



**Ana Catarina Corceiro Vaz**

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

## **DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR DE ADN INTEGRADO NUM CHIP DE MICROFLUÍDICA**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: Hugo Manuel Brito Águas, Prof. Doutor, FCT-UNL

Co-Orientador: Iwona Anna Bernacka-Wojcik, Mestre, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca

Arguente: Prof. Doutora Valentina Borissovna Vassilenko

Vogal: Prof. Doutor Hugo Manuel Brito Águas

Mestre Iwona Anna Bernacka-Wojcik



**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR  
DE ADN INTEGRADO  
NUM CHIP DE MICROFLUÍDICA**

Orientador: Prof. Hugo Águas

Co-orientador: Mestre Iwona Bernacka-Wojcik

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Departamento de Física  
Faculdade de Ciências e Tecnologia  
Universidade Nova de Lisboa

Junho de 2012



# **DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR DE ADN INTEGRADO NUM CHIP DE MICROFLUÍDICA**

Copyright ©2012 – Todos os direitos reservados. Ana Catarina Corceiro Vaz. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## RESUMO

Os biossensores têm vindo a captar elevado interesse devido à necessidade dos laboratórios de diagnóstico em disporem de métodos de análise rápidos, precisos e pouco dispendiosos.

Nesse contexto, esta dissertação aborda o desenvolvimento de um biossensor de microfluídica para detecção colorimétrica de ADN, constituído por um chip de microfluídica inserido numa plataforma optoelectrónica.

O método de detecção é baseado no comportamento colorimétrico de uma solução de nanopartículas de ouro funcionalizadas com sequências simples de ADN, com a adição de sal. Quando há complementaridade, as nanopartículas não agregam, mantendo-se a solução com a mesma coloração vermelha (teste positivo), caso contrário, há agregação e a solução torna-se azul (teste negativo).

O dispositivo de microfluídica foi fabricado em PDMS por *replica molding*, recorrendo a moldes de SU-8 produzidos por fotolitografia. O processo de microfabricação foi optimizado de forma a obter moldes com elevado rácio entre área e espessura das estruturas e a manter a perfeita reprodutibilidade das réplicas (introdução de um molde intermédio de epóxi).

Este dispositivo foi inserido numa plataforma optoelectrónica constituída por uma fonte de luz (LED) e um fotodetector (fotodíodo), integrados através de fibras ópticas, onde foram testadas várias geometrias e configurações de chips.

Os resultados mostram que este biossensor detecta mudanças colorimétricas para caminhos ópticos de 10 mm (451 nL) até 0,5 mm (315 nL), sendo que a discriminação das duas soluções aumenta com o percurso óptico. Os melhores resultados foram obtidos para um percurso óptico de 4 mm, para o qual se obtém uma clara distinção de soluções com necessidade de apenas 365 nL para encher o microcanal.

A simplicidade dos métodos e materiais utilizados, incluindo a possibilidade de reduzir bastante o volume de reagentes, traduzem-se numa contribuição relevante deste dispositivo no âmbito dos métodos de detecção de ADN.

**Palavras-chave:** Biossensores de ADN, Microfluídica, Detecção colorimétrica, Nanopartículas de ouro, Plataforma optoelectrónica





## ABSTRACT

The Biosensors have gained a lot of interest due to the necessity of diagnostic laboratories to have rapid, accurate and inexpensive analysis methods.

In this context, this dissertation presents the development of a microfluidic biosensor for colorimetric DNA detection, composed by a microfluidic chip inserted in an optoelectronic platform.

The detection method is based on the colorimetric behavior of a solution with gold nanoparticles functionalized with single strand DNA, after salt addition. In case of complementarity, gold nanoparticles don't aggregate, remaining the solution with its original red color (positive test); otherwise aggregation occurs and the solution turns blue (negative test).

The microfluidic device was fabricated in PDMS by replica molding, using SU-8 molds made by photolithography. The microfabrication process was optimized in order to obtain high-aspect-ratio molds and keeping the perfect reproducibility of the replicas (introduction of an intermediate epoxy mold).

This device was inserted in an optoelectronic platform formed by a light source (LED) and a photodetector (photodiode), integrated through optical fibers, where various geometries and configurations of chips were tested.

The results show that this biosensor detects colorimetric changes for optical path length from 10 mm (451 nL) to 0,5 mm (315 nL), while the discrimination between the two solutions increase with the optical path length. The best compromise was obtained for 4 mm of optical path where there is a clear distinction of solutions, with only 365 nL of solution needed to fill out the microchannel.

The simplicity of materials and methods needed, including the possibility of a significant reduction of reagents, represents a relevant contribution of this device in the field of DNA detection methods.

**Key-words:** DNA biosensors, Microfluidics, Colorimetric detection, Gold nanoparticles, Optoelectronic platform



## AGRADECIMENTOS

Este trabalho de dissertação não teria sido possível sem o apoio de muita gente, tanto a nível científico como emocional, às quais não poderia deixar de expressar o meu sincero agradecimento.

Ao meu orientador, Professor Hugo Águas, pela oportunidade que me deu de integrar neste projecto. Pela transmissão de conhecimentos, disponibilidade e sugestões.

Em segundo lugar, o mais profundo agradecimento à Mestre Iwona Bernacka-Wojcik, minha co-orientadora, por todos os ensinamentos, disponibilidade, ajuda, e sobretudo pela amizade demonstrada.

À Professora Elvira Fortunato, que me deu a oportunidade de desenvolver a Dissertação de Mestrado no CENIMAT/CEMOP.

Ao Professor Rodrigo Martins, pela disponibilização dos laboratórios e equipamentos do CEMOP – UNINOVA.

Ao Professor Paulo Lopes da Universidade de Aveiro pela transmissão de conhecimentos na área da optoelectrónica, e ao Professor Pedro Baptista do Departamento de Ciências da Vida, FCT-UNL, responsável pela parte de nanodiagnóstico.

À Ana Paula, ao Ricardo e ao Eli, pela companhia e apoio na última fase de testes.

A todos os Biocolegas e aos grandes amigos que fiz ao longo do meu percurso académico, pelo companheirismo, amizade e muitos “abanões”. Sem eles, com certeza que estes últimos anos não teriam sido tão marcantes.

Aos meus Queridos e Queridas de sempre, por fazerem valer a pena cada quilómetro de regresso a casa, mostrando que por mais distantes que estejamos a amizade vai sempre prevalecer.

