A reação foi feita um microssistema a base de papel de poliestireno liso (transparência de retroprojetores), usando spots com diâmetro de 3,4 mm impressos por uma impressora toner. Cada spot recebeu 4 μL de solução de tiocianato de amônio 0,190 mol L⁻¹. Após a adição do tiocianato nos spots, a placa foi seca em uma estufa a 60°C por 8 minutos, ficando depositado o precipitado de NH₄SCN (Figura 1 a). Em seguida, a reação colorimétrica foi testada com 4 μL de uma solução padrão de Fe³⁺ 1.2 mmol L⁻¹ (Figura 1 -b).

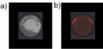


Figura 1. (a) Imagem do spot antes da reação contendo os cristais de NH_4SCN e a (b) após a reação com 4 uL de Fe (III) 1,2 mmolL⁻¹ Os spots contendo as soluções coloridas tiveram suas imagens adquiridas e digitalizadas por scanner (HP Scanjet 4050) e pela câmera de celular (Samsung J5). Para a obter e interpretar os sinais das imagens obtidas, foi utilizado o software ImageJ e desenvolvido uma rotina de análise simultânea e automatizada para aquisição do sinal R,G e B e Grayscale de 90 spots. Foram realizados cálculos distintos para a normalização dos sinais *Método 1*: os valores de intensidade R, G e B e grayscale foram convertidos para densidade ótica relativa (O.D.R.) em função da equação 1[5].

0. D. R. =
$$-\log \frac{A}{A_0}$$
 (A = R, G, B ou Grayscale) (Equação 1)

Os valores A corresponde ao valor do spot a ser medido e A_0 a intensidade do spot branco. No *Método 2:* A distância euclidiana (ED) entre os pontos também foi avaliada e comparada com o método de análise de intensidade empregado como representado pela equação 2. A distância euclidiana foi utilizada para verificar e comparar estes diferentes modos que interpretação do sinal utilizados em trabalhos que usam os sinais de imagens[6].

$$ED = \sqrt{(R - R_0)^2 + (G - G_0)^2 + (B - B_0)^2} (Equação 2)$$

Após a aquisição dos valores de intensidade, os valores foram transferidos para uma planilha eletrônica em Excel, pré-programada para interpretar os pontos de curva analítica e fornece os valores nominais de concentração de

cada spot analisado usando as equações 1 e 2. O cálculo de PRESS, MSEC RMSEP, e ER (erro relativo) foram calculados para validação do modelo de quantificação proposto por imagens.

Resultados e discussão: O microssistema foi adequado para a realização dessa reação. A impressão com o toner evitou a absorção ou difusão por capilaridade da solução, evitando a contaminação cruzada dos spots. A formação do complexo de cor vermelha apresentou estabilidade por até 50 min a 25°C. O método apresentou faixa linear de 0,12 a 1,30 mmol L⁻¹ usando celular e scanner, permitindo a determinação de Fe³⁺ conforme representado na Tabela 1.

Faixa de concentração Fe (III) mmolL ⁻¹			y = a [Fe (III) molL ⁻¹]		\mathbb{R}^2	F	SQReg	SQres	N	RSD
			a	erro(a)						
Celular	0.12 - 1.30	Gray	355	29	0.968	153	0.315	0.0103	21	0.040
		Red	96	7	0.971	168	0.023	0.0007	21	0.012
		Green	313	13	0.991	556	0.245	0.0022	21	0.021
		Blue	670	45	0.978	220	1.112	0.0253	21	0.071
Scanner	0.12 - 1.30	Gray	260	8.2	0.995	1001	0.168	0.0008	21	0.013
		Red	38	6.1	0.887	39	0.0036	0.0005	21	0.010
		Green	319	7.3	0.997	1899	0.254	0.0007	21	0.012
		Blue	492	8.1	0.999	3716	0.606	0.0008	21	0.013
			Parâ	metros para vali	dação do mode	lo				
			Scanner			Celular				
		G	В	Grayscale	D.E.	G	В	Grayscal	e	D.E.
Limite de detecção (3 x SD/a) Fe(III) mmolL ⁻¹		0.05	0.02	0.05	0.12*	0.06	0.10	0.10		0.12*
PRESS		7.3E-09	3.7E-09	1.4E-08	2.4E-08	4.0E-08	4.6E-08	6.2E-08		1.5E-08
RMSEP		2.2E-05	1.6E-05	3.1E-05	4.0E-05	6.7E-05	7.2E-05	8.3E-05	i	3.2E-05
MSEC		4.9E-10	2.5E-10	9.4E-10	1.6E-09	4.4E-09	5.1E-09	6.8E-09)	1.0E-09
Erro Puro (%)		7.4	4.9	10.0	14.5	12.0	9.5	10.8		8.5

Tabela 1. Figura de mérito para o método proposto utilizando scanner e celular.

A aquisição das imagens por celular apresentou uma maior sensibilidade quando comparada ao scanner. O método desenvolvido possibilitou acompanhar a variação de corrosão de uma placa metálica de áreas de 1,00 cm² em tempo de 0 a 21 horas exposto ao ambiente corrosivo utilizando volumes de 4µL por spot analisado.

O método desenvolvido foi utilizado para determinação a concentração de ferro de alíquotas extraídas contendo oxido de ferro de placas metálicas submetidas ao processo de corrosão. Conforme representado na Figura 6. Os teores de Fe³+ foram confrontados com o ensaio de perda de massa ASTM para o método utilizando o scanner. É possível observar que a variação da massa medido por gravimetria é similar com as massas de Fe³+ medidas pelo método proposto e apresentam concordância o método de referência ASTM(Figura 2).

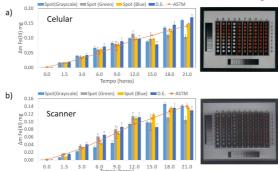


Figura 2 Comparação entre o método de análise de imagem de Fe^{3+} (a) celular. (b) utilizando o scanner e o método ASTM.

Conclusões: O método desenvolvido é de rápida execução quando comparado com os métodos convencionais da literatura, apresentando boa performance quando comparado com o método de referência ASTM. O uso reduzido de volume para realizar uma reação química apresenta uma grande vantagem por reduzir drasticamente a geração de resíduos após a análise.

Referências e agradecimentos:

Referências: [1]D. Zhang, Z. An, Q. Pan, L. Gao, G. Zhou, Appl. Surf. Sci. 253 (2006) 1343.

[2]C. Jeyaprabha, S. Sathiyanarayanan, G. Venkatachari, Appl. Surf. Sci. 246 (2005) 108.

[3]E.N. Codaro, R.Z. Nakazato, a. L. Horovistiz, L.M.F. Ribeiro, R.B. Ribeiro, L.R.O. Hein, Mater. Sci. Eng. A 334 (2002) 298.

[4]M. Kompany-Zareh, M. Mansourian, F. Ravaee, Anal. Chim. Acta 471 (2002) 97.

[5]J. Passaretti Filho, J.F. da Silveira Petrucci, A. Alves Cardoso, Talanta 140 (2015) 73.

[6]M. Abderrahim, S. M. Arribas, L. Condezo-Hoyos, Talanta 152 (2016) 82.

Os autores agradecem a CAPES (33004030072p8) e FAPESP (15/23265-5 e 16/03369-3) pelos recursos concedidos

Bioconversores de etanol em eletricidade: Arranjos de microfibras de carbono modificadas com enzimas e leveduras

Kamila Cássia Pagnoncelli, Frank Nelson Crespilho

kamilapagnoncelli@gmail.com; frankcrespilho@iqsc.usp.br

Resumo: Biocélulas a combustível podem ser definidas como dispositivos bioeletroquímicos que utilizam componentes biológicos, como enzimas ou microrganismos, para converter energia química em energia elétrica a partir de processos redox eletroquímicos. Neste estudo, reporta-se o desenvolvimento de fibras flexíveis de carbono (FFC) modificadas com a enzima álcool desidrogenase (ADH) e levedura Saccharomyces cerevisiae para aplicação como biocatalisadores cooperativos na oxidação indireta de glicose via rota etanólica. A glicose é oxidada pelas células de levedura sob condições anaeróbias, sendo o etanol formado na superfície do bioeletrodo FFC-ADH. Este eletrodo é capaz de oxidar etanol que resulta na oxidação da molécula de nicotinamida adenina dinucleotídeo, NADH a NAD⁺. Foi demonstrada uma excelente correlação linear entre a concentração de etanol e os valores de densidade de corrente obtidos, indicando, portanto que a resposta bioeletrocatalítica da ADH é diretamente proporcional à concentração de etanol produzida a partir da fermentação.

Palavras-chave: fibras flexíveis de carbono; álcool desidrogenase; Saccharomyces cerevisiae; biocatalisadores cooperativos.

Introdução: O desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos com biomoléculas tem sido extensivamente estudado como uma fonte de energia alternativa e mais ambientalmente favorável. Estes sistemas apresentam aplicação potencial em muitas áreas, tais como biosensores amperométricos, biodispositivos implantáveis para a geração de energia ou biocélulas a combustível [1-3]. A incorporação de enzimas sobre a superfície de eletrodos recentemente se tornou uma alternativa atraente na concepção de dispositivos de conversão de energia eficientes, contudo, apesar das propriedades promissoras que estes apresentam, ainda é preciso estabelecer sistemas que possam produzir e regenerar eletroquimicamente os compostos envolvidos a fim de alcançar um bioeletrodo eficiente. A vantagem de usar *Saccharomyces cerevisiae* como biocatalisador se deve ao fato desse microrganismo ter um metabolismo bem compreendido e apresentar condições biológicas ótimas à temperatura ambiente, além de sua capacidade de operar em ambientes aeróbios e anaeróbios. O presente estudo reporta o desenvolvimento de fibras flexíveis de carbono (FFC) na presença da enzima álcool desidrogenase (ADH) e levedura *Saccharomyces cerevisiae* para aplicação como biocatalisadores cooperativos na oxidação indireta de etanol. Glicose foi usada como substrato para os microrganismos com a cogeração de etanol, enquanto a enzima foi utilizada para catalisar a conversão de etanol a acetaldeído, reação esta que ocorre conjuntamente com a redução de NAD⁺ a NADH.

Procedimento experimental: Os bioeletrodos FFC-ADH foram preparados pela adsorção física da enzima. A área da fibra foi delimitada com o auxílio de resina epóxi. Após a secagem desta, as fibras foram colocadas em contato com a solução de ADH (8,0 mg mL⁻¹ em tampão fosfato de sódio pH 7,5) durante 24 horas, a 4 °C. Após a adsorção da enzima, adicionou-se 20 µL de Náfion™ 2,5% sobre as fibras contendo a ADH e em seguida as mesmas foram secas a vácuo durante 10 minutos. Nos experimentos eletroquímicos utilizou-se uma cela eletroquímica convencional em um sistema de três eletrodos acoplada a um Potenciostato/Galvanostato μAutolab III. Utilizou-se fibras flexíveis de carbono como eletrodo de trabalho, platina como contra eletrodo e prata/cloreto de prata saturado (Ag/AgCl_{sat}) como eletrodo de referência. Todas as soluções utilizadas foram preparadas em tampão fosfato de sódio (0,1 mol L⁻¹). Antes de realizar os experimentos, o oxigênio contido no interior da cela foi removido pelo fluxo de gás nitrogênio ($N_2 \ge 99,0\%$) após o borbulhamento desse gás durante 10 minutos na solução. A determinação e quantificação de etanol foram realizadas por cromatografia gasosa (CG), utilizando-se um cromatógrafo gasoso GC-2010 Plus modelo Shimadzu, associado a um detector de ionização de chama (FID) e equipado com uma coluna Agilent®-Innovax (polietilenoglicol), 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno (ID) e 0,25 µm de espessura de fase estacionária. Na eletropolimerização dos eletrodos com neutral red (NR), utilizou-se voltametria cíclica com potencial aplicado de -1,0 a 1,0 V em uma solução contendo o monômero de NR (1 mmol L⁻¹) e KNO₃ (0,1 mol L⁻¹) preparada em tampão fosfato de potássio (25 mmol L⁻¹; pH 6,0).

Resultados e discussão: O desempenho bioeletrocatalítico foi avaliado por voltametria cíclica durante 24 horas de fermentação em condições anaeróbias (Figuras 1a e 1b), e o etanol produzido durante este tempo foi quantificado por cromatografia gasosa. Foram coletadas alíquotas da amostra contendo glicose, NAD⁺ e *Saccharomyces cerevisiae* em suspensão no período de 24 horas de fermentação, as quais foram posteriormente submetidas à análise cromatográfica a fim de determinar o etanol produzido. Relacionando-se a razão entre as áreas obtidas nos cromatogramas, foi possível obter a concentração de etanol nas amostras com o auxílio de uma curva de calibração. As figuras 1c e 1d mostram os valores de densidade de corrente obtidos em potencial 0,6 V (vs. Ag/AgCl) e concentração de etanol com o tempo de fermentação da levedura em condições anaeróbias.

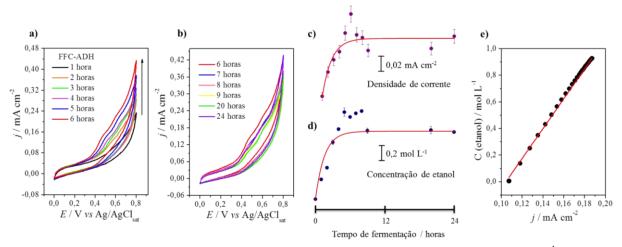


Figura 1. (a) Voltamogramas cíclicos do bioeletrodo FFC-ADH em solução de glicose $(1,0 \text{ mol } L^{-1})$ contendo NAD⁺ $(0,6 \text{ mmol } L^{-1})$ e levedura durante 6 horas e (b) 24 horas de fermentação em atmosfera inerte (N_2) . v=5 mV s⁻¹. Temperatura: 40 °C. Concentração de levedura: 0,05 g mL⁻¹. Soluções de glicose e NAD⁺ em tampão fosfato de sódio $(0,1 \text{ mol } L^{-1}; \text{ pH } 8,5);$ (c) Dependência da densidade de corrente de oxidação de etanol pela ADH no potencial de 0,6 V (vs. Ag/AgCl saturado) com o tempo de fermentação pela S. cerevisiae em condições anaeróbias; (d) Dependência da concentração de etanol produzida com o tempo de fermentação pela S. cerevisiae em condições anaeróbias; (e) Correlação linear entre corrente bioeletrocatalítica e concentração de etanol.