E como os últimos são sempre os primeiros, um grande obrigado à minha família. À minha irmã, Maria Rita, por toda a confiança que deposita em mim. Ao meu pai, Victor, por ter sido sempre uma fonte de inspiração, pela sua visão e inteligência. E por fim à minha super mãe, Maria da Glória, pelo amor e apoio incondicionais, a ela devo tudo o que hoje sou.



# ÍNDICE

<b>Resumo</b> .....	vii
<b>Abstract</b> .....	ix
Agradecimentos.....	xi
Lista de figuras .....	xv
Lista de Tabelas .....	xix
Lista de Acrónimos.....	xxi
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>1.1. Estado da arte</b> .....	1
<b>1.2. Objectivo</b> .....	2
<b>2. Fundamentos Teóricos</b> .....	3
<b>2.1. Biossensores</b> .....	3
<b>2.2. Biossensores de ADN</b> .....	4
<b>2.2.1. Ácido Desoxirribonucleico (ADN)</b> .....	4
<b>2.2.2. Métodos de detecção e análise de ADN</b> .....	5
<b>2.2.3. Nanopartículas de Ouro e Detecção colorimétrica de ADN</b> .....	6
<b>2.3. Microfluídica</b> .....	10
<b>2.3.1. A Física da Microfluídica</b> .....	10
2.3.1.1. Número de Reynolds.....	11
2.3.1.2. Difusão .....	12
2.3.1.3. Resistência Hidráulica.....	12
2.3.1.4. Tensão Superficial.....	12
<b>2.3.2. Dispositivos de Microfluídica</b> .....	13
2.3.2.1. Polímeros .....	13
<b>2.4. Detecção colorimétrica de ADN em Microfluídica</b> .....	14
<b>3. Desenvolvimento do chip de Microfluídica</b> .....	17
<b>3.1. Materiais</b> .....	17
<b>3.1.1. SU-8</b> .....	17
<b>3.1.2. PDMS</b> .....	18
<b>3.2. Técnicas de Microfabricação</b> .....	19
<b>3.2.1. Fotolitografia</b> .....	20
<b>3.2.2. Litografia Suave</b> .....	21
<b>3.2.3. Tratamento de superfícies por Plasma</b> .....	22
<b>3.3. Técnicas de Caracterização</b> .....	22
<b>3.3.1. Microscopia Óptica</b> .....	22
<b>3.3.2. Perfilometria de contacto</b> .....	22
<b>3.3.3. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)</b> .....	22
<b>3.3.4. Espectrofotometria de Absorção UV-Visível</b> .....	23

<b>3.4. Processamento do chip</b> .....	23
<b>3.4.1. Fabricação do Molde em SU-8</b> .....	24
3.4.1.1. Máscara .....	24
Configuração das lentes .....	25
Designação dos chips .....	28
3.4.1.2. Fotolitografia em SU-8 .....	28
<b>3.4.2. Produção de Réplicas em PDMS</b> .....	31
<b>3.4.3. Molde Intermédio em Resina Epóxi</b> .....	31
<b>3.4.4. Selagem</b> .....	31
<b>3.5. Integração na plataforma optoelectrónica</b> .....	32
3.5.1. Inserção das fibras ópticas .....	33
3.5.2. Procedimento para as medições .....	33
<b>4. Resultados do Processo de Microfabricação</b> .....	35
<b>4.1. Optimização da microfabricação com SU-8</b> .....	35
4.1.1. Tensão interna .....	35
4.1.2. Aderência .....	35
4.1.3. Espessura vs. Velocidade de <i>spin coating</i> .....	37
<b>4.2. Caracterização</b> .....	38
4.2.1. Caracterização da superfície .....	38
4.2.2. Caracterização do perfil das estruturas .....	40
<b>4.3. Resina Epóxi</b> .....	42
<b>4.4. Propriedades ópticas do PDMS</b> .....	43
<b>4.5. Dispositivo selado</b> .....	43
<b>5. Resultados dos Testes de Detecção</b> .....	47
5.1. Espectro de Absorção .....	48
5.2. Testes de detecção com soluções coloidais de nanopartículas de ouro .....	49
5.2.1. Variação do comprimento do percurso óptico .....	50
5.2.2. Introdução de lentes .....	52
5.3. Espectrofotómetro vs. chip de microfluídica fabricado .....	54
<b>6. Conclusão</b> .....	57
6.1. Trabalho futuro .....	58
<b>7. Bibliografia</b> .....	61

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> – Sistema portátil para detecção colorimétrica de uma sequência de ADN. Adaptado de [2].	1
<b>Figura 2.1</b> - Esquema representativo das diferentes estruturas celulares. É no núcleo que se encontra o material genético responsável pela expressão dos diferentes genótipos. Adaptado de [7].	4
<b>Figura 2.2</b> - Cadeia simples de ADN (A) e cadeia dupla de ADN com representação das ligações entre bases azotadas complementares (B), após hibridação. O grupo fosfato é representado pela estrutura amarela, a desoxirribose pela estrutura verde e a base azotada pela estrutura azul. Adaptado de [7].	5
<b>Figura 2.3</b> – Coloração das soluções de nanopartículas de ouro consoante o seu diâmetro. Adaptado de [19].	7
<b>Figura 2.4</b> – Representação esquemática do fenómeno de plasmónica de ressonância. Adaptado de [23].	7
<b>Figura 2.5</b> – Método <i>crosslinking</i> para detecção de sequências de ADN. Na presença de ADN-alvo complementar, as sondas de ADN-AuNP agregam, resultando na alteração das cor da solução de vermelho para azul. Adaptado de [24].	8
<b>Figura 2.6</b> – Método de <i>non crosslinking</i> para detecção de sequências de ADN. Recurso a uma sonda de ADN (nanopartícula de ouro funcionalizada com ADN) que, aquando da adição de sal e na presença de sequências alvo de ADN complementar, não sofrem agregação, mantendo a coloração vermelha. Caso não haja ADN complementar, as sondas agregam, tornando a solução azul. Adaptado de [29].	9
<b>Figura 2.7</b> – Espectro de absorvância dos dois tipos de soluções de ADN e nanopartículas de ouro: positiva e negativa, no método de <i>non-crosslinking</i> (no método de <i>crosslinking</i> as colorações são opostas). Adaptado de [26].	10
<b>Figura 3.1</b> – Estrutura química do oligómero da epóxi Bisphenol A Novolak contida nas formulações de SU-8. Oito grupos epóxi reactivos permitem um elevado grau de polimerização depois da fotoactivação. Adaptado de [42].	17
<b>Figura 3.2</b> – Espessura da camada de diferentes fotorresistes do grupo do SU-8 2000 em função da velocidade de rotação da deposição ( <i>Microchem, USA</i> ).	18
<b>Figura 3.3</b> – Estrutura química do PDMS. Adaptado de [43].	18
<b>Figura 3.4</b> – Diferença entre fotorresiste positivo e negativo. Adaptado de [46].	20
<b>Figura 3.5</b> – Esquemático da técnica de litografia suave – <i>Replica molding</i> . Adaptado de [47].	21
<b>Figura 3.6</b> – Processos de Fabricação do chip de microfluidica: (a) fotolitografia em SU-8, (b) revelação, (C) replicação do negativo do molde através da polimerização de PDMS, (D) selagem do PDMS com vidro através de plasma de oxigénio. Adaptado de [34].	23
<b>Figura 3.7</b> – (A) <i>design</i> presente na máscara de crómio utilizada na fotolitografia, com as diversas configurações de chips; (B) Chip único em que (1) e (2) representam a entrada e	

saída de fluido, respectivamente; (3) é a zona de detecção e (4) e (5) são inserções de fibras ópticas. ....	24
<b>Figura 3.8</b> – Imagem a três dimensões do chip de microfluídica projectado. ....	25
<b>Figura 3.9</b> – <i>Design</i> da configuração sem lentes. ....	25
<b>Figura 3.10</b> – Configuração 1 de lentes de entrada e respectivos parâmetros. ....	26
<b>Figura 3.11</b> – Configuração 2 de lentes de entrada e respectivos parâmetros. ....	26
<b>Figura 3.12</b> – Configuração 3 de lentes de entrada e respectivos parâmetros. ....	27
<b>Figura 3.13</b> – Configuração das lentes de saída e respectivos parâmetros. ....	27
<b>Figura 3.14</b> – LED ( <i>Fiber pigtailed LED – High brightness</i> ). ....	32
<b>Figura 3.15</b> – Fotodetector FDSP625 e respectiva resposta espectral. ....	33
<b>Figura 3.16</b> – Microchip com agulha no canal de entrada e tubo capilar no canal de saída, com as fibras já inseridas. ....	33
<b>Figura 3.17</b> – Procedimento para as medições. (A) LED verde, (B) LED vermelho. ....	34
<b>Figura 4.1</b> – Imagem obtida por SEM que ilustra a aderência da estrutura de SU-8 ao substrato de silício. Este SU-8 teve uma dose de exposição de 330 mJ/cm <sup>2</sup> . ....	36
<b>Figura 4.2</b> – Imagens microscópicas das lentes de saída nas várias etapas de fabricação: máscara (A), molde de SU-8 (B) e PDMS (C). ....	38
<b>Figura 4.3</b> – Imagens microscópicas de malformações obtidas nos moldes de SU-8 (A) e em alguns chips de PDMS (B) e (C). ....	39
<b>Figura 4.4</b> – Imagens obtidas por SEM das estruturas e superfície em PDMS. ....	39
<b>Figura 4.5</b> – Imagens obtidas pelo microscópio óptico (A) e por SEM (B) que ilustram a verticalidade e homogeneidade das estruturas de SU-8. ....	40
<b>Figura 4.6</b> – Perfil de uma estrutura de SU-8 obtida através de análise por perfilómetro. ....	41
<b>Figura 4.7</b> – Imagem microscópica do perfil de um canal de microfluídica em PDMS. ....	41
<b>Figura 4.8</b> – Imagens microscópicas de topo das estruturas fabricadas. O molde de SU-8 (A) foi utilizado para fabricar o primeiro PDMS (B), que serviu para produzir o molde de resina epóxi (C) para produção em massa de novas estruturas em PDMS (D). Como se pode verificar não houve alteração das conformações originais. Este estudo foi realizado com outra máscara fotolitográfica para fabricação de micromisturadores, uma vez que contem estruturas mais pequenas, requerendo maior resolução. ....	42
<b>Figura 4.9</b> – Espectro de transmitância de camadas de PDMS com várias espessuras. ....	43
<b>Figura 4.10</b> – Chip de microfluídica preenchido com corante de forma a testar presença de fugas. ....	44
<b>Figura 4.11</b> – Imagens microscópicas que mostram o correcto posicionamento da fibra no chip de microfluídica. A imagem (A) representa o início da ranhura e a (B) o final da ranhura com lente. ....	44
<b>Figura 4.12</b> – Chip de microfluídica fabricado. ....	45
<b>Figura 5.1</b> – Gráfico representativo da largura do feixe originado pela fibra óptica em função dos percursos ópticos presentes nos chips de microfluídica fabricados. ....	47



<b>Figura 5.2</b> – Representação esquemática da propagação da radiação num chip com percurso óptico de 0,5 mm.....	48
<b>Figura 5.3</b> – Espectros de absorção obtidos para as soluções de AuNP utilizadas nos testes dos microchips.....	49
<b>Figura 5.4</b> – Resultados da variação do comprimento do percurso óptico. Medições feitas em tensão com recurso ao multímetro.....	50
<b>Figura 5.5</b> – Resultados da variação do comprimento do percurso óptico. Medições feitas em corrente com recurso ao picoamperímetro. ....	51
<b>Figura 5.6</b> – Gráficos correspondentes às medições efectuadas com o multímetro e com o pico amperímetro. ....	52
<b>Figura 5.7</b> – Propagação do feixe luminoso num chip de microfluídica com recurso a lentes. Imagem à esquerda: microlente biconvexa de PDMS (configuração 2) de entrada com LED verde; imagem da direita: lentes de saída com utilização do LED vermelho. ....	53
<b>Figura 5.8</b> – Resultados obtidos para diferentes configurações de chips com 2 mm de percurso óptico: sem lentes, microlente bicôncava de PDMS (Conf. 1) e microlente biconvexa de ar (Conf. 2).....	53
<b>Figura 5.9</b> – Variação dos rácios para o espectrofotómetro e para o microchip com percurso óptico de 10 mm.....	54



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> – Tipos de transdutores mais utilizados em biossensores, e respectivos exemplos. Adaptado de [3]. .....	3
<b>Tabela 3.1</b> – Chips fabricados com largura de canal de detecção de 100 $\mu$ m. ....	28
<b>Tabela 3.2</b> – Chips fabricados com largura de canal de detecção de 200 $\mu$ m. ....	28
<b>Tabela 3.3</b> – Descrição dos procedimentos e variação de parâmetros nos vários testes de microfabricação efectuados. ....	30
<b>Tabela 4.1</b> – Imagens microscópicas das estruturas de SU-8 com diferentes doses de exposição. ....	36
<b>Tabela 4.2</b> – Espessuras obtidas para os vários testes com SU-8. ....	37
<b>Tabela 5.1</b> – Volumes de solução necessários para preencherem o canal de detecção em função do comprimento do seu percurso óptico. ....	51