É possível observar um perfil similar entre os valores de corrente e concentração de etanol obtidos no mesmo intervalo de tempo. Os resultados demonstraram ainda uma excelente correlação linear entre os valores encontrados a partir das curvas exponenciais (linha vermelha), como mostrado na figura 1e. Isso indica que a resposta bioeletrocatalítica da ADH é diretamente proporcional à concentração de etanol gerada pela fermentação alcoólica. Posteriormente, com o intuito de atingir valores de potencial menos positivos para o bioeletrodo FFC-ADH, foi avaliada a influência do neutral red na bioeletrocatálise. Observou-se a atividade biocatalítica da enzima com *onset* em -0,075 V (vs. Ag/AgCl) e que, portanto, o bioeletrodo na presença de neutral red eletropolimerizado apresenta características favoráveis para diversas aplicações como bioânodo em microdispositivos.

Conclusões: Os estudos eletroquímicos demonstraram que o bioeletrodo contendo enzima e levedura opera como biocatalisador cooperativo durante a oxidação indireta de glicose, sendo o etanol produzido a partir da fermentação alcoólica pela glicólise anaeróbia e, posteriormente oxidado pela enzima na superfície do eletrodo. O conceito de que enzimas e microrganismos podem trabalhar em conjunto de forma cooperativa foi demonstrado neste trabalho e, portanto o grande potencial desses eletrodos visando a obtenção de bioeletrodos cooperativos para aplicação em biocélulas a combustível e microdispositivos na busca por uma conversão de alta eficiência e elevada densidade de potência.

Referências e agradecimentos:

- [1] R.M. Iost, F.N. Crespilho, Biosensors & Bioelectronics 31, 1 (2012).
- [2] G.M. Olyveira, R.M. Iost, R.A.S. Luz, F.N. Crespilho, Nanoenergy 101 (2013).
- [3] R.A.S. Luz, A.R. Pereira, J.C.P. de Souza, F.C.P.F. Sales, F.N. Crespilho, ChemElectroChem 1, 1751 (2014).

FAPESP (Projects: 2015/16672-3, 2013/14262-7), CNPq (Project: 478525/2013-3), INEO, IQSC-USP.

Estudo de adulteração de uísques por monitoramento de espécies aniônicas via microssistemas eletroforéticos

Kariolanda C. A. Rezende, Roger Cardoso Moreira, Márcio Talhavinni, Lucio P. L. Logrado, Wendell K. T. Coltro

kariolandacristina@hotmail.com, moreirarc2@gmail.com, marcio.mt@dpf.gov.br, lucio.lpll@dpf.gov.br, wendell@ufg.br

Resumo: Uísques são bebidas usualmente adulteradas no Brasil, necessitando de metodologias que comprovem a autenticidades destas bebidas. Deste modo, o trabalho propôs o uso de um microdispositivo de vidro para análises eletroforéticas com detecção condutométrica sem contato. As melhores condições para separação das espécies aniônicas em estudo (Cl⁻ e F⁻) foram em solução tampão Histidina/Ácido láctico 15 e 10 mM, respectivamente, resultando em análises com boa resolução e tempo de análise inferior a 70 s. A diferença na concentração de Cl⁻, F⁻, SO₄²⁻ e NO₂⁻ nas amostras autênticas e adulteradas provaram ser uma ferramenta de monitoramento para controle de autenticidade em três distintas marcas de uísque.

Palavras-Chaves: autenticidade, detecção eletroquímica, microdispositivos, uísque.

Introdução: Uísques são bebidas alcoólicas feitas a partir da fermentação de grãos maltados e envelhecidas em barris de carvalho.¹ Por serem bebidas de grande apreciação no comércio e terem custo elevado, frequentemente são encontrados exemplares com algum tipo de adulteração. Dentre as metodologias mais comuns de falsificação de uísque, tem-se a diluição com água da torneira e a adição de álcool e caramelo, para correção do teor alcoólico e a da cor, respectivamente.²-³ Devido essa realidade, estudos vem sido feitos para desenvolver metodologias para controle de qualidade dessas bebidas. Dentre as metodologias já em estudo tem-se cromatografia⁴, análises de espectroscopia de massa⁵ e eletroforese capilar⁶. Muitas das técnicas necessitam instrumentação de alto custo, longo tempo de análise e volumes elevados de reagentes. Desde como, o trabalho propôs uso de microssistemas eletroforéticos acoplados a uma detecção condutométrica sem contato (ME-C⁴D) para estudo de autenticidade de uísques.

Procedimento experimental: Fez-se experimentos para otimização das condições experimentais como os potenciais aplicados e a proporção do tampão. E posteriormente foram analisados 18 uísques, de três marcas distintas. As 15 amostras adulteradas foram apreendidas e doadas pelo Instituto Federal de Criminalística (Brasília, DF). As amostras passaram por diluição 80% (v/v) e analisadas sem a adição de inversor de fluxo, apenas com uso de potencial negativo.

Resultados e discussão: Os eletroferogramas para triagem dos uísques foram realizados com ME-C⁴D fazendo uso de uma solução tampão composta de histidina e ácido láctico (15:10 mM) com injeção da amostra feita no modo gated. Os dados obtidos evidenciam a diferença na concentração de Cl^- , F^- , SO_4^{2-} e NO_2^- nas amostras autênticas e adulteradas das três marcas em estudo.

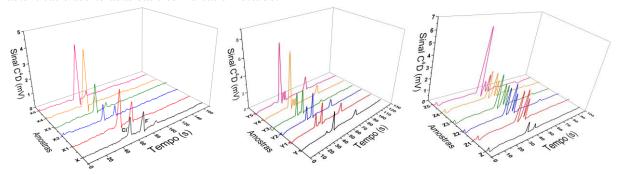


Figura1: Eletroferogramas mostrando a comparação de concentração das espécies aniônicas presentes em amostras adulteradas e autênticas (X, Y e Z) das três marcas de uísques. Solução tampão histidina/ácido láctico 15:10 mM. Injeção gated: 1s. Potenciais aplicados: -1,0 kV e -1,2 kV. Condições de detecção: 1100 kHz e 60 Vpp.

Conclusões: O estudo de adulteração dos uísques se mostrou possível via triagem de espécies aniônicas fazendo uso de ME-C⁴D, abrindo nossas perspectivas para investigações forenses como uso de instrumentação mais simples e barata que as metodologias encontradas na literatura.

Referências e agradecimentos:

Os autores gostariam de agradecer ao Instituto Nacional de Criminalística pelas amostras doadas. Agradecimentos também à CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro fornecido.

Referências: [1] P.Wisniewska, T. Dymerski, W. Wardencki, J. Namiesnik, J. Sci. Food Agric. 95, 2159 (2015).

- [2] R.I. Aylott, A.H. Clyne, A.P. Fox, D.A. Walker, Analyst, 119, 1741 (1994).
- [3] R.I. Aylott, W.M. MacKenzie, J. Inst. Brew., 116, 215 (2010).
- [4] S.A Savchuk, V.N. Vlasov, S.A. Appolonova, V.N. Arbuzov, A.N. Vedenin, A.B. Mezinov, B.R. Grigor'yan, J. Anal. Chem., **56**, 214 (2001).
- [5] J.S. Garcia, B.G. Vaz, Y.E. Corilo, C.F. Ramires, S.A. Saraiva, G.B. Sanvido, E.M. Schmidt, D.R. Maia, R.G. Cosso, J.J. Zacca, Food Res. Int., **51**, 98 (2013).
- [6] M. Heller, L. Vitali, M.A.L. Oliveira, A.C.O. Costa, G.A. Micke, J. Agric. Food Chem., 59, 6882 (2011).

Dispositivos microfluídicos autorregeneráveis e híbridos irreversíveis/reversíveis

<u>Letícia S. Shiroma</u>, Maria H. O. Piazzetta, Gerson F. Duarte-Junior, Wendell K. T. Coltro, Emanuel Carrilho, Angelo L. Gobbi & Renato S. Lima

lsshiroma@gmail.com

Resumo: Este trabalho descreve um novo método para a selagem de dispositivos microfluídicos de PDMS. Designado como selagem sanduíche (sandwich bonding, SWB), esse método possui vantagens importantes como: simplicidade, rapidez (~1 h), custo baixo (requer apenas estufa), força de adesão elevada, longo tempo para alinhamento, fabricação de chips de PDMS híbridos e a possibilidade de realizar etapas de funcionalização anteriormente à selagem. Os dispositivos SWB de PDMS/vidro/PDMS suportaram pressões hidrodinâmicas de até 1,0 MPa; os chips de PDMS/vidro obtidos através da selagem convencional de oxidação em plasma suportam apenas 0,5 MPa. Adicionalmente, os dispositivos SWB híbridos de PDMS/metal exibiram as maiores forças de adesão já reportadas na literatura, com valores de pressão de ruptura da ordem de 0,5 MPa. Por fim, o SWB produziu microchips com propriedades pioneiras em microfluídica de autorregeneração (após ruptura do microcanal provocada por vazões excessivas) e comportamento híbrido irreversível/reversível. O caráter reversível foi conseguido após imersão dos dispositivos em acetona por 20 min. Com isso, as peças do substrato e da tampa puderam ser removidas e, posteriormente, seladas novamente sem afetar drasticamente as forças de adesão originais. Tais características de autorregeneração e reversibilidade são cruciais em estágios de pesquisa e desenvolvimento, quando erros e testes de novas configurações são comuns.

Palavras-chave: microfabricação, selagem, PDMS.

Introdução: O polidimetilsiloxano (PDMS) é um elastômero que possui vantagens como: facilidade de microfabricação (permite um processo simples e rápido), transparência óptica, absorção de água baixa, tempo de vida prolongado, fácil integração de componentes funcionais para construção de sistemas integrados lab-on-a-chip, flexibilidade (ideal para a fabricação de chips analíticos flexíveis) e permeabilidade aos gases O2 e CO2 excelente. Essa última característica é muito importante na análise de organismos vivos e células [1]. Vários métodos já foram propostos para a selagem de dispositivos de PDMS, como as selagens em plasma de oxigênio, adesiva e por modificação química. Porém, tais métodos têm algumas desvantagens. Em linhas gerais, podemos citar: aplicação restrita a substratos à base de silício, tempo reduzido para etapas de alinhamento previamente à selagem, processo lento e laborioso, força de adesão pobre e possibilidade de entupimento do canal [2]. Considerando-se a importância do PDMS como substrato no campo da microfluídica e limitações inerentes à sua fabricação, desenvolvemos recentemente um novo método para a selagem desses dispositivos microfluídicos [2]. Abreviado de SWB (sandwich bonding), esse método baseia-se, inicialmente, na selagem reversível entre o substrato de PDMS contendo o canal e uma tampa que pode ser de PDMS, vidro ou qualquer outro material. Posteriormente, monômeros de PDMS são despejados gerando uma estrutura sanduíche PDMS/tampa/PDMS após a cura dessa cobertura. As etapas de fabricação são mostradas na Figura 1 (a). O SWB é simples, rápido (~1 h) e barato (requer apenas estufa). Ademais, uma vez que ele elimina o uso de adesivo e as etapas de oxidação e modificação química de superfície (usadas em técnicas convencionais), esse novo método permite funcionalizações anteriormente à selagem, longo tempo para alinhamento, vedação de canais de dimensões abaixo de dezenas de micrometros e fabricação de dispositivos de PDMS híbridos (com substratos diversos). Por fim, o SWB gerou chips com forca de adesão elevada e propriedades inéditas em microfluídica, quais sejam: capacidade de autorregeneração e comportamento híbrido irreversível/reversível, vantagens cruciais em estágios de pesquisa e desenvolvimento.

Procedimento experimental: Os microcanais foram confeccionados em PDMS utilizando-se moldagem de réplica. O molde foi obtido por fotolitografia e consistiu em estruturas em alto relevo do fotorresiste positivo AZ® 50XT, depositado sobre vidro por spinning (2.900 rpm por 15 s). A cura do AZ® 50XT foi feita a 112 °C por 5 min, seguida pela exposição à radiação UV por 120 s numa fotoalinhadora e pela revelação com o revelador AZ® 400K durante 4 minutos sob agitação. Por fim, foi feito o *hardbake* a 140 °C por 10 min. Para a etapa de replicação e gravação dos canais dos dispositivos, monômeros de PDMS com o agente de cura (10:1 m/m) foram despejados sobre o molde de AZ® 50XT. Mangueiras de silicone permitiram o acesso aos reservatórios. A polimerização do PDMS foi realizada em estufa a uma temperatura de 95 °C por 40 min. Após a desmoldagem, realizou-se a selagem sanduíche, que consistiu, a princípio, na selagem reversível entre o substrato de PDMS contendo os canais e uma tampa de vidro. A tampa é menor em relação ao substrato, remanescendo, assim, áreas expostas desse elastômero. Continuando, monômeros de PDMS e seu agente de cura são despejados gerando uma estrutura sanduíche PDMS/Vidro/PDMS após a cura dessa cobertura

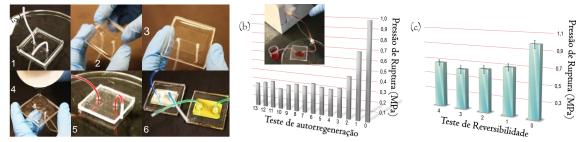


Figura 1. Etapas de desenvolvimento da plataforma microfluídica (a), gráfico de regeneração do microchip após etapas sucessivas de ruptura e aquecimento em estufa (b) e gráfico de reversibilidade do microchip após remoções da cobertura sucessivas e selagem de novos dispositivos utilizando-se as mesmas peças de substrato e tampa (c). Em (a), temos: substrato de PDMS com canal obtido por moldagem e mangueiras de silicone para bombeamento dos microfluidos (1); selagem reversível entre o substrato de PDMS e uma tampa de vidro (2,3); despejamento de monômeros de PDMS e agente de cura (4) e microdispositivo final PDMS/vidro/PDMS (5). O método foi aplicado também na fabricação de *microchips* híbridos de PDMS/Al e PDMS/Au (6). Inserção em (b): foto de um *chip* com vazamento de fluido.

(**Figura 1 (a**)). Canais de PDMS/Au e PDMS/Al foram também fabricados. Para isso, as tampas de vidro foram recobertas por esses metais utilizando-se a técnica de *sputtering*.

Resultados e discussão: Durante o desenvolvimento do dispositivo foram realizados alguns testes como o de força de adesão, repetibilidade, regeneração e reversibilidade. Microscopias eletrônicas de varredura mostraram que não houve deformação ou entupimento do microcanal após a selagem SWB. As dimensões do canal foram aproximadamente 500 µm de largura e 30 µm de altura. Testes de força de adesão foram realizados para verificar a pressão de ruptura dos dispositivos (pressões mínimas que geram rompimento do canal e, assim, vazamento dos fluidos). Os dispositivos de PDMS/vidro/PDMS suportaram pressões hidrodinâmicas (medidas por uma bomba de HPLC aumentando-se a vazão) de até 1,0 MPa; os chips de PDMS/vidro obtidos através da oxidação em plasma suportam apenas 0,5 MPa. Adicionalmente, os dispositivos SWB de PDMS/metal possuíram as maiores forças de adesão já reportadas na literatura, com valores de pressão de ruptura da ordem de 0,5 MPa. Os microchips SWB possuíram capacidade de autorregeneração e comportamento híbrido irreversível/reversível. Após a ruptura do microcanal provocada por vazões excessivas dos fluidos, esses foram removidos e etanol foi bombeado nos canais durante 2 min. Posteriormente, procedeu-se com a secagem dos dispositivos a 120 °C por 20 min. Com isso, os canais se autorregeneraram e voltaram a suportar vazões elevadas. Após o terceiro processo sucessivo de vazamento do canal, remoção do fluido, lavagem com etanol e secagem, os dispositivos regenerados passaram a suportar pressões da ordem de 0,3 MPa de acordo com novos testes de força de adesão, ilustrados na Figura 1 (b). Quanto ao caráter reversível, esse foi conseguido após imersão dos dispositivos em acetona por 20 min com o auxílio de ultrassom. Com isso, a cobertura de PDMS pôde ser removida facilmente o que nos permitiu acesso às lâminas do substrato e da tampa, intactas. Essas lâminas puderam ser seladas novamente com uma força de adesão média de 0,7 MPa após cinco processos de remoção da cobertura e subsequente selagem com substrato e tampa originais. Esses dados se encontram na Figura 1 (c). As selagens reversíveis descritas na literatura podem ser classificadas em três categorias: por aspiração, por campo magnético e por empilhamento (estruturas sanduíche). Todas elas possuem forças de adesão pobres, da ordem de até 0,3 MPa [2]. Por conseguinte, os dispositivos SWB híbridos irreversíveis/reversíveis são uma alternativa potencial a considerar sua adesão elevada e vantagens operacionais como simplicidade, rapidez e custo reduzido.

Conclusões: Um método potencial para a selagem de *chips* microfluídicos de PDMS foi desenvolvido. Além de vantagens como simplicidade operacional, rapidez, custo reduzido, força de adesão alta, longo tempo para alinhamento, fabricação de microdispositivos de PDMS híbridos e a possibilidade de realizar etapas de funcionalização anteriormente à selagem, o SWB produziu *chips* microfluídicos com propriedades pioneiras de autorregeneração e comportamento híbrido irreversível/reversível. Tais aspectos são cruciais em estágios de pesquisa e desenvolvimento, quando erros e testes de novas configurações são comuns. Esses aspectos se tornam ainda mais relevantes quando o *chip* integra componentes funcionais de custo elevado (como filmes finos, semicondutores ou metálicos) e/ou espécies ancoradas nos seus microcanais. Outros exemplos críticos envolvem situações nas quais novas modificações de superfície ou etapas vigorosas de limpeza precisam ser realizadas.

Referências e agradecimentos:

[1] R. S. Lima, *et al.* Sacrificial adhesive bonding: a powerful method for fabrication of glass microchips, **5**, doi:10.1038/srep13276 (2015).

[2] L. S. Shiroma, *et al.* Self-regenerating and hybrid irreversible/reversible PDMS microfluidic devices. Scientific Reports, **6**, doi:10.1038/srep26032 (2016).

Nossos agradecimentos à FAPESP (1014/24126-6 e 2015/12623-8) pelo apoio financeiro.

GERAÇÃO DE GOTÍCULAS EM SISTEMA BIFÁSICO UTILIZANDO DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS FABRICADOS POR IMPRESSÃO 3D

<u>Lucas C. Duarte*</u> (PG), Cyro L. S. Chagas (PG) e Wendell K. T. Coltro (PQ) Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil, 74690-900.

*e-mail: <u>lucascd@outlook.com</u>

Resumo: Este estudo descreve o uso de uma impressora 3D RepRap (self-replicating rapid prototyper) com tecnologia de modelagem por fusão e deposição (fused deposition modeling, FDM) para fabricar dispositivos microfluídicos para geração de gotículas de água/óleo com detecção integrada. O dispositivo foi construído com canais na configuração junção em T contendo eletrodos integrados disposição antiparalela com baixo custo e tempo de impressão (R\$ 3,20 em 30 min). As gotículas foram geradas variando a vazão de fase contínua formadas por óleo+Span80/ água+Triton de 10 a 60 μL/min. Por meio dos eletrodos impressos foi possível empregar a detecção C4D para detecção das gotas geradas com resposta satisfatória. A intensidade e largura dos picos obtidos diminuem exponencialmente a medida em que se aumenta a vazão da fase contínua.

Palavras-Chaves: droplets; impressão 3D; C⁴D

Introdução:

O uso de microdispositivos analíticos para formação de gotículas tem ganhado grande importância e interesse nos últimos anos, devido sua alta potencialidade de ser empregada em análises químicas e bioquímicas. Para isso, ter o controle de tamanho e frequência de produção das gotas são fundamentais. Estes fatores podem ser controlados otimizando parâmetros como a geometria do dispositivo, pressão, taxa de fluxo, bem como a viscosidade e tensão superficial do fluido. Como o tamanho da gota depende da geometria do canal, para se ter gotas menores é necessário a fabricação de canais com dimensões cada vez mais reduzidas. No entanto, técnicas convencionais de fabricação tradicionalmente requer instrumentação de alto custo e mão de obra qualificada ^{1,2}. A tecnologia de impressão 3D tem surgido como uma técnica alternativa e adequada para fabricação de microestruturas³. Neste sentido, este trabalho descreve a fabricação de um microdispositivo com eletrodos integrados totalmente construídos por meio de uma impressora 3D de baixo custo para formação e detecção de gotículas de óleo e água.

Procedimento experimental:

Através de um software gráfico contendo o sistema CAD (*Computer Aided Design*) é feita a modelagem do desenho tridimensional para construção do dispositivo. O arquivo é exportado em formato STL (Stereolithography) para um software de fatiamento, onde é definido o posicionamento do objeto, bem como a quantidade e orientação das camadas a serem impressas. O dispositivo foi impresso pelo método de Modelagem por Fusão e Deposição (*Fused Deposition Modelling*, FDM)³. Este método consiste na deposição de filamentos termoplásticos aquecidos em um cabeçote de extrusão sobre uma plataforma de impressão (Figura 1A). A plataforma de impressão é mantida a uma temperatura menor que a do bico de extrusão de forma que a primeira camada depositada endureça e seja possível a deposição da camada seguinte.

O dispositivo foi construído combinando dois tipos de filamentos termoplásticos diferentes o copolímero acrinolitrila butadieno estireno (ABS) e ácido polilático (PLA) dopado com nanotubo de carbono. Os canais foram fabricados na configuração junção em T com 50,0 mm \times 0,75 mm \times 0,7 mm contendo eletrodos integrados com 1,5mm \times 2,0 mm e espaçamento de 0,5 mm na disposição antiparalela. As gotículas foram geradas variando a vazão de fase contínua formadas por óleo+Span80 (para gotículas de água) e água+Triton (para gotículas de óleo) de 10 a 60 μ L/min. Por meio dos eletrodos impressos foi possível empregar a detecção condutométrica sem contato (C^4D) para detecção das gotas geradas.

Resultados e discussão:

O microchip com eletrodo detecção integrado foi impresso combinando dois tipos de filamentos termoplásticos diferentes. O copolímero ABS foi utilizado para fabricação do microchip da região que contém o canal. Os eletrodos que compõem a cela de detecção foram fabricados utilizando o termoplástico PLA dopado com nano tubos de carbono. Obviamente, apenas o polímero PLA não possui propriedades condutoras. No entanto, os nanotubos de carbono atribuem a capacidade condutora ao polímero, permitindo o uso desse material como eletrodo para detecção condutométrica. O uso da impressora 3D permite a fabricação rápida e de baixo custo, o dispositivo é construído em cerca de 30 min com um custo estimado em R\$ 3,20. Além disso, a impressão 3D permite que os eletrodos sejam construídos em diferentes dispositivos obedecendo a mesma orientação e posicionamento, de uma forma mais simples e mais precisa do que utilizando, fitas adesivas de cobre manualmente, por exemplo.

A formação de gotículas de óleo em água no microdispositivo impresso foi realizada utilizando a mistura de água e 1% de Triton como fase contínua através de metodologia semelhante a utilizada por Piccin e colaboradores⁴. As gotículas de água foram geradas e detectadas de forma semelhante , porém foi adicionado a Span 80 ao óleo que constitui a fase contínua. A adição do surfactante na fase contínua é importante pois sem ele as gotículas não são geradas, como os líquidos são imiscíveis é formado apenas duas fases continuas no microcanal (PICCIN et al., 2014)⁴.

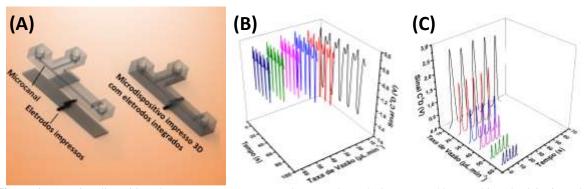


Figura 1. (A) microdispositivos impressos para geração e detecção de gotículas, construídos combinando dois tipos de materiais ABS e PLA. (B) e (C) apresentam as respostas adquiridas para detecção de gotículas de óleo geradas em faze aquosa contendo Triton 1% e gotículas de água em fase oleosa contendo Span 1%.

A Figura 1B e 1C apresenta os sinais obtidos das gotículas de óleo/água geradas. A resposta C⁴D é dada através da diferença de condutividade entre as fases contínua e dispersa. Ambas as fases dispersas, óleo e água, apresentaram perfis semelhantes. A intensidade, bem como a largura dos picos obtidos diminuem exponencialmente a medida em que se aumenta a vazão da fase contínua. Provavelmente, isso ocorre devido a velocidade da gota aumentar juntamente com o aumento da vazão, fazendo com que a gota passe pela cela de detecção com um menor intervalo de tempo.

Conclusões: A construção a fabricação de um microdispositivo com eletrodos integrados impresso por meio de uma impressora 3D para a formação e detecção de gotículas de óleo e água foi realizada com sucesso. O processo se demonstrou simples, rápido e barato, uma vez que o dispositivo final integrado aos eletrodos para detecção foi construído em 30 min com custo de R\$ 3,20. Os eletrodos impressos com o termoplástico PLA dopado com nanotubo de carbono apresentaram uma resposta adequada para o sistema C⁴D permitindo a detecção das gotículas geradas ao longo do tempo. Além disso, a partir da resposta gerada no sistema C⁴D foi possível encontrar uma correlação com o comprimento da gota gerada, demonstrando a elevada potencialidade da técnica para medidas de gotículas formadas em canais microfluídicos.

Referências e agradecimentos:

- [1] Shembekar, N., Chaipan, C., Utharala, R., e Merten, C. A. Lab on a Chip 16.8 (2016): 1314-1331.
- [2] Zhu, P., Xin T., e Liqiu W. Microfluidics and Nanofluidics 20.3 (2016): 1-10.
- [3] Waheed, Sidra, et al. Lab on a Chip 16.11 (2016): 1993-2013.
- [4] Piccin, E. et al. Sensors and Actuators B: Chemical, 196, (2014), 525-531.

[CAPES, CNPq, FAPEG, INCTBio]

Determinação eletroanalítica de monoetilenoglicol em amostras orgânicas de processamento de gás natural liquefeito

Maisa Bontorin Beltrame, Gabriela F. Giordano, Luis Carlos S. Vieira, Rogério M. Carvalho, Bruno C. Couto, Angelo L. Gobbi e Renato S. Lima

maisa.beltrame@lnnano.cnpem.br

Resumo: O monoetilenoglicol (MEG) é utilizado em linhas de produção de gás natural para evitar a formação de hidratos, os quais provocam entupimento das tubulações. No entanto, esse composto é um contaminante indesejado e deve ser removido do produto final. Assim, seu monitoramento se faz necessário. Nesse contexto, este trabalho visa a desenvolver um método eletroanalítico simples e rápido para a determinação de MEG em amostras orgânicas de processamento de gás natural liquefeito. Para isso, um fio de Ni modificado com Ni(OH)₂ foi utilizado como eletrodo de trabalho em voltametria cíclica. As amostras foram submetidas a uma etapa de extração líquido-líquido de modo a extrair o MEG do meio orgânico para a fase aquosa. As concentrações obtidas pela nossa plataforma foram concordantes com aqueles determinados por técnicas oficias. O método desenvolvido encontra um forte apelo no que concerne ao controle de qualidade pelas indústrias petroquímicas.

Palavras-chave: energia; eletrodo de Ni(OH)₂; extração líquido-líquido; voltametria.

Introdução:

O monoetilenoglicol (MEG) é comumente aplicado nas linhas de produção de gás natural liquefeito (GNL) para inibir a formação de hidratos, os quais provocam o entupimento das tubulações. Entretanto, o MEG é um contaminante do produto final, devendo ser removido do sistema e regenerado. Com isso, o monitoramento da concentração de MEG é necessário.

O método oficial usado na determinação de MEG em amostras de processamento de GNL consiste em uma titulação iodométrica clássica, que requer uma rotina lenta e laboriosa. Assim, o desenvolvimento de uma alternativa simples e rápida para a determinação desse composto é algo altamente desejável para a indústria petroquímica.