## LISTA DE ACRÓNIMOS

**ADN** Ácido Desoxirribonucleico

**AuNP** Nanopartículas de ouro

**PDMS** Polidimetilsiloxano

**LED** *Light-Emitting Diode*, Díodo Emissor de Luz

**CAD** *Computer-aided design*, Desenho Assistido por Computador

**SEM** *Scanning Electron Microscope*, Microscopia Electrónica de Varrimento

**HAR** *High-aspect-ratio*, coeficiente de esbeltez



# 1. INTRODUÇÃO

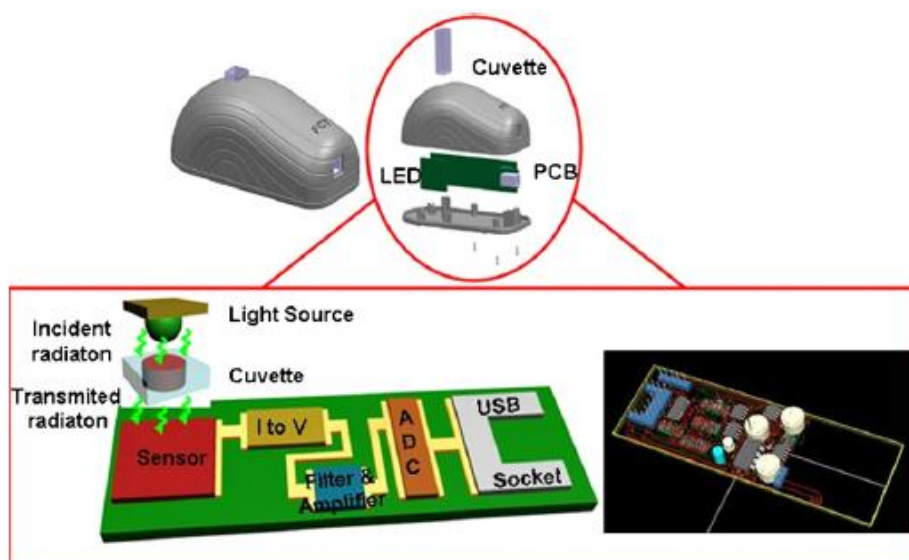
## 1.1. ESTADO DA ARTE

O crescente número de doenças causadas por defeitos genéticos tem impulsionado o desenvolvimento de muitos métodos de detecção de sequências específicas de ADN.

Hoje em dia, os métodos mais utilizados para de detecção de sequências específicas de ADN são baseados em fluorescência. De uma forma geral, a detecção é feita através da medição de luz emitida pelos marcadores fluorescentes ligados à molécula de ADN. Estes métodos, para além de complexas, são dispendiosos, lentos e necessitam de grande quantidade de biomolécula [1].

Contudo, os laboratórios de diagnóstico médico têm uma grande necessidade de dispositivos simples que permitam análises precisas, rápidas e pouco dispendiosas. Por isso, em alternativa ao método referido, tem sido bastante explorada a detecção colorimétrica de ADN recorrendo às propriedades ópticas das dispersões de nanopartículas de ouro. Este tipo de detecção é bastante mais simples, uma vez que pode ser feita a olho nu ou recorrendo a um espectrofotómetro, sem necessidade de grandes e complexos aparelhos, uma vez que se baseia na alteração de cor das soluções.

Com os grandes progressos das tecnologias de detecção recorrendo a nanomateriais, têm sido criados modernos sensores biomédicos, bastante fiáveis e económicos, com a particularidade de serem portáteis. Na Figura 1.1 está representado um dispositivo portátil para detecção colorimétrica de ADN.



**Figura 1.1** – Sistema portátil para detecção colorimétrica de uma sequência de ADN. Adaptado de [2].

Neste sistema (Figura 1.1), a detecção de ADN por colorimetria é feita através do comportamento de uma solução nanopartículas de ouro, funcionalizadas com sequências específicas de ADN (sondas) na presença de sequências de ADN, aquando da adição de sal. Neste processo é necessário um volume de 60  $\mu$ l [2].

Miniaturizar sistemas como este, para além de possibilitar uma redução da quantidade de amostra necessária para análise, permite também de integrar, no mesmo sistema, outros processos como mistura dos reagentes (sal e ADN), hibridação e amplificação, reduzindo assim o erro humano e contaminações. É neste contexto que surge a microfluídica.

## **1.2. OBJECTIVO**

Pretendeu-se com esta dissertação de mestrado desenvolver um dispositivo de microfluídica para detecção colorimétrica de ADN.

O método de detecção utilizado consiste na alteração colorimétrica de dispersões coloidais de nanopartículas de ouro, soluções que mimetizam as propriedades ópticas dos resultados positivo e negativo da detecção de ADN baseada em nanopartículas de ouro funcionalizadas com ADN.

O dispositivo desenvolvido foi depois integrado numa plataforma optoelectrónica constituída por uma fonte luminosa e um fotodetector, conectados por fibra óptica inserida no chip de microfluídica. Várias configurações de chips foram testadas, com diferentes percursos ópticos e recurso a diferentes conjuntos de lentes, de forma a otimizar a biodetecção.

Este trabalho estava inserido num projecto de investigação financiado pelo laboratório associado I3N e decorreu no CEMOP-UNINOVA e CENIMAT. Esse projecto é bastante multidisciplinar, requerendo conhecimentos e competências em ciência dos materiais, microfabricação, óptica, biologia e nanotecnologia. As competências da área de óptica ficaram a cargo do Prof. Paulo Lopes (Universidade de Aveiro) e as de biologia e nanotecnologia pelo Prof. Pedro Baptista (Nanotheranostics@CIGMH FCT/UNL).



## 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.1. BIOSSENSORES

Actualmente, o desenvolvimento de biossensores é um campo em grande expansão, que combina conhecimentos e competências de ciências fundamentais, como a biologia, a química e a física, com a engenharia e a informática, de modo a satisfazer as necessidades de diversas áreas de aplicação [3]. Um biossensor é então definido como um dispositivo analítico que combina a alta especificidade e sensibilidade de um elemento biológico com um transdutor, de modo a produzir um sinal quantificável do composto analisado. É medida uma alteração no meio biológico analisado (como concentrações dos elementos do meio, produção de substâncias, propriedades térmicas e ópticas) [4], o sinal resultante pode ser depois amplificado, processado e gravado para uma melhor análise [1].