Neste contexto, desenvolvemos uma plataforma eletroquímica para quantificação de MEG em amostras de processamento de GNL. Além de vantagens como simplicidade operacional, portabilidade e custo reduzido, nosso método apresentou uma sensibilidade elevada mediante a modificação de eletrodo de Ni com Ni(OH)₂/NiOOH. Essas espécies exercem uma atividade catalítica pronunciada na oxidação de álcoois como o MEG [1]. Em função da sua sensibilidade alta, o método desenvolvido foi capaz de quantificar traços de MEG presentes em amostras orgânicas de processamento de GNL da Petrobras. Essas amostras, as quais estão associadas a um ponto específico na linha de produção de gás, possuem natureza apolar e suas concentrações de MEG (até 40 mg L⁻¹) estão abaixo do limite de detecção da titulação iodométrica. Esse fato impossibilita o monitoramento de MEG pela Petrobras utilizando-se o seu método oficial.

Procedimento Experimental:

Utilizamos uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos, quais sejam: níquel, platina e Ag/AgCl como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente. A princípio, o eletrodo de trabalho foi construído perfurando-se um tubo de teflon com 6,1 mm de diâmetro e 42,7 mm de comprimento com o auxílio de uma broca de 0,8 mm. Logo após, inseriu-se um fio de níquel (1,0 mm de diâmetro e 99,99% de pureza) sob pressão obtendo-se um eletrodo com área geométrica de 0,78 mm². Etapas prévias de limpeza da seção transversal exposta do Ni foram necessárias para tornar a sua superfície o mais reprodutível possível. Para tal, os eletrodos foram lixados com lixa d'água padrão (600 e 1200) e polidos em pasta de diamante com granulometria de 1,0 µm (Struers) até obter-se superfícies espelhadas. A limpeza foi finalizada após lavagem sequencial em banhos de ultrassom usando etanol anidro e água deionizada; ambas as etapas duraram dez minutos.

Mediante um processo simples e rápido, a superfície do eletrodo de trabalho foi modificada a partir da eletrodeposição dos hidróxidos: Ni(OH)₂, Co(OH)₂ e Cd(OH)₂. Para tal, soluções aquosas dos sais desses metais foram preparadas na concentração de 10,0 mmol L⁻¹ cada. Essas soluções foram adicionadas nas proporções molares de 77, 20 e 3%, respectivamente, em uma solução aquosa de NaNO₃ 20,0 mmol L⁻¹. O pH foi ajustado a 6,0 a partir do uso de NaOH e HNO₃, ambos na concentração de 100,0 mmol L⁻¹ em água. Em seguida, procedemos com a etapa de eletrodeposição tomando-se 10,0 mL dessa solução e aplicando-se uma densidade de corrente de

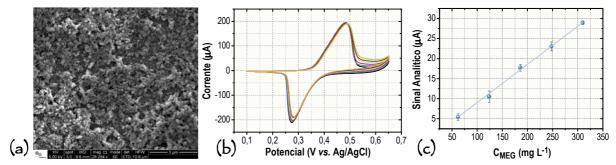


Figura 1. Imagem de microscopia eletrônica do eletrodo de níquel modificado (a); voltamogramas cíclicos obtidos em soluções de MEG (b) e curvas analíticas (n = 3) obtidas a partir das correntes medidas em 0,600 V (c).

-1,27 mA cm⁻² durante 60 s. Em seguida, acrescentou-se uma etapa com -2,54 mA cm⁻² por 20 s. Após a deposição, o eletrodo foi imerso em solução de NaOH 100,0 mmol L⁻¹. Decorridos 15 minutos, realizamos 30 ciclos de voltametria cíclica. Suas condições foram: 0,100 a 0,650 V vs. Ag/AgCl e velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Imagens foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura para um eletrodo de níquel antes e após a modificação, a qual segue apresentada na **Figura 1** (a). No tocante às estruturas obtidas após a modificação do Ni, o procedimento realizado gerou nanopartículas de Ni(OH)₂ dispersas por toda a superfície. Essas nanopartículas exibiram diâmetros da ordem de 150 nm.

Como o condensado de gás natural liquefeito (amostra analisada) é uma amostra orgânica, foi necessário extrair o MEG para um meio aquoso antes de realizar as análises eletroanalíticas em função das condições de operação do eletrodo de Ni modificado. Uma LLE convencional (rotina adotada pela Petrobras) foi realizada tomando-se 30 mL da fase doadora apolar (amostra de condensado) em funil de separação. Após essa etapa, um total de 4,5 mL de solução aquosa de sulfato de sódio 100,0 mmol L^{-1} (fase receptora polar) foi adicionado em quatro partições. O pH necessário para as análises eletroquímicas dos extratos foi ajustado a partir da adição de 0,5 mL de NaOH 1,0 mol L^{-1} . Para remover qualquer resíduo orgânico, filtrou-se o extrato com membrana de PTFE microporosa e hidrofóbica (0,22 μ m). Após essa etapa, os extratos foram analisados pelo método eletroanalítico desenvolvido pelo método da curva analítica.

Resultados e Discussão:

O eletrodo obtido a partir das condições descritas acima foi aplicado na construção de curva analítica a padrões de MEG considerando o intervalo de concentração de 62 a 310 mg L⁻¹. Os dados obtidos são mostrados na **Figura 1** (**b,c**). Para construção da curva analítica, as correntes anódicas medidas no potencial de 0,600 V vs. Ag/AgCl (referente à oxidação de o MEG) foram subtraídas da corrente obtida para o eletrólito e da corrente capacitiva. O limite de detecção foi calculado como 13,41 mg L⁻¹.

Por fim, as concentrações de MEG foram determinadas em quatro amostras de condensado de processamento de GNL. Essas amostras foram fornecidas e caracterizadas pela Petrobras quanto à concentração de MEG, que variou entre 40 e 82 mg L⁻¹. Em todos os casos, os dados obtidos pela nossa plataforma eletroquímica foram concordantes com aqueles determinados por iodometria e cromatografia a um nível de confiança de 95%.

Conclusões:

Um método eletroanalítico foi desenvolvido para a determinação de traços de MEG em amostras orgânicas de processamento de GNL. O método permitiu determinações exatas por meio de etapas de preparo de amostra (LLE) e voltametria cíclica usando um eletrodo de Ni modificado com Ni(OH)₂. Essa modificação mostrou-se rápida, simples e reprodutível. Por conseguinte, podemos concluir que a nossa plataforma encontra um forte apelo no que concerne ao controle de qualidade pelas indústrias petroquímicas.

Referências:

[1] G. F. Giordano, L. C. S. Vieira, A. L. Gobbi, R. S. Lima, L. T. Kubota, Anal. Chim. Acta, 875, 33 (2015).

Agradecimentos:

Nossos agradecimentos à Petrobras pelo auxílio financeiro e fornecimento e caracterização das amostras.

Plataforma eletroanalítica *point-of-care* baseada em potenciostato *homemade* e *smartphone* para análises multivariadas

<u>Márcia B. R. Vicentini</u>, Gabriela F. Giordano, Rui C. Murer, Fabio Augusto, Marco F. Ferrão, Gilson A. Helfer, Adilson B. da Costa, Angelo L. Gobbi, Leandro W. Hantao e Renato S. Lima

marcia.rocha@lnnano.cnpem.br

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 e a realização de analises multivariadas. O método foi, até o momento, aplicado em amostras de mel e calibrado em relação a um potenciostato comercial através de medidas por voltametria cíclica.

Palavras-chave: experimentos in-situ, aplicativo, Android, celular, instrumentação, PCA.

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]. Nesse caso, o uso de *smartphone* (aquisição e tratamento dos dados) e potenciostato portátil para a realização de testes eletroanalíticos é uma alternativa ideal levando-se a termo fatores como simplicidade, portabilidade, seletividade e sensibilidade [2]. Uma limitação do *smartphone*, porém, diz respeito ao seu uso em análises multivariadas as quais exigem capacidade de processamento de dados elevada. Assim, este trabalho descreve de forma inédita a construção de um sistema POC contendo potenciostato portátil e *smartphone* capaz de realizar a aquisição e o tratamento quimiométrico de dados multivariados com intento a aplicações em língua eletrônica (LE).

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* diversos de tratamento de dados e geração de gráficos. Após a conclusão do teste eletroquímico, o app realiza, opcionalmente, a analise multivariada dos resultados e exibe os *scores*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Modificações conferiram ao potenciostato *homemade* autonomia de carga (bateria de 9 V) e comunicação sem fio com o *smartphone*. Um aplicativo em Android foi desenvolvido a fim de adquirir, armazenar, enviar e processar os dados obtidos pelo potenciostato. A **Figura 1(a)** ilustra a plataforma analítica desenvolvida.

A plataforma foi utilizada na classificação de amostras de mel de acordo com a sua origem floral e geográfica. Para tal, empregou-se uma LE baseada em voltametria cíclica e eletrodo de trabalho de Au não modificado. Os voltamogramas foram obtidos a 8 amostras (100,0 g L⁻¹) diluídas em tampão PBS 100,0 mmol L⁻¹ (pH 7,0) como mostra a **Figura 1(b).** Todos os dados de corrente e potencial registrados foram investigados através da análise de componentes principais (PCA).

Uma PCA com quatro componentes foi capaz de explicar 91,69% da variância dos dados originais. A **Figura 1(c)** apresenta o gráfico de scores obtido. As amostras foram classificadas com sucesso de acordo com a sua origem floral e também geográfica (marmeleiro, café e laranja bem como cidades do PI, SP, Natal-RN, São Gabriel da Palha-ES e Santana da Vargem-MG).

CONCLUSÃO

Uma plataforma analítica foi desenvolvida para determinações eletroanalíticas POC. 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* e tratamento multivariado do resultado obtido. Ademais, nossa plataforma possui um desempenho analítico elevado. Os métodos eletroanalíticos possuem, em linhas gerais, níveis satisfatórios de precisão, robustez, sensibilidade e detectabilidade.

Como etapa futura, será implementada a transmissão de dados do *smartphone* para o potenciostato portátil. Assim, o aplicativo não apenas irá receber informações como também irá 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 usando a equação linear da curva analítica obtida. Com isso, objetivamos a realização automática de análises quantitativas preliminares.

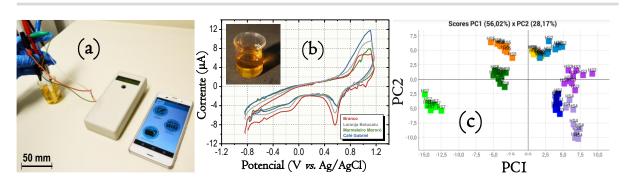


Figura 1. Plataforma portátil para aplicações em LE (a), voltamogramas cíclicos para soluções de mel de origens florais distintas (b) e gráfico de scores para uma PCA com quatro componentes considerando PC1 vs. PC2 (c). Inserção em (b): foto de uma amostra de mel analisada.

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.

Mechanical Characterization of Microcapsules with Tunable Elasticity

Maria J. B. Moura, Jorge Avendano, Ana Mehl, Débora F. do Nascimento, Wynter Duncanson, Márcio S. Carvalho

maria@lmmp.mec.puc-rio.br; jorge@lmmp.mec.puc-rio.br; amehl@lmmp.mec.puc-rio.br; debora@lmmp.mec.puc-rio.br; wynter.duncanson@nu.edu.kz; msc@puc-rio.br

Abstract: Microcapsules are commonly used in the pharmaceutical, cosmetics, and food industries. Here we present mechanical studies performed on polymeric microcapsules with tunable elasticity [1]. The stress-strain curves of the microcapsules were obtained by squeezing the capsules between two parallel plates. We have also performed experiments of flow of the microcapsules through a constricted capillary, measuring the pressure drop and the deformation of the capsules. Our final goal is to be able to produce/select microcapsules according to their mechanical properties and use these capsules to control water mobility through heterogeneous porous media.

Keywords: microcapsules; microfluidics; mechanical characterization;

Introduction: Microcapsules can be dispersed in aqueous phases flowing through heterogeneous porous media to improve mobility ratio and pore scale displacement efficiency in two-phase flow [2]. The performance of these dispersions is a strong function of the stability of the dispersion and of how the capsules flow through the porous space.

Here we show studies of the mechanical properties of microcapsules with tunable elasticity [1]. The microcapsules consist of an inner phase of water, a middle phase (the shell) of PDMS (SYLGARD 184: pre-polymer base with a crosslinker), and an outer phase of PVA solution in water 10wt%. The capsules are monodispersed and have ~700 microns in diameter. Our fabrication technique allows us to produce capsules with different shell thicknesses, by adjusting the injection rates, and with different stiffness, by adjusting the degree of polymer cross-linking.

Experimental procedure: We study the mechanical properties of the microcapsules with two methods: 1) Squeezing the capsules between two parallel plates in a rheometer, 2) Flowing of the capsules through a constricted capillary. Fig. 1 shows the two experimental setups.

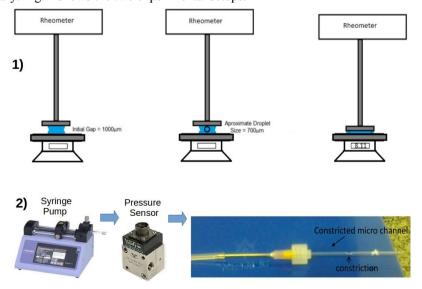


Figure 1: Experimental setup of the two methods used for the mechanical characterization of the microcapsules.

The mechanical characterization of the microcapsules performed with the rheometer (Hybrid Rheometer DHR-3 by TA Instruments) uses a parallel plate geometry, where we control the extent of the deformation through the gap, and measure the force exerted by the capsule. Relaxation time and compression speed are optimized and the normal force is recorded at the end of each stress relaxation measurement.

The second method uses a syringe pump connected to a pressure sensor (Validyne, range of 0-20 psia) connected to a capillary with a constriction of 400 μ m in diameter. The constricted microchannel serves as a model for a pore-throat geometry. The experiment consists of injecting a single capsule in water at a fixed flow rate. When the capsule reaches the constriction the pressure increases until the capsule is pushed out of the system. The pressure then abruptly decreases to ambient pressure. The pressure variation is monitored by the pressure transducer.

Discussion and results: We have studied microcapsules of four different polymer to crosslinker ratio: 5:1, 10:1, 17.5:1, and 20:1. Each of these systems had several different shell thicknesses (ST), named D1, D2,..., Dn. Fig. 2 shows an example of the results obtained with the squeezing tests and with the flow through a constriction tests.

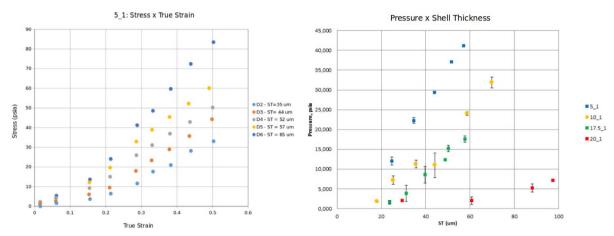


Figure 2: On the left: squeezing tests of microcapsules with a fixed polymer to crosslinker ratio, 5:1, diameters of ~700 μ m, and different shell thicknesses, from 35 μ m to 65 μ m. On the right: tests of flow of capsules of various polymer to crosslinker ratio and similar diameters, of ~700 μ m, through a constriction of 400 μ m in diameter.

We observe that capsules of same polymer to crosslinker ratio and similar diameters exhibit higher slopes in the stress-strain curve with the increase of shell thickness, as expected. Similarly, for a certain polymer to crosslinker ratio an increase in the pressure variation of passing the capsule through the constriction occurs with the increase of the capsule's shell thickness. Also the higher the concentration of polymer the softer the capsule is expected to be, and we observe that the pressure variation with the passage of the capsule through the capillary does decreases with the polymer concentration.

Conclusions: The mechanical properties microcapsules with tunable elasticity were studied with two different methods: 1) squeezing the capsules between two parallel plates, and 2) flowing of the capsules through a constricted capillary and measuring the pressure drop. These tests are able to clearly identify differences in the microcapsules. The results show that: a) the higher the polymer concentration the softer the capsule, and b) for a the same polymer to crosslinker ratio the thicker the capsule's shell the stiffer the capsule, both as expected. The next step is to try to predict the mechanical properties of a specific type of microcapsule based on the results of these studies. This would allow us to produce/select microcapsules according to their mechanical properties and use these capsules to control water mobility through heterogeneous porous media.

References and acknowledgements: This project was funded by the BG Group/Shell.
References: [1] W. Duncanson, J. Avendano, D. F. do Nascimento, and M. S. Carvalho, Workshop de Microfluidica V, *Fabrication and characterization of soft microcapsules with tunable elasticity* (2015).
[2] M. I. Romero, M. S. Carvalho, and V. Alvarado, Physical Review E, vol. 84 (4), 046305, (2011).

Development of microfluidic processes aiming β -carotene-incorporated liposomes production

*Mariano Michelon, <u>Davi Rocha Bernardes Oliveira</u>, Guilherme de Figueiredo Furtado, Lucimara Gaziola de la Torre, Rosiane Lopes Cunha

*michelonmariano@gmail.com

Abstract: β -carotene loaded liposomes were produced in planar microchannels with different aspect ratios by hydrodynamic flow-focusing technique. The increase of aspect ratio resulted in higher liposomes hydrodynamic diameter but lower polydispersity index in all experimental conditions. β -carotene incorporation did not exert influence on liposomes size, polydispersity and structure. The high aspect ratio of microchannels may be an important tool to increase liposomes production in microfluidic devices.

Key-words: *microfluidics*; *liposomes*; β -carotene.

Introduction: The poor physicochemical stability and low bioavailability of β -carotene related to its high hydrophobicity makes difficult its effective utilization as nutraceutical ingredient. On the other hand, liposomes are colloidal vesicles formed by the self-assembling of amphiphilic lipids that in excess of water aggregate forming lipid bilayers with aqueous compartments enclosured. The phospholipid bilayer can provide a physicochemical barrier against pro-oxidant elements through the incorporation of β -carotene making it an attractive ingredient to be used in aqueous food formulations. The production of liposomes by the microfluidic approach is based on the hydrodynamic flow-focusing method in microfluidic devices with cross-shaped geometry. However, some process parameters such as cross section area and flow rate conditions can directly affect on the diffusive mixture leading to significant variations on the hydrodynamic diameter and polydispersity of the system. Thus, the objective of this work was to develop and evaluate a microfluidic platform of hydrodynamic flow-focusing to obtain β -carotene-loaded liposomes in different process operational conditions.

Experimental procedure: Planar microfluidic devices of hydrodynamic flow-focusing geometry with different aspect ratios, varying width between 50, 100, 200 and 300 μ m and fixed height of 50 μ m (1:1, 2:1, 4:1 and 6:1, respectively) were prepared from polydimethylsiloxane by soft lithography. The liposomes were obtained by injection of an organic phase containing natural soybean lecithin (LipoidS45, Lipoid GmbH, Germany) dispersed in absolute ethanol at 100 mM in the central channel of the microdevice. The solutions were introduced through glass syringes, with their flow rates controlled by syringe-pumps PHD 22/2000 (Harvard Apparatus, USA). Similarly, assays for β -carotene loading were performed with addition of a concentration of 0.01% (w/v) β -carotene in organic phase. Images were recorded by an optical microscope Multizoom AZ100 (Nikon, Japan). After collected, the liposomes were maintained at 8 °C for 12 h prior to determination of particle size distribution by dynamic light scattering (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, UK) and transmission electron microscopy analysis (TEM-MSC Jeol 2100, Jeol Ltda, Japan).

Results and discussion: The influence of aspect ratio on average hydrodynamic diameter and polydispersity index of the systems is shown in Figure 1 (a,b). It was possible to observe an increase in average hydrodynamic diameter with increasing aspect ratio in all range of flow rate ratios (Figure 1a). Also, a decrease in the hydrodynamic diameter with increasing flow rate ratio was observed. Besides, the aspect ratio showed a smaller influence on the diameter of liposomes formed in higher values of flow rate ratio. On the other hand, the microfluidic device with higher aspect ratio tended to generate liposomes with a lower polydispersity index in comparison with the lower one at each flow rate ratio tested (Figure 1b). The significant lower polydispersity index of generated liposomes seen in high aspect ratio device is consistent with the hypothesis that higher aspect ratios result in more uniform fluid velocity across the width of the focusing and diffusive mixing region, thereby enabling the production of more narrowly distributed populations of liposomes. Besides, there were not significant changes (p<0.05) in polydispersity index with flow rate ratio increase. Figure 2 (a,b) shows the influence of incorporation of β-carotene (0.01% w/v) in the organic phase on average hydrodynamic diameter and polydispersity of systems. Significant changes (p<0.05) were not observed in both responses. Figure 3 (a,b) shows TEM-micrographs of liposomes obtained with or without β-carotene incorporation, where it was possible to observe typical microscopy of liposomal systems with spherical or rod-like structures. The TEM-micrographs

also indicated that β -carotene did not induce significant changes in the liposome structure, confirming the results of size and polydispersity index shown in the Figure 2 (a,b). Therefore, the use of microfluidic devices leads to the formation of liposomal systems for loading of β -carotene with reduced hydrodynamic diameter and low polydispersity index.

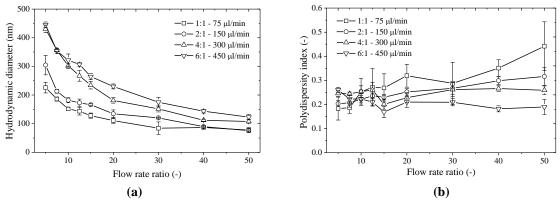


Figure 1. Influence of aspect ratio and flow rate ratio on hydrodynamic diameter (a) and polydispersity index (b). All assays were performed at room temperature with constant total velocity of 0.5 m/s.

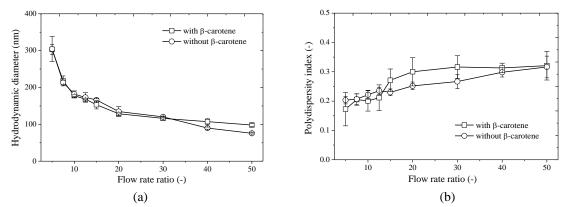


Figure 2. Influence of β-carotene and flow rate ratio on hydrodynamic diameter (a) and polydispersity index (b). All assays were performed at room temperature with constant total velocity of 0.5 m/s using device with 2:1 aspect ratio.

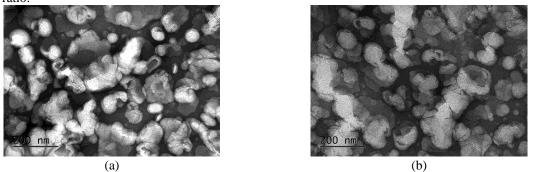


Figure 3. TEM-negative staining of liposomes obtained in absence (a) and presence (b) of β -carotene. Conditions: room temperature; constant velocity of 0.5 m/s; 2:1 aspect ratio and flow rate ratio equal 10.

Conclusions: For the best conditions, it was possible to produce liposomes with a diameter of approximately 80 nm and polydispersity index around 0.2. The development of microfluidic devices with high aspect ratios for continuous operation at high flow rates in laminar flow, promoting structures with low index of polydispersity is an important tool to develop parallelized systems for use in the food, comestic or pharmaceutical industries.

Acknowledgment: The authors thank the CNPEM (Laboratory of Microfabrication/LNNano) for the opportunity to fabricate microfluidics devices, especially the technical help of Angelo Gobbi and Maria Helena de Oliveira Piazzeto. The authors also thank the CEME/UNIFESP and financial support of CNPq.

Ex vivo study of the adhesion and growth of Xylella fastidiosa in artificial microenvironments

Moniellen P. Monteiro, Prasana Sahoo, <u>Jacobo Hernandez-Montelongo</u>, Alessandra A. de Souza, Maria H. Piazzetta, Angelo L. Gobbi and Monica A. Cotta

moniellenpires@gmail.com; prasanasahoo@gmail.com; <u>jacobo@ifi.unicamp.br</u>; alessandra@centrodecitricultura.br; maria.piazzetta@lnnano.cnpem.br; angelo.gobbi@lnnano.cnpem.br; monica@ifi.unicamp.br

Abstract: Xylella fastidiosa bacterium is one of the top 10 pathogenic bacteria in molecular plant pathology. The diseases caused by X. fastidiosa are associated with their extensive colonization inside the plant xylem, where bacterial biofilms block nutrient flow. In this work, we used PMDS/glass-based microfluidics devices as an artificial micro-environment to simulate the xylems in plants. Moreover, functionalization with synthetic cellulose and XadA1 adhesin were performed to study how the surface affects the mechanisms of bacterial adhesion and growth. We observed that both the chemical and micro-environment show a strong influence in the growth pattern of X. fastidiosa bacteria without and under constant flow conditions. Next step of our work concerns about further studies of the motility of bacteria in the functionalized micro-channels.

Keywords: *Xylella fastidiosa*; *microfluidics*; *artificial microenvironments*.

Introduction: *Xylella fastidiosa* is one of the top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. This microorganism is the causal agent of several diseases in economically important plants, such as plum, olive, almond, peach, coffee, grapevine and citrus, worlwide. The diseases caused by *X. fastidiosa* are associated with their extensive colonization inside the plant xylem, where the bacterial biofilms block nutrient flow. In order to understand this process in more detail, *ex vivo* studies are required, focusing on the adhesion, growth and motility of *X. fastidiosa* under flow in artificial polydimethylsiloxane (PDMS)-based microenvironments (microfluidics). In order to mimic the plant xylem, microdevices can be functionalized with synthetic cellulose (CMC). Moreover, micro-channels were also functionalized with XadA1 protein, an adhesin which is overexpressed during early stages of *X. fastidiosa* biofilm formation.

Material and methods: Glass flat substrates were cleaned by ultra-sonication in acetone, isopropanol and distilled water, for a period of 15 min in each solution. In the case of PDMS flat substrates, they were cleaned by ultra-sonication in isopropanol for 15 min. Both substrates were dried via N₂ flow. Pre-treatment of substrates included chemical oxidation and amination, since amine groups on the surface were necessary for the subsequent biofunctionalization cascade. Oxidation of both substrates was performed using Piranha solution (H₂O₂:H₂SO₄::2:3 for 10 mins), and amination was obtained by 12 h immersion of substrates in a 5M ethanolamine solution (ethanolamine hydrochloride in dimethyl sulfoxide, water-free). CMC functionalization was performed by a 30 min chemical reaction of the aminized substrates with our CMC solution: 50 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) + 50 mM N-hydroxylsuccinimide (NHS) + 50 mM sodium carboxymethyl cellulose (CMC) in 2-(N-morpholino)ethanesulfoni acid buffer (MES, pH 5.0). Previous to XadA1 functionalization, aminized substrates were linked to poly(ethylene glycol) 2-aminoethyl ether acetic acid average M_n 3400 (NHS-^{3.4k}PEG-COOH) by 1 h reaction in 50 mM EDC + 50 mM NHS-^{3.4k}PEG-COOH, both in MES buffer (pH 5.0). Afterwards, samples were in contact with a XadA1 solution (1µl/ml) for 2 h in a humid atmosphere. At the end of each chemical step, samples were rinsed with distilled water and/or PBS buffer, and dried with a N₂ flow. The functionalization of samples was monitored by measuring their respective water contact angle in each alternating deposition. A contact angle goniometer Easy DropDSA-150 goniometer Krüss (Germany) was used in the static sessile drop mode. PDMS/glass-based micro-channels were developed in the Brazilian Nanotechnology National Laboratory (LNNANO). Each chip consists of PMDS with micro-channels of 20 µm width and 1000 µm length, assembled on glass. The micro-channels of the devices were also submitted to chemical functionalization as flat substrates. Bacterial culture protocol was adapted from Janissen et al. (2015) [1]. X. fastidiosa 1139959 strain, transformed by electroporation with the vector pKLN5960 to express soluble green fluorescent protein (GFP) were used in this study. Bacterial inocula with a concentration of 2×10^7 CFU/ml were used for the experiments as initial concentration for culture in Periwinkle Wilt medium (PW). Flat substrates and micro-channels were incubated for 2 days without culture media replacement. In the case of flat substrates, after the culture time, PW was removed in order to interruptthe growth; for the case of micro-channels, the flow rate was stabilized at 30 μ l/h for 22 h. The GFP expressing bacteria samples were measured using an epifluorescence microscope (Nikon TE2000U, USA) with a peltier-cooled back illuminated EMCCD camera (IXON3, 1024 3 1024 pixels, Andor, Ireland) for sensitive fluorescence detection and a 1003 oil-immersion objective (CFI APO TIRF,NA. 1.45, Nikon, USA). GFP excitation and bacterial bright-field imaging wasachieved by a 150 W Mercury-lamp with filter sets (AHF, Tübingen, Germany) forGFP (488 nm) and neutral density (ND8) filters. For each sample, the bacteria and EPS deposition were measured using brightfield imaging followed by a fluorescence measurement. The reported observations for dried bacterial samples on flat substrates and for *ex vivo* experiments were based on analysis of n = 125 measurements for 5 repetitions.