Leland C. Clark Jr. é conhecido como o pai do conceito “biossensor” desde que, em 1956, apresentou o primeiro verdadeiro biossensor, o eléctrodo de oxigénio. Este biossensor, quando modificado com enzimas, viria a evoluir para um meio de detecção de glucose, começando a ser comercializado em 1972 pela *Yellow Springs Instruments* [3, 5]. Desde então, rapidamente foi notado que um grande número de combinações de transdutores e bioreceptores poderia ser feito. O nome do biossensor fica dependente do tipo de componente que se analisa, que usualmente são enzimas, ácidos nucleicos, receptores celulares, anticorpos ou células [3]. Na tabela 2.1 estão descritos os tipos de transdutores mais utilizados em biossensores.

**Tabela 2.1** – Tipos de transdutores mais utilizados em biossensores, e respectivos exemplos. Adaptado de [3].

Transdutor	Exemplos
Electroquímico	Eléctrodo de Clark, Eléctrodos mediados, ISEs, dispositivos baseados em FETs, LAPS
Óptico	Fotodíodos, sistemas de guias de ondas, dispositivos ópticos integrados
Piezoeléctrico	Cristais de quartzo, dispositivos SAW
Calorimétrico	Termistor, termopilha
Magnético	Efeito de Hall, magneto-resistivo
Micromecânico	Viscosidade, pressão, força e consolas de oscilação
ISEs, eléctrodos selectivos de iões; FET, transístor de efeito campo; LAPS, <i>light-addressable potentiometric sensors</i> ; SAW, ondas acústicas de superfície.	

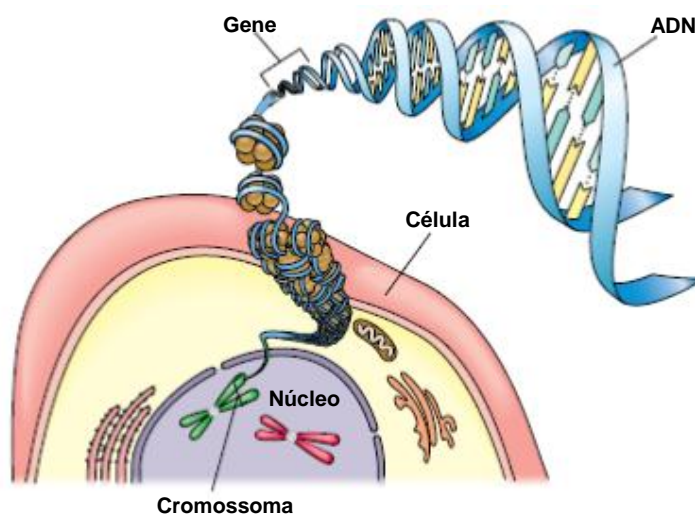
Os biossensores têm aplicações em áreas como o diagnóstico médico, monitorização do meio-ambiente e indústria alimentar, e a sua principal característica é tornar os métodos de análise rápidos e de baixo custo. Têm sido feitos esforços para tornar estes sistemas em tecnologias *point-of-care*, de modo a aumentar a eficiência, portabilidade e simplicidade das análises. Apesar das grandes vantagens oferecidas pelos biossensores, poucos sensores de ADN têm conseguido entrar com sucesso nos mercados. Este facto deve-se aos parâmetros críticos a que têm de ser sujeitos como o custo associando a cada teste, controlo de qualidade, desenho da instrumentação e selecção dos parâmetros de teste [5].

## 2.2. BIOSSENSORES DE ADN

O crescente aumento do mercado de diagnóstico molecular, provocado pela sequenciação da informação genética, trouxe a necessidade de desenvolver dispositivos de análise simples, rápidos, pouco dispendiosos e reproduzíveis em massa, de modo a descentralizar os testes de ADN [1].

### 2.2.1. ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)

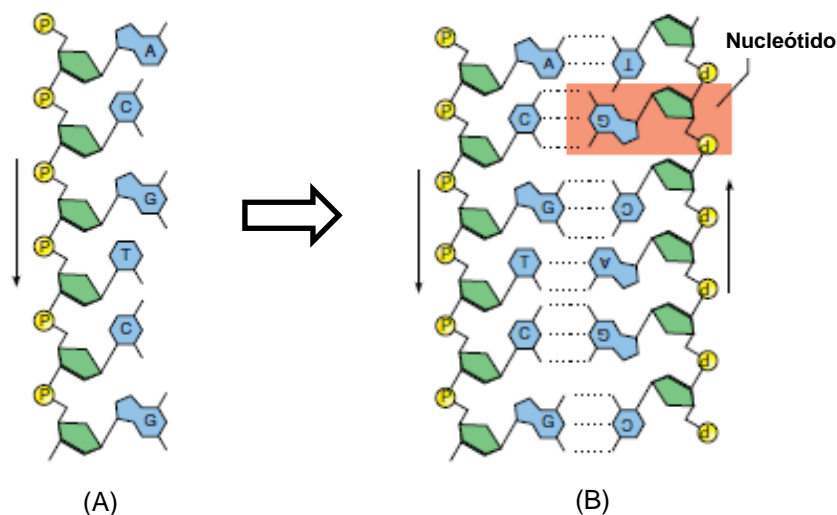
O ADN é, provavelmente, a mais importante de todas as biomoléculas existentes, uma vez que contém toda a informação genética, individual, de um organismo. É, por isso, uma excelente fonte de informação acerca de evolução, características e mutações do organismo [6]. Como se pode observar na Figura 2.1, o ADN constitui os genes, que na sua forma mais compacta formam cromossomas e estão localizados no núcleo das células, para que seja transferida toda a informação genética para as células-filhas aquando da replicação celular. Fica assim garantido que todas as células do organismo possuam todo o material genético do indivíduo [7].



**Figura 2.1** - Esquema representativo das diferentes estruturas celulares. É no núcleo que se encontra o material genético responsável pela expressão dos diferentes genótipos. Adaptado de [7].

Em 1953, James Watson e Francis Crick descobriram que a molécula de ADN tem a forma de uma hélice dupla, constituída por duas cadeias lineares de nucleótidos, “entrelaçadas” entre si. O nucleótido é a unidade básica de cada cadeia, sendo este formado por uma desoxirribose (açúcar), um grupo fosfato e uma base azotada [8].

Existem quatro bases azotadas no ADN: adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T). Estas bases são complementares e emparelham-se entre si – a adenina à timina e a citosina à guanina – graças à formação de ligações de hidrogénio entre elas. A este fenómeno dá-se o nome de hibridação e é a razão da não aleatoriedade da união das duas cadeias [9, 10]. Como se pode observar na Figura 2.2, a hibridação é sempre feita com as cadeias em sentidos opostos uma vez que estas são antiparalelas.