Results and discussion: Functionalization on flat substrates was evaluated by measuring the water contact angle after each step (Fig. 1A). The different angle value in each functionalization suggest the correct chemical modification on the surface of samples according with the applied treatment: the oxidized samples presented more hydrophilicity, and the wettability was reduced according to each next chemical step. Due to these results from the flat substrates, we considered that micro-channels obtain the same chemical modifications using these functionalization protocols. Fig. 1B presents the bacterial density on flat and micro-channels samples for each functionalization. Firstly, the bacterial density on flat substrates was increased considerably due to the surface functionalization. Cell densities on CMC and XadA1 flat substrates were almost 5 and 9 times larger than Pristine one. The influence of to the microenvironment was also important. The bacterial density in Pristine and CMC micro-channels were increased almost 3 times in compare with their respective flat substrates. In the case of the XadA1 micro-channels, the bacterial density was 6.5 times larger in compare with its repective flat substrate. However, the most important effect on the adhesion of bacteria was the synergy of both surface functionalization and microenvironment. The bacterial density was, from the flat Pristine substrate to the functionalized CMC and XadA1 micro-channels, more than 12 and 57 times, respectively. On the other hand, the bacterial density in micro-channels under a constant flow rate was also studied (Fig. 1C). For the cases of Pristine and CMC micro-channels, the bacteria were easily removed by the flow of PW. After 22 h of constant flow, Pristine and CMC micro-channels, presented 86% and 79% drop in the bacterial density, respectively. However, in the case of XadA1 micro-channels, despite of the constant flow of culture medium, the bacterial density increased almost 50%. These results suggest the behavior of bacteria in plants, X. fastidiosa is available to be fluid inside the xylems (CMC micro-channels) but when XadA1 is expressed (XadA1 micro-channels) the bacteria density increases considerably, which subsequently would generate biofilms. On the other hand, a recent work of our group showed that the XadA1 protein increase 2 times the adhesion force in X. fastidiosa cells [2]. This also explain the resistance of the bacteria to the force of the flow.

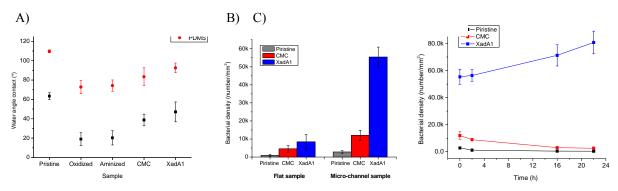


Figure 1. A) Monitoring of functionalized flat substrates. B) Bacterial density: the chemical and microenvironment effect. C) The bacterial density of micro-channels under a constant flow of PW.

Conclusions: Our results suggest that both microenvironment and surface functionalization have an important influence on theadhesion and growth of *X. fastidiosa*. This study provided a potential approach to understand the earlybacterial cell adhesion dynamics on PDMS/glass-based microdevices. However, further studies regarding of the motility of bacteria in the functionalized micro-channels are required.

Acknowledgements and references:This work was financially supported by FAPESP (grant numbers 2010/51748-7321 and 2013/02300-1), CNPq and CAPES. [1] R. Janissen et al., Sci. Rep. **5**, 9856 (2015), [2] P. Sahoo et al., Nano Lett. Just Accepted ManuscriptDOI: 10.1021/acs.nanolett.6b01998

Método analítico quantitativo para antocianinas em dispositivo microfluídico a base de papel associado com imagem digital

Priscilla Souza Ferreira, Adriana Vitorino Rossi

priscilla.ferreira@iqm.unicamp.br, adriana@iqm.unicamp.br

Resumo: Microfluidic paper-based devices (μPAD) printed with solid wax in chromatographic paper were used for anthocyanins extracted from grapes analysis, in combination to scanning images to be digitalized in the RGB colour system. The values of the colour intensities in the RGB system were correlated with the concentration of anthocyanins solutions. The procedure was the addition of 8 uL of anthocyanins solutions prepared in pH 1 solutions in the μPAD , and the images were scanned with 400 dpi using a table scanner, following the determination of the colour intensity by the program GIMP 2.8. There is a inversely proportional correlation of the values the RGB intensities with the anthocyanins concentration, but the G values were the most correlated ($r^2 = 0.9445$). The results of the linearity and precision evaluation tests gave relative standard deviation lower than 4 % and the accuracy test results that the tendency of most part of results agrees with the National Vigilancy Sanitary Agency standards: 100 ± 2 %.

Palavras-Chaves: microfluídica em papel; sistema RGB; antocianinas

Introdução: Dispositivos microfluídicos à base de papel (microfluídicpaper-baseddevices, µPAD) combinados com métodos colorimétricos representam uma opção promissora para o desenvolvimento de plataformas que visam aplicações em campo. O papel passou a ser o substrato mais alternativo devido ao baixo custo, fácil manuseio e alta velocidade de produção. Impressão à base de cera é uma das técnicas mais simples e rápidas, que permite a criação de canais hidrofílicos delimitados por barreiras hidrofóbicas no papel¹. As zonas reacionais formadas restringem a amostra, diminuem problemas de dispersão e aumentam a detectabilidade devido à uniformidade do espalhamento do produto colorido sobre a superfície do papel. Itens comuns de escritório como scanner, que permite aquisição de imagens digitais, servem como ferramenta para propostas analíticas, por fornecer, de forma rápida, informações que podem ser associadas às concentrações de espécies químicas coloridas, empregando programas computacionais, para que as informações das imagens sejam convertidas em dados numéricos no sistema RGB (Red, Blue, Green). Como a intensidade da cor pode ser proporcional à concentração de uma espécie química colorida, em µPAD, a quantificação pode ser realizada a partir da correlação de valores de componentes do sistema RGB com a concentração da espécie, em analogia a medidas espectrofotométricas, mas dispensando qualquer instrumental específico. Neste trabalho, utilizou-se µPAD para análise de antocianinas, que são corantes naturais fenólicos responsáveis pelas tonalidades que variam do vermelho ao azul, obtidas de uva, que tem quantificação oficial por espectrofotometria.

Procedimento experimental: μPAD foram preparados por impressão com cera sólida (Xerox Phaser 8560N) em papel cromatográfico (Whatman n° 1) em um design composto de 96 zonas reacionais circulares, com diâmetro de 7 mm, dispostas em um arranjo de 8 linhas e 12 colunas. Após a impressão, os dispositivos eram levados à estufa (QUIMIS®) a 150 °C por 120 s para permeação da cera e impermeabilização das zonas de reação, em seguida o verso dos μPAD era revestido com filme plástico autoadesivo transparente (Con-Tact®) para evitar perdas de líquido. Para os testes, eram adicionados 8 μL de soluções de antocianinas preparadas em solução de pH 1² no centro de cada zona reacional, deixando-as secar à temperatura ambiente (~ 25 °C). Empregando scanner de mesa (Lexmark X83), imagens digitais foram adquiridas com qualidade de 400 dpi pela posição dos μPAD no centro da placa de digitalização e para determinação das intensidades de cor empregou-se o programa de uso livre GIMP 2.8. O método foi avaliado com análise dos parâmetros linearidade, precisão e exatidão de acordo com a Resolução 899/2003 para a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)³ e com a Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos de 2010 do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO)⁴.

Resultados e discussão: Há uma relação inversamente proporcional dos valores das componentes R, G e B (I_x , onde x é R, G ou B) das imagens dos μ PAD contendo antocianinas. A Figura 1 ilustra os dados dessas relações que são diretamente proporcionais utilizando os valores de - I_x . Soluções de antocianinas mais concentradas preparadas em pH 1 formam manchas de cor vermelho intenso nas zonas reacionais dos μ PAD, correspondendo

a valores mais baixos para a componente G, que foi a mais correlacionada (r² = 0,9445) com a concentração. Para as componentes R e B os valores variam pouco e são próximos do máximo (255), sendo inadequado utilizálas para relacionar com a concentração. Portanto, a componente G foi escolhida para proposta de quantificação de antocianinas em µPAD.

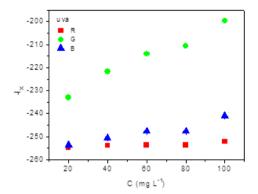


Figura 1: Variação de -I_x, com a concentração de antocianinas em mgL⁻¹. Procedimentos com 5 replicatas. x = R, G ou B.

Na avaliação do parâmetro linearidade, os valores da componente G variaram linearmente com a concentração de antocianinas na faixa estudada (61 a 121 mg L^{-1}) com desvio padrão relativo (DPR) para todas as medidas inferiores a 1 %. Na avaliação da precisão, os resultados mostraram DPR menores que 4 %. Estes resultados indicam que o método de μ PAD é preciso e está de acordo com os critérios de aceitação definidos pela resolução 899/2003 da ANVISA que não admite DPR maiores que 5 %. Em termos de exatidão, a tendência dos resultados deve estar inserida no intervalo de $100 \pm 2\%$ para cada concentração. A concentração experimental foi obtida pela curva linear na faixa de trabalho e os resultados obtidos indicaram a exatidão do método desenvolvido, conforme indicam os dados da Tabela 1.

 $\textbf{Tabela 1:} \ \text{Avalia}\\ \textbf{ção}\ \text{da exatidão do método desenvolvido para quantifica}\\ \textbf{ção de antocianinas em } \mu PAD.$

concentração de referência* (mg L-1)	69	84	114
concentração experimental (mg L-1)	67	85	113
tendência (%)	97	101	99

^{*} obtida pelo método oficial espectrofotométrico para quantificação de antocianinas².

Conclusões: Os valores de RGB convertidos em - I_x têm relação diretamente proporcional com a concentração de antocianinas e os resultados indicaram que a componente G é a mais adequada para relações quantitativas nos μ PAD. Na avaliação da linearidade, a componente G tem relação linear com a concentração de antocianinas na faixa de estudo. Avaliando a precisão, foram obtidos DPR menores que 4 % e no ensaio de exatidão, a tendência da maior parte dos resultados obtidos pelo método desenvolvido atende a recomendação da ANVISA (100 \pm 2 %). Os presentes resultados indicam que os μ PAD confeccionados utilizando impressora que usa cera sólida são aplicáveis para fins quantitativos de soluções de antocianinas e a utilização de equipamentos de baixo custo, como scanner de mesa, e tratamento matemático de dados com programa de uso livre, torna a proposta viável e acessível, dispensando medidas espectrofotométricas, que representam o método oficial de quantificação desses corantes naturais.

Referências e agradecimentos:

 $\label{eq:carrilho} \mbox{[1] E. Carrilho; A. W. Martinez; G. M. Whitesides. Analytical Chemistry, {\bf 81}, 7091 (2009).}$

[2] J. Lee; R. W. Durst; R. E. Wrolstad. Journal of AOAC International 88, 1269 (2005).

Resolução 899. ANVISA. (2003).Disponível [3] em www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=1-9-34-2003-0 5 29-899. Acesso em 30/05/2016 Orientação sobre validação de métodos analíticos, disponível em

www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf. Acesso em 30/05/2016

Agradecemos à CAPES pela bolsa e ao IQ-UNICAMP pela infraestrutura.

Separação de Aminas Biogênicas Utilizando Microchip Eletroforese com Detecção Eletroquímica

Renata Costa dos Santos, Victor Cordeiro Fireman, Caio César de Lima França, Diógenes Meneses Santos, Fabiane Caxico de Abreu

renatacostadsantos@gmail.com, victor.fireman@hotmail.com, cbjrcaio@hotmail.com, diogenesmeneses@hotmail.com, caxico.fabiane@gmail.com

Resumo: Aminas biogênicas são formadas pela descarboxilação enzimática e pela transaminação dos aldeídos e cetonas de alguns aminoácidos livres. A presença de aminas biogênicas em matrizes alimentares, principalmente de origem proteica, está diretamente relacionada aos problemas de intoxicação em seres humanos. Visando desenvolver uma metodologia que demande pouco volume de amostra durante a análise e resposta rápida, este trabalho tem a finalidade de separar e detectar simultaneamente três tipos de aminas biogênicas derivatizadas, as quais são histamina, putrescina e cadaverina, através de detecção eletroquímica em microchip eletroforese. E para isso foi feito o estudo do tipo de eletrodo de trabalho capaz de detectar as três espécies em uma mesma análise. O método mostrouse eficiente e o perfil eletroforético das aminas apresentou maior integridade dos picos formados pelo sistema de análise, utilizando eletrodo de tinta de carbono em meio MES/His.

Palavras chaves: aminas biogênicas, microchip eletroforese, detecção eletroquímica

Introdução: Aminas biogênicas são substâncias formadas pela descarboxilação enzimática e pela transaminação dos aldeídos e cetonas de alguns aminoácidos livres, podendo ocorrer naturalmente em microorganismos, plantas e animais, como consequência de seu metabolismo [1]. Esse processo pode se dar através de enzimas descarboxilase endógenas, naturalmente presentes nos alimentos, ou através de enzimas descarboxilase exógenas libertadas por microrganismos associados aos alimentos [2].

Pelo processo natural podem ser encontradas em baixa concentração em frutas, vegetais, leite e produtos não fermentados. Altas concentrações de aminas biogênicas podem ser encontradas em produtos fermentados, peixes e em outras matrizes alimentares, principalmente de origem proteica, oriundos da descarboxilação provocadas por microrganismos. Estas altas concentrações é o que está diretamente relacionada aos problemas de intoxicação em seres humanos e, por este motivo, o estudo das aminas é de grande interesse, tornando-se também um indicador de qualidade dos alimentos [1,2]. O alto custo de análises e equipamentos e reagentes torna-se um obstáculo para pesquisa; deste modo, a proposta de nosso trabalho foi utilizar derivatização das aminas para detecção simultânea de putrescina, histamina e cadaverina utilizando um microchip eletroforese com detecção eletroquímica (MEDE). E para isso, foi realizado estudo do meio tamponante e do melhor tipo eletrodo de trabalho para detecção eletroquímica.