**Figura 2.2** - Cadeia simples de ADN (A) e cadeia dupla de ADN com representação das ligações entre bases azotadas complementares (B), após hibridação. O grupo fosfato é representado pela estrutura amarela, a desoxirribose pela estrutura verde e a base azotada pela estrutura azul. Adaptado de [7].

A informação genética fica assim codificada pela sequência linear de bases de ADN, havendo inúmeras combinações possíveis [9].

### 2.2.2. MÉTODOS DE DETECÇÃO E ANÁLISE DE ADN

A detecção e análise de ADN tornou-se uma ferramenta indispensável para várias aplicações biomédicas. A compreensão do perfil de expressão génica, o diagnóstico e tratamento de algumas doenças provocadas por defeitos genéticos, a detecção de agentes patogénicos e análises forenses são alguns dos exemplos dessas aplicações [11]. Por esta razão, há uma grande exigência em termos de especificidade e sensibilidade associados a estes métodos.

O ADN é especialmente adequado para aplicação em biossensores devido ao seu grande potencial de reconhecimento molecular. Ao contrário das enzimas e anticorpos, o ADN forma ligações facilmente sintetizáveis, extremamente estáveis e reutilizáveis após desnaturação. Por esta razão e devido à sua grande simplicidade, os métodos convencionais para detecção de sequências de ADN baseiam-se neste princípio [1, 5, 12].

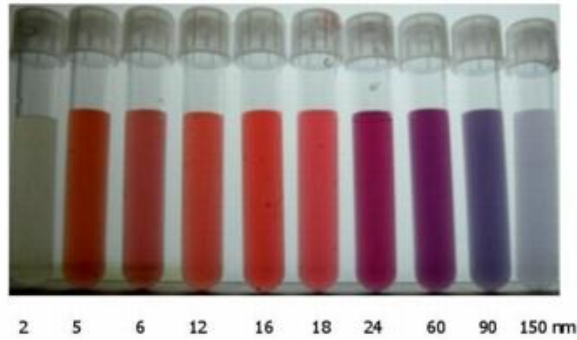
Nestes biossensores, o reconhecimento molecular é usualmente feito através da hibridação de uma sequência simples de ADN conhecida – ADN-sonda – com uma sequência simples desconhecida – ADN-alvo [13]. A formação da hélice dupla pode ser detectada através de um indicador de hibridação ou através de mudanças no meio onde ocorreu a ligação. Geralmente, a sequência de ADN-sonda tem acoplado um marcador transdutor que reage aquando destas alterações (marcador fluorescente, partículas magnéticas ou nanopartículas metálicas). O tipo de transdutor utilizado caracteriza o tipo de biossensor, existindo portanto biossensores de ADN ópticos, piezoelétricos, electroquímicos e magnéticos [1]. Em biologia e em ciências da vida, os métodos de detecção óptica são os mais utilizados [14]. Em comparação com outros tipos de sensores, oferecem uma detecção multialvo e monitorização contínua [15]. São normalmente baseados em fluorescência (mais utilizados), quimiluminescência e absorvância [16].

A detecção colorimétrica de ADN (integrada nos métodos baseados na absorvância) tem surgido em alternativa à detecção de fluorescência. A marcação de sequências de ADN é feita com nanopartículas de ouro funcionalizadas, que apresentam uma maior estabilidade e menor ruído de fundo do que a marcação fluorescente [1, 17].

### **2.2.3. NANOPARTÍCULAS DE OURO E DETECÇÃO COLORIMÉTRICA DE ADN**

Nanopartículas são todas as partículas de tamanho compreendido entre 1 – 100 nm, possuindo normalmente propriedades diferentes do mesmo material com massa superior [18].

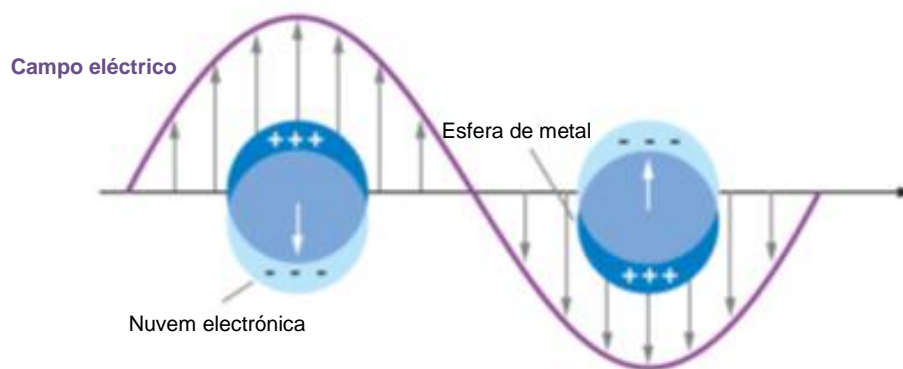
As nanopartículas de metal, especialmente as de ouro (AuNP), têm vindo a despertar um enorme interesse devido às suas características únicas que lhes conferem grande potencial em aplicações tecnológicas. De entre todas as características do ouro, destaca-se o facto de ser o metal com maior estabilidade nesta configuração, conseguindo existir como nanopartícula em condições atmosféricas. As suas propriedades ópticas têm sido exaustivamente estudadas, já que o ouro no seu estado macroscópico tem cor amarela e quando disposto em partículas mais pequenas a cor depende do tamanho das mesmas, como se pode observar na Figura 2.3.



**Figura 2.3** – Coloração das soluções de nanopartículas de ouro consoante o seu diâmetro. Adaptado de [19].

Para nanopartículas esféricas de ouro com diâmetros de 5 – 20  $\mu\text{m}$ , a cor característica é vermelho. Este tipo de coloração indica grande absorção da cor verde do espectro visível, que corresponde à frequência de ressonância plasmónica deste material. Este fenómeno é denominado de ressonância plasmónica de superfície e está relacionado com a interacção das nanopartículas com a radiação incidente [20, 21].

A ressonância plasmónica de superfície é descrita como a oscilação da densidade de carga existente na interface de dois meios com constantes dieléctricas de sinal oposto (por exemplo, um metal e um dieléctrico) como resultado da interacção com um campo electromagnético [22], como está ilustrado na Figura 2.4. A excitação do plasma (electrões livres de superfície) está presente quando o raio da partícula é maior do que o comprimento de onda da radiação incidente. No caso do ouro, as nanopartículas referidas (esféricas de diâmetros de 10 – 20  $\mu\text{m}$ ) têm um raio menor do que o comprimento de onda, há absorção a 520 nm (zona do verde) que corresponde à frequência em que há ressonância plasmónica [20].

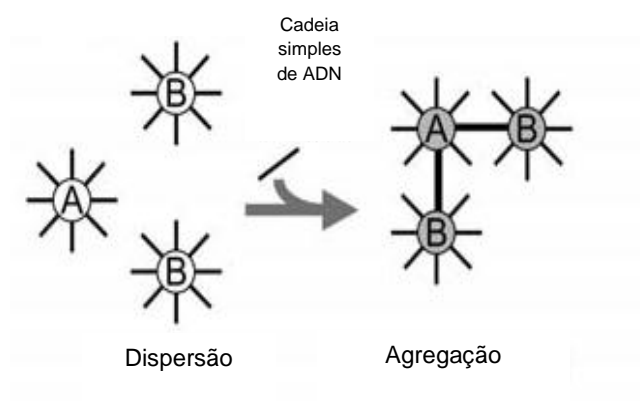


**Figura 2.4** – Representação esquemática do fenómeno de plasmónica de ressonância. Adaptado de [23].

As propriedades intrínsecas das nanopartículas de metal são essencialmente devidas à sua dimensão, forma, composição, cristalinidade e estrutura. Cada uma delas pode controlar estes factores de forma a obter a melhor configuração. Um dos parâmetros que pode ser controlado é o estado de agregação das partículas umas às outras, que tem influência na coloração (do vermelho até azul). Uma solução coloidal de NP-Au é vermelha, no entanto a agregação das AuNPs pode ser induzida pela adição de um sal à solução coloidal de nanopartículas, que provoca um desvio do pico de absorção para maiores comprimentos de onda, tornando a solução azul. É um método bastante utilizado em bioanálises para testes de detecção colorimétrica, como é o caso de testes de gravidez, detecção de algumas doenças infecciosas e detecção de determinadas sequências genéticas (caso abordado neste trabalho). Todos eles se baseiam na funcionalização das nanopartículas de ouro de modo a que possam formar conjugados com uma biomolécula [20, 24].

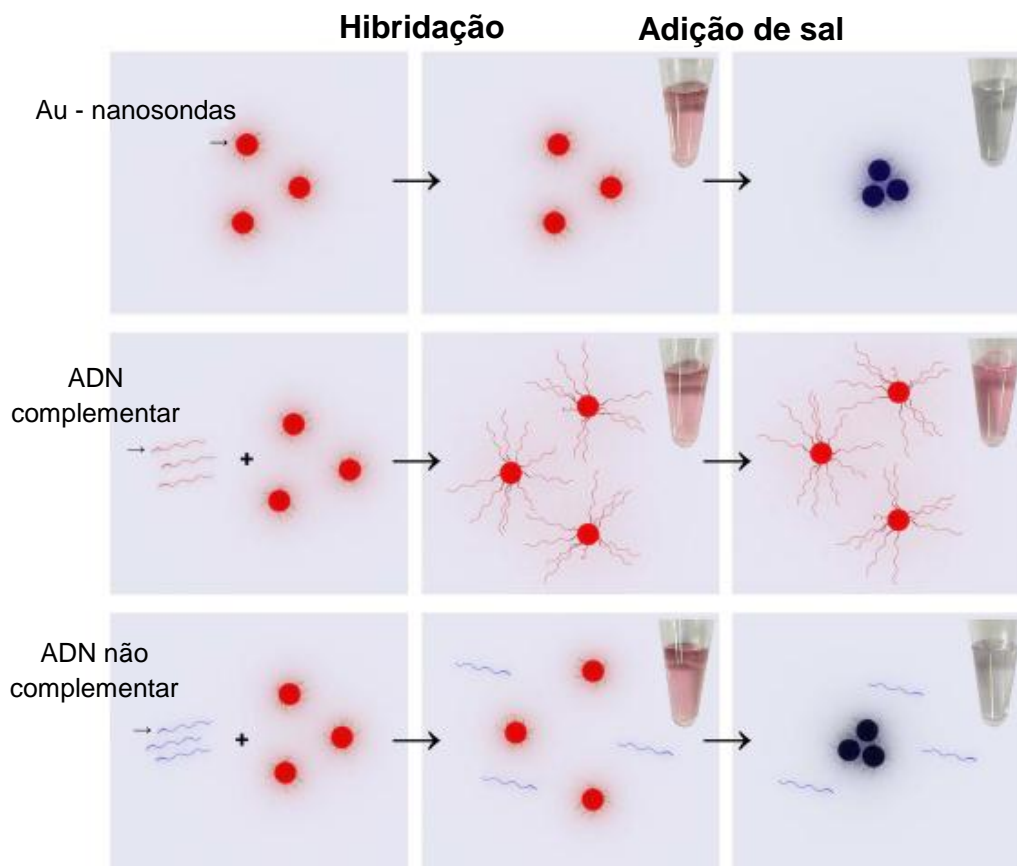
No contexto deste trabalho, apenas será abordado o conjugado ADN – AuNP, para detecção de sequências genéticas. Há dois métodos de detecção de ADN utilizando estes conjugados: método *crosslinking* [25] e método *non-crosslinking* [2, 26, 27], ambos baseados no fenómeno de hibridação do ADN.

No método *crosslinking*, representado na Figura 2.5, são utilizadas duas sondas de nanopartículas de ouro, cada uma delas funcionalizadas a uma sequência complementar a metade do alvo. No caso de haver hibridação (teste positivo), há uma aproximação das nanopartículas que causa a mudança de cor da solução, o que não se verifica quando não há hibridação, mantendo-se a solução com a sua normal coloração avermelhada (teste negativo, cadeias não complementares).



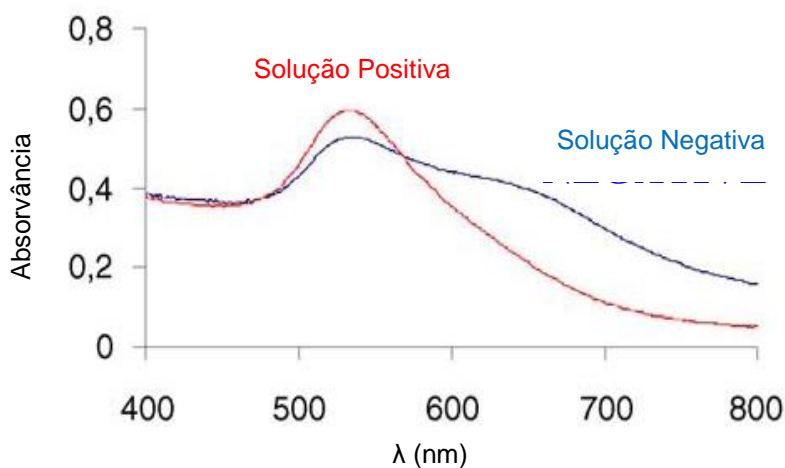
**Figura 2.5** – Método *crosslinking* para detecção de sequências de ADN. Na presença de ADN-alvo complementar, as sondas de ADN-AuNP agregam, resultando na alteração das cor da solução de vermelho para azul. Adaptado de [24].