Procedimento Experimental: As aminas biogênicas foram derivatizadas com ortoftadialdeído (OPA). Inicialmente foi estudado o comportamento eletroquímico de cada amina, antes e após derivatização utilizando a técnica de voltametria cíclica. Esses experimentos eletroquímicos foram realizados em cela convencional usando um sistema de 03 eletrodos (trabalho, auxiliar de Pt e referência de (Ag/AgCl_{sat})). Foram testados os eletrodos de ouro, ouro modificado com o *quantum dot* CdSe e tinta de carbono, em tampões Borato a pH = 10,00, fosfato a pH = 7,00 e MES/Histidina a pH = 6,00. O *quantum dot* (CdSe) foi imobilizado no eletrodo de ouro com auxílio do aminoetanotiol. Com esse estudo foi identificado o melhor material eletródico e meio com capacidade de detectar as três espécies estudadas.

Para fabricação do microchip utilizamos um elastômero polidimetilsiloxano (PDMS), preparado sobre um molde. Os microchips em PDMS consistiu de um desing tipo cruz de quatro vias, ou em T, com canais de 15 µm de profundidade e 40 µm de largura, um canal de separação de 5 cm e com três braços laterais 0,7 cm cada. Os furos para os reservatórios foram realizados com perfurador de papel com diâmetro cerca de 0,6 cm. O PDMS contendo o canal foi selado reversivelmente a uma placa de vidro contendo um eletrodo

de Pt utilizado como desacoplador, posicionado dentro do canal de separação cerca de 1,5 mm da saída. O eletrodo de trabalho foi posicionado cerca de 0,5 mm da saída do canal de separação e os eletrodos de referência e auxiliar posicionados próximos do eletrodo de trabalho. Foi então utilizado uma fonte de alta tensão usada para injeção da amostra e separação eletroforética das aminas. Para detecção amperométrica foi utilizado um potenciostato em circuito fechado utilizando um eletrodo de fio de Ag como pseudoreferência, fio de Pt como auxiliar e eletrodo de trabalho de fio de ouro, ou fio de ouro modificado com o quantum dot (CdSe) e tinta de carbono.

Resultados e discussões: Os experimentos de voltametria cíclica demonstraram que o OPA sofre um processo de oxidação irreversível em altos valores de potencial (em torno de 0,9 V versus Ag/AgCl) em todos os meios e eletrodos testados. Com relação as aminas sem o processo de derivatização, a putrescina apresentou um pico (0,95 V) em tampão fosfato pH 7,00 usando o eletrodo de ouro modificado com o quantum dot (CdSe). Além de material eletródico interessante, o uso do quantum dot teve como objetivo a possibilidade de catalisar a oxidação das aminas ou ainda serem usados em detecção por fluorescência. Já a cadaverina apresentou pico (0,70 V) em tampão MES/His pH 6,00 usando eletrodo de carbono. Após o processo de derivatização, algumas aminas apresentaram processo redox em todos os meios estudados, mas somente em tampão MES/His e eletrodo de carbono, todas aminas deram sinal de oxidação, sendo este sistema o escolhido para a detecção das aminas no microchip.

Com o MEDE foram otimizadas as condições de potencial e tempo de injeção, bem como o potencial de separação eletroforética das aminas. Experimentos com o MEDE operado sob modo *pinched* utilizando potenciais de injecção de +700 V por 5s e de separação +1200 V, demonstrou um perfil eletroforético desejável com a presença dos picos das aminas cadaverina, putrescina e histamina bem definidos, com diferentes tempos de migração (30, 70 e 130 s respectivamente) para as aminas injetadas individualmente. Juntas, ocorreu o processo de separação das mesmas, sendo assim um sistema adequado para análises das aminas biogênicas estudadas.

Conclusão: Auxiliado pelos experimentos de voltametria cíclica, testes com microchip eletroforese demonstraram que é possível separar e detectar as aminas biogênicas cadaverina, putrescina e histamina após processo de derivatização em meio MES/His, utilizando o eletrodo de tinta de carbono.

Referências e agradecimentos:

[1] ONAL, A; TEKKELI, S. E. K; ONAL, C. FOOD CHEMISTRY 138 (2013) 509-515

[2] MAYER, H. K.; FIECHTER, G.; FISCHER, E. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, 1217 (2010) 3251-3257

CNPq, Capes, Fapeal e UFAL

Bateria primária on-chip utilizando folhas individuais de grafeno

Rodrigo M. Iost^{1,2}, Klaus Kern^{1,3}, Kannan Balasubramanian¹, Frank N. Crespilho²

¹Max Planck Institute for Solid State Research, Stuttgart, Germany
²Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil
³École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland

rodrigo_iost@iqsc.usp.br

Resumo O isolamento e estudo de folhas únicas de materiais do tipo 2D é, atualmente, tema de grande destaque. O grafeno, uma folha única com espessura de um átomo de carbono, é visado em futuras aplicações em micro- e nanoeletrônica e o seu estudo eletroquímico fundamental é um aspecto de grande importância a ser considerado em sua fabricação. A presença de contaminação, como partículas de cobre, é intrínseco ao grafeno obtido por deposição química em fase vapor e, uma vez que a transferência da folha de grafeno é almejada, a obtenção de amostras com alta qualidade ainda é um desafio, principalmente na fabricação de dispositivos miniaturizados. Nesse estudo, nós reportamos uma rota simples para a remoção de traços remanescentes de impurezas de Cu remanescentes do processo de obtenção do grafeno via eletroquímica em meio ácido contendo íons Cl. Nós reportamos também a obtenção de uma bateria primária do tipo Cu/Zn operando em um único chip de Si/SiO₂. O ânodo e o cátodo foram obtidos pela deposição eletroquímica do Cu e do Zn sobre a folha única de grafeno, para a obtenção de uma célula de Daniel miniaturizada com uma voltagem estável de 1,1V por algumas horas de operação e capacidade de 15μAh, o bastante para a operação de uma calculadora de bolso.

Palavras-Chaves: grafeno; impurezas metálicas; bateria primária de Cu/Zn

Introdução: Uma folha de grafeno é definida pela IUPAC como uma camada única formada por átomos carbono da estrutura do grafite [1,2]. No entanto, a obtenção de uma folha de grafeno foi considerada como sendo improvável em teoria, e somente foi isolada no ano de 2004 [3]. Em 2007 [4], A. K. Geim e K. Novoselov reportaram o estudo de uma única folha de grafeno pela esfoliação mecânica do grafite pirolítico com uma fita adesiva. Embora uma folha de grafeno seja passível de obtenção pela utilização da fita adesiva, a obtenção de grafeno com altas áreas geométricas e uniformidade de tamanho de folha foi reportada pela utilização de catalisadores metálicos como Cu ou Ni, quando expostos a uma atmosfera inerte contendo um gás precursor como o CH₄ em altas temperaturas, ou deposição química em fase vapor (chemical vapor deposition, CVD). Com o passar dos anos, o grafeno tornou-se a base para o desenvolvimento de novos dispositivos eletrônicos de carbono do tipo 2D. No entanto, somente em estudos recentes a transferência fidedigna da folha de grafeno para substratos arbitrários foi possível, como o Si/SiO2, mica, quartzo e polímeros flexíveis, característica muito interessantes principalmente em futuros estudos de desenvolvimento de micro- e nanodispositivos eletrônicos. Song e colaboradores [5] reportaram o uso de uma estampa polimérica de auto-soltura (self-releasing) como o poli(metil metacrilato)(PMMA) ou o poli(estireno)(PE). A escolha do polímero é tal que a força de adesão entre a camada do polímero e a folha de grafeno é menor do que a força de adesão entre o grafeno e o substrato sólido, sendo que esse procedimento permite a transferência do grafeno sem a ruptura ou quebra ao mesmo tempo em que permite o controle da área de grafeno transferida para o substrato sólido de interesse. Com a deposição da matriz polimérica sobre a folha de grafeno CVD, o metal é removido por uma solução de lavagem que pode ser formada por uma solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) e peróxido de hidrogênio (H2O2) ou cloreto de ferro(III) (FeCl₃) e H₂O₂. Assim, o metal é removido pela solução de lavagem e transferido manualmente para um substrato sólido de interesse com posterior remoção do polímero com um solvente orgânico apropriado, como a acetona ou o tolueno. No entanto, um fator de extrema importância tem sido destaque na literatura que é a presença de fatores que alteram as propriedades eletroquímicas de nanomateriais, principalmente quando obtidos por CVD, como a presença de impurezas de metais nas amostras.

A presença de partículas metálicas altera drasticamente as propriedades ópticas, eletrônicas e eletroquímicas de amostras nanomateriais de carbono, como o grafeno. Em um trabalho recente publicado pelo nosso grupo de pesquisa, a presença de impurezas remanescentes da plataforma de Cu utilizada para o

crescimento de folhas de grafeno por CVD também foi demonstrada, de forma que uma metodologia foi utilizada para a minimização dos efeitos dessas impurezas pelo desenvolvimento de uma metodologia de lavagem eletroquímica (*electrochemical etching* ou *e-etching*)[6]. Essa metodologia permitiu que o cobre remanescente fosse removido da mesma forma que as suas propriedades de superfície e estruturais fossem mantidas, sem quebras adicionais ou buracos. O *e-etching* foi realizado pela utilização da voltametria cíclica do mesmo eletrodo em uma solução aquosa de HCl 0,1 mol L⁻¹ de forma que o processo de oxidação associado a presença de espécies de cobre remanescentes no eletrodo fossem suprimidos. A obtenção dessas amostras da suporte para a obtenção de baterias utilizando-se folhas únicas de grafeno [7].

Procedimento experimental: O polímero poli(estireno) foi depositado sobre a folha de cobre/grafeno, seco e a plataforma de cobre removida inicialmente pela utilização de uma solução aquosa de HCl:H₂O₂. O grafeno foi então transferido para um chip de Si/SiO₂ e o cobre remanescente removido via eletroquímica. Para isso, a varredura cíclica foi feita no intervalo de potenciais -1,0 V a +1,0 V (*vs.* Ag/AgCl) em solução aquosa de HCl 0,01 mol L⁻¹ e 0,1 mol L⁻¹[6]. Para a obtenção da bateria primária, as duas folhas de grafeno foram dispostas em um único chip de Si/SiO₂, de forma que o Cu e o Zn (cátodo de ânodo) foram depositados via eletroquímica[7].

Resultados e discussão: O *e-etching* permitiu que os eletrodos de folhas de grafeno fossem obtidos sem a presença de traços de impurezas que afetassem as propriedades eletroquímicas do grafeno de forma significativa. O resultado obtido mostrou uma diminuição do processo de oxidação associado a espécie CuCl₂⁻, solúvel no eletrólito suporte utilizado, com consequente remoção do Cu remanescente da folha de grafeno depositada sobre o chip de Si/SiO₂. Após o estudo eletroquímico e remoção das impurezas remanescentes da folha de grafeno CVD, o estudo de uma bateria primária do tipo Cu/Zn operando em um único chip de Si/SiO₂ foi desenvolvida. Os resultados mostraram que o sistema de cela de Daniel operando em um único chip de Si/SiO₂ apresentou uma voltagem de 1,1V por algumas horas de operação e capacidade de 15μAh [7], o bastante para a operação de uma calculadora de bolso. A figura 1 mostra a fotografia da cela de Daniel em grafeno, de forma que o Cu e o Zn foram depositados sobre a folha de grafeno, com o eletrólito suporte contido no gel de argar. Para a compartimentalização do sistema, uma impressora 3D foi utilizada na obtenção do compartimento da cela, feito de poli(ácido lático) como material.

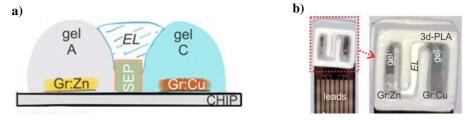


Figura 1.a) Representação esquemática da bateria primária de Gr:Zn/Gr:Cu em chip de Si/SiO₂. **b**) Fotografia do chip de Si/SiO₂ contendo os eletrodos de Gr:Zn e Gr:Cu separados por um compartimento obtido por impressão 3D. Reproduzido da referência [7].

Conclusões: A remoção do Cu remanescente do procedimento de transferência da folha de grafeno foi realizada com eficácea, resultado importante e crucial do ponto de vista da obtenção de dispositivos eletrônicos de grafeno. Com o desenvolvimento do microchip de Si/SiO $_2$ /grafeno, uma bateria primária do tipo Cu/Zn com a menor espessura já reportada foi desenvolvida com alta estabilidade de voltagem da cela (1,1V) e alta capacidade (15 μ Ah), desempenho demonstrado na prática pela operação de uma calculadora de bolso. Esses resultados são promissores no desenvolvimento de novos chips baseados em grafeno de alto desempenho e abre novos caminhos para a obtenção de dispositivos miniaturizados.

Referências e agradecimentos:

- [1] IUPAC Compendium of Chemical Terminology, Graphene Layer, (1997).
- [2] Compton RG, Electrochemistry Communications, 64 (A1) (2016).
- [3] Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Jiang D, Zhang Y, Dubonos SV, et al. Science, 306(5696): 666 (2004).
- [4] Geim AK, Novoselov KS, Nature Materials, **6**(3): 183 (2007).
- [5] Song J, Kam FY, Png RQ, Seah WL, Zhuo JM, Lim GK, et al. Nature Nanotechnology, 8(5): 356 (2013).
- [6] Iost RM, Crespilho FN, Zuccaro L, Yu HK, Wodtke AM, Kern K, Balasubramanian K, ChemElectroChem, 1(12): 2070 (2014).
- [7] Iost RM, Crespilho FN, Kern K, Balasubramanian K, Nanotechnology, 27(1): 29LT01 (2016).

A Simple and Sensitive Paper-Based Device Coupling Electrochemical Sample Pre-Treatment and Colorimetric Detection

Thalita G. Silva, William R. de Araujo, Wendell K.T. Coltro and Thiago R. L. C. Paixão

thalita.guedes.silva@usp.br, william_reis_araujo@hotmail.com, wendell@ufg.br and trlcp@iq.usp.br

Abstract: We report the development of a simple, portable, low-cost, high-throughput visual colorimetric paper-based analytical device for the detection of procaine in seized cocaine samples. The interference of most common cutting agents found in cocaine samples was verified, and a novel electrochemical approach was used for sample pretreatment in order to increase the selectivity. Under the optimized experimental conditions, a linear analytical curve was obtained for procaine concentrations ranging from 5 to 60 μ mol L^{-1} , with a detection limit of 0.9 μ mol L^{-1} . The accuracy of the proposed method was evaluated using seized cocaine samples and an addition and recovery protocol.