No método *non-crosslinking*, tem-se apenas presença de uma sonda de ADN – AuNP num meio com sequências de ADN-alvo. A agregação das nanopartículas é provocada por um aumento da força iónica da solução, através da adição de um sal, que torna a solução azul. No entanto, esta agregação só é levada a cabo se as sequências sonda e alvo não forem complementares uma vez que, no caso de haver hibridação, há aumento do efeito estérico entre as AuNP, causando a diminuição da agregação destas, como se pode observar na Figura 2.6. Foi provado que este método de detecção de ADN é selectivo, sensível, fácil de efectuar, pouco dispendioso e fiável na identificação de polimorfismo de um nucleótido simples [28].



**Figura 2.6** – Método de *non crosslinking* para detecção de sequências de ADN. Recurso a uma sonda de ADN (nanopartícula de ouro funcionalizada com ADN) que, aquando da adição de sal e na presença de sequências alvo de ADN complementar, não sofre agregação, mantendo a coloração vermelha. Caso não haja ADN complementar, as sondas agregam, tornando a solução azul. Adaptado de [29].

A detecção em ambos os métodos é feita através da alteração da coloração das soluções, ou seja, na alteração do espectro de absorvância dos dois tipos de solução (característica associada ao nível de agregação das AuNP). Os espectros das colorações obtidas pelo método de *non-crosslinking* estão representados na Figura 2.7.



**Figura 2.7** – Espectro de absorvância dos dois tipos de soluções de ADN e nanopartículas de ouro: positiva e negativa, no método de *non-crosslinking* (no método de *crosslinking* as colorações são opostas). Adaptado de [26].

Como se pode observar, a solução contendo nanopartículas não agregadas (vermelha), que corresponde ao teste positivo, apresenta um pico de absorção aos 520 nm (forte absorção na zona do verde) e, soluções em que há presença de grande agregação (azul), teste negativo, têm um pico de absorção à volta de 610-630 nm (região do vermelho).

É a simplicidade que torna os métodos de detecção colorimétrica bastante importantes, uma vez que é diminuída, ou mesmo eliminada, a necessidade de uso de grande e complexa instrumentação de detecção [24].

## 2.3. MICROFLUÍDICA

É definida como a manipulação e análise de fluídos e suspensões em sistemas de dimensão submilimétrica [30].

A microfluídica tem o potencial para mudar significativamente o modo como certos processos são levados a cabo em biologia, química e medicina. Oferece a capacidade de trabalhar com menor volume de reagente, em tempos de reacção menores, e a possibilidade de processar um maior número de operações em paralelo. Surge como meio para desenvolver os sistemas de *Lab-on-a-Chip* [14, 31].

### 2.3.1. A FÍSICA DA MICROFLUÍDICA

Um fluido, líquido ou gás, é caracterizado pela fácil e contínua deformação sob a acção de forças externas, não possuindo assim uma forma definida e estática. Diferentes partes do fluido podem ser rearranjadas sem que este perca as suas propriedades macroscópicas.



À microescala, há diversas forças que se tornam dominantes em relação às aquelas que podemos observar à macroescala. Para explicar este fenómeno torna-se necessária a introdução de factores de escala, que expressam a variação das grandezas físicas com a dimensão  $l$  de um dado sistema, mantendo constantes outras grandezas como o tempo, a pressão ou temperatura.

Por exemplo, considerando forças de volume (como a gravidade e inércia) e forças de superfície (tensão superficial e viscosidade), o factor de escala para o rácio entre estes dois tipos de forças pode ser expresso por

$$\frac{\text{Forças de Superfície}}{\text{Forças de Volume}} \propto \frac{l^2}{l^3} = l^{-1} \xrightarrow{l \rightarrow 0} \infty. \quad (2.1)$$

O que prova que as forças de volume se tornam insignificantes à microescala, comparativamente com as forças de superfície [30].

De entre as características que descrevem os fluidos em microfluídica destacam-se o facto de o fluido ser laminar e circular principalmente por difusão. A resistência hidráulica e a tensão superficial são os efeitos que ganham maior relevância.

#### 2.3.1.1. NÚMERO DE REYNOLDS

O número de Reynolds ( $Re$ ) de um fluido é um parâmetro adimensional e descreve o regime de escoamento de um fluido – laminar ou turbulento. É calculado através da seguinte expressão:

$$Re = \frac{\rho v D}{\mu} \quad (2.2)$$

onde  $\rho$  é a densidade do fluido,  $v$  a velocidade,  $\mu$  a viscosidade e  $D$  o diâmetro hidráulico [31].

Para valores de  $Re$  inferiores a 2300 tem-se um fluxo laminar. A partir desse valor o fluido começa a ter um escoamento turbulento.

Num fluxo laminar, as camadas do fluido deslizam umas sobre as outras, podendo ser representado por um conjunto de linhas de corrente, que se mantém invariável no tempo. Uma das suas consequências é o facto das correntes de fluido em contacto umas com as outras se misturarem muito lentamente, apenas devido à difusão.

Devido às pequenas dimensões dos microcanais, o fluxo é tem um escoamento laminar [31].

### 2.3.1.2. DIFUSÃO

É o processo pelo qual a concentração de um grupo de partículas fluidas varia quando o fluido está em repouso ou, se há escoamento, quando a distribuição de velocidades numa qualquer secção é uniforme. O processo de difusão pode ser o resultado da actividade molecular (difusão molecular) ou da acção da turbulência (difusão turbulenta), mais intensa do que a primeira [32]. A difusão pode ser modelada a uma dimensão por

$$d^2 = 2Dt \quad (2.3)$$

em que  $d$  representa a distância percorrida pela partícula num tempo  $t$ , e onde  $D$  é o coeficiente de difusão da partícula. A difusão torna-se muito importante à microescala uma vez que varia com a distância ao quadrado [31].

### 2.3.1.3. RESISTÊNCIA HIDRÁULICA

Em microfluídica, o principal obstáculo à passagem do fluido é o reduzido espaço disponível nos canais.

O fluxo dentro de um microcanal