Key-words: procaine, seized cocaine, colorimetric detection, microfluidic paper-based analytical devices, electrochemical sample pre-treatment.

Introduction: Colorimetric spot test analysis is a powerful tool for rapid qualitative analysis and can be applied in situations in which a decision is critical. Furthermore, colorimetric spot tests can be performed using different types of substrates, including paper. Paper has the advantages of low cost and ready availability and affordability anywhere in the world ^{1,2}. The combination of colorimetric analysis and paper spot tests is powerful due to reduce the expensive equipment uses, be rapid and minimal sample consumption, not to mention that it enables portability so that analysis can be performed in remote locations or in places with poor and limited infrastructure ³. These reported characteristics match with the necessities of in field analytical methods for crime scene investigation, like drugs and its adulterants. Adulterants, such as caffeine, procaine and benzocaine ⁴, are usually added by traffickers to mimic the pharmacological effect of the cocaine for raising their profits ^{4,5}. In order to evaluate the presence of an adulterant, procaine, in seized cocaine samples, the current work describes for the first time the development of a simple and accurate wax paper-based analytical method to detect procaine in seized cocaine samples based on diazotization of procaine, followed by a coupling reaction with chromotropic acid under alkaline conditions. The selectivity of the method is enhanced by including an electrochemical sample pre-treatment step.

Experimental Procedures: The device was designed in CorelDRAW® X6 software and fabricated on a filter paper using a Xerox wax printer. The pattern consist of two white circles with a diameter of 8 mm spaced one each other in 1 cm by a wax barrier. The unprinted zone of the first circle was removed using hole punch and was attached in the screen-printed electrode. This region was used as sample zone and to perform the electrochemical pre-treatment, the second 8 mm circle was printed with channel of 2 mm width and 2 cm long containing one spot in the middle for diazotization reaction and the final spot for colorimetric detection (Figure 1A). In the first spot, the sample pretreatment were by application of 1.2 V for 30 min in a 40 μ L droplet containing 0.1 mmol L⁻¹ of the compounds in 0.1 mol L⁻¹ HCl. Besides that, both of the 8 mm spots were closed together and the solution percolates channel passing through a prior spot to conduct the diazotization step (2 μ L NaNO₃ 50 mmol L⁻¹ was previously pipetted), finally reaching the detection step (2 μ L CTA 2 mg L⁻¹ in NaOH 0.4 mol L⁻¹ was previously pipetted) (Figure 1B).

Results and Discussion: All the optimizations an interference study was performed by colorimetric spot-tests in a filter paper with a wax pattern printing. The optimal parameters were sodium nitrite 0.8 mmol L⁻¹, hydrochloric acid 0.1 mol L⁻¹, chromotropic acid (CTA) 2 mg L⁻¹ and sodium hydroxide 0.2 mol L⁻¹. Prior to analysis of the seized cocaine samples, we evaluated the interference of some known adulterants: benzocaine (Ben), phenacetin (Phe), paracetamol (Par), levamisole (Lev), aminopyrine (Amp), and caffeine (Caf). Thus, only Ben caused variations in the color intensity of procaine by more than 3.5%. Therefore, in order to eliminate this interference, an electrochemical pre-treatment was performed (1.2 V for 30 min). Hence, the signal

intensity for procaine was dropped by around 10%, whereas the benzocaine showed a pronounced drop of approximately 96% (Figure 2).

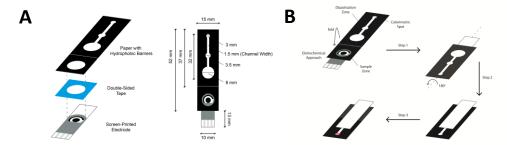


Figure 1. Schematic representation of the fabrication process of lab-on-paper device (A). Schematic procedure to analysis of procaine using a lab-on-paper device (B).

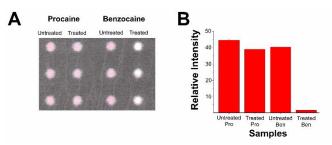


Figure 2. Photograph of the colorimetric response of procaine and benzocaine, before and after electrochemical sample treatment at a concentration of 0.05 mmol L^{-1} under the optimal parameters (A). Graphical plot of relative color intensity for treated and untreated samples (B).

We therefore propose a novel device integrating the entire analytical process, from sample pre-treatment to the reactions, step by step, to form the monitored colored compound. Figure 1B shows the proposed design of this lab-on-a-paper and their use can be seen in the recorded videos after scan the QR codes below, Figure 3.





Figure 3 – QR codes to watch the videos of the device reported. Short url: https://goo.gl/2KDNzc and https://goo.gl/Ia1fWq.

Conclusions: We have demonstrated a simple, portable, low cost, high throughput visual colorimetric paper-based analytical device that can detect procaine in seized cocaine samples. The interference of most common adulterants found in seized cocaine samples was verified, and a novel electrochemical approach was used for sample pre-treatment in order to increase the selectivity. The device has excellent analytical parameters and is promising for field analysis in forensic police intelligence.

References and Acknowledgments:

The authors are grateful for the Brazilian agencies' CAPES (Grant number: 3359/2014 Pró-Forenses Edital 25/2015), FAPESP (Grant number: 2011/19903-5) and CNPq (Grant number: 444498/2014-1) support of this research.

- (1) Salles, M. O.; Meloni, G. N.; de Araujo, W. R.; Paixão, T. R. L. C. Analytical Methods 2014, 6, 2047-2052.
- (2) Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Carrilho, E.; Thomas, S. W.; Sindi, H.; Whitesides, G. M. *Anal Chem* **2008**, 80, 3699-3707.
- (3) Glavan, A. C.; Martinez, R. V.; Subramaniam, A. B.; Yoon, H. J.; Nunes, R. M. D.; Lange, H.; Thuo, M. M.; Whitesides, G. M. *Advanced Functional Materials* **2014**, *24*, 60-70.
- (4) Cole, C.; Jones, L.; McVeigh, J.; Kicman, A.; Syed, Q.; Bellis, M. Drug Test Anal 2011, 3, 89-96.
- (5) de Araujo, W. R.; Maldaner, A. O.; Costa, J. L.; Paixão, T. R. L. C. *Microchemical Journal* **2015**, *121*, 213-218.

One-step formation of nanoscale liposomes and lipoplexes via continuous-flow microfluidics

<u>Tiago A. Balbino</u>, Juliana M. Serafin, Allan Radaic, Marcelo B. de Jesus, Lucimara G. de la Torre

tiago.albertini@gmail.com; jmtserafin@gmail.com; allan.radaic@gmail.com; dejesusmb@gmail.com; latorre@feq.unicamp.br;

Abstract: In this work, a continuous-flow microfluidic platform was designed to generate in one-step cationic liposomes (CLs) and their subsequent lipoplexes for gene therapy in a two-stage configuration. The devices were fabricated by soft lithography techniques using replication masters of dry film photoresist, which obviates the use of clean-room. The lipoplexes exhibited appropriate physicochemical characteristics under varying conditions of flow rate-ratio (FRR), total volumetric flow rate (Q_T), and DNA content. The CLs were able to condense and retain the pDNA into the structures with sizes ranging from 140 nm to 250 nm. In vitro transfection assays showed that the lipoplexes prepared by the microfluidic device achieved similar efficiencies than lipoplexes prepared by conventional processes, in which each step comprises a series of manual operations. The integrated microfluidic platform generates nanocarriers by combining in-line regions for CLs formation and lipoplexes assembly, reducing significantly the number of steps usually required by conventional processes.

Keywords: microfluidics, DNA, liposomes, lipoplexes, nanocarriers

Introduction: Gene therapy has long been investigated for the treatment of inherited and acquired diseases. It is based on the insertion of an engineered, foreign genetic material into specific cells to substitute missing genes, replace defective genes, or silencing gene expression [1]. Among a variety of nanostructured materials employed to condense and protect the genetic material against enzymatic degradation, the use of liposomes as gene carriers still is a popular strategy. Liposomes are vesicular systems composed of (phospho)lipids containing at least one lipid bilayer surrounding an aqueous core. Current processes for the preparation of liposomes generate large, polydisperse vesicles that require a post-processing step to reduce the size and size polydispersity of liposome populations [2]. For gene delivery applications, cationic lipids in the lipid mixture enable the formation of cationic liposomes (CLs) that can interact electrostatically with nucleic acids to form lipoplexes. The standard process of lipoplex formation relies on the electrostatic assembly of the pre-formed CLs with the genetic material by mixing the two species via manually up-and-down pipetting or vortexing. Under certain conditions, these methods usually have limited scalability and might generate lipoplexes with inappropriate characteristics for biological studies, mainly due to the heterogeneous and uncontrolled fluid flows [3]. Microfluidic platforms not only can generate monodisperse nanocarriers but can also integrate a variety of sequential steps needed for the formation of liposomes and electrostatic complexes with genetic material. In the present work, an integrated microfluidic platform is employed for the formation of gene nanocarriers by combining in-line regions for liposome synthesis and lipoplexes assembly in a continuous flow. Thus, a single microfluidic device produced lipoplexes with similar physicochemical characteristics and biological behavior to those of lipoplexes obtained by conventional bulk procedures.

Experimental: The microfluidic channels were fabricated in polydimethylsiloxane (PDMS) substrates via soft lithography techniques employing dry film photoresist molds, which use simple experimental procedures and obviates the use of the clean room. Figure 1 illustrates the two-stage microfluidic device with two hydrodynamic flow focusing regions arranged in series. To fabricate the microchannel molds, two layers of the dry film photoresist with approximately 35 μm thick each (Riston MM115i, DuPont, Research Triangle Park, NC) were laminated onto a glass slide. After the UV exposure, the dry film substrate was developed with sodium carbonate solution (1 wt%). The PDMS layers and glass slides were sealed via surface plasma oxidization using a conventional microwave oven. All the channels had a rectangular-like cross section with a depth of 70 μm and a width of 80 μm. CL 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) and prepared via microfluidics and dry-film/extrustion techniques [3, 4]. The plasmid model encoding enhanced green fluorescent protein (EGFP) was purified using the PureLink HiPure Plasmid DNA Purification Kit-Maxiprep (Invitrogen, MD). The average hydrodynamic diameter and size distribution were measured by dynamic light

scattering (DLS) (Malvern). Morphological characterization of the liposomes and lipoplexes prepared by the two-stage configuration was performed using transmission electron microscopy. The *in vitro* evaluation of gene delivery efficiency and cytotoxicity of lipoplexes was carried out by flow cytometry using prostate cancer PC3 and human cervical cancer (HeLa) cell lines.

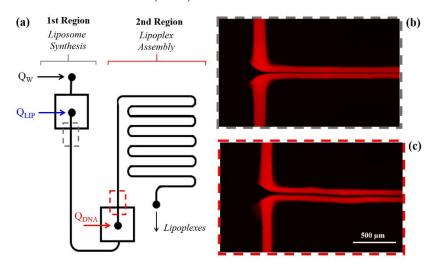


Figure 1. (a) Two-stage configuration with two consecutive flow-focusing regions. In the first region, the CL synthesis occurs with the mixing between the aqueous side-streams and the center stream containing the lipid mixture in ethanol. In the second region, the pre-formed liposome streams hydrodynamically focus the pDNA-containing stream, enabling the incubation and stabilization of lipoplexes. Fluorescence micrographs of the flow-focusing of the (b) first region for liposome synthesis obtained at FRR 10 and Q_T 150 μL/min, and of the (c) second region for lipoplex assembly at FRR 3 and center stream at 47 µL/min.

Results and Discussion: The influences of the parameters flow-rate ratio (FRR) and total volumetric throughput (Q_T) were evaluated on the size and surface charge properties of liposomes and lipoplexes prepared in the twostage microfluidic device. Liposomes formed in the first region of the device exhibited hydrodynamic diameters weighted by intensity in the range of 140 to 175 nm for both studied Q_T, whereas the polydispersity indexes of liposomes were significantly unaffected by FRR and Q_T variations. Lipoplexes with hydrodynamic diameters from 170 to 230 nm exhibited an increase in the average size compared to the liposomes, which is due to the rearrangement of the unilamellar structures after the previously formed vesicles interact with the pDNA [3]. The increase in pDNA content in the lipoplexes, represented by the molar charge ratio between positive and negative charges (R_±), slightly increased the hydrodynamic diameter, corroborating previous reports on the bulk-mixing formation of lipoplex [3]. Morphological studies of liposomes and lipoplexes showed relatively small and homogeneous populations that are in agreement with the DLS results. DNA retardation assay showed the ability of lipoplexes to retain the pDNA into the liposomal structures under the studied conditions. To verify whether the alcohol traces present in the final formulation of lipoplexes affect the in vitro cell viability, approximately 10% (v/v) of ethanol was added to extruded liposomes and assessed in Hela and PC3 cells. Cells treated with lipoplexes prepared by microfluidics and bulk procedures with or without ethanol presented significantly similar levels of cytotoxicity (approximately 80% of viable cells). Finally, the biological efficacy of lipoplexes to delivery genes into cells showed that conventional and microfluidic processes exhibited significantly similar transfection levels, highlighting the feasibility of the microfluidic platform to prepare lipid-based gene nanocarriers with significantly reduced number of steps.

Conclusion: In the present work, for the first time, it has been employed an integrated, continuous-flow microfluidic device with two distinct regions for the one-step preparation of lipoplexes with suitable physicochemical properties and biological activity for gene therapy applications. It was possible to use low-cost techniques to fabricate the devices that successfully generated lipoplexes and liposomes, besides the roughness of microchannel features differed from master molds prepared in clean-room procedures. The microfluidic process developed here generated lipoplexes whose transfection efficiency was similar to those obtained via the bulk-mixing process, reducing considerably the number of manual operations and required equipment.

Acknowledgments: This work was financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Grants No. 2012/23143-9, 2013/05868-9, and 2013/14925-6).

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 **32**, 1799 (2016).
- [4] Balbino et al., Chemical Engineering Journal 226, 423 (2013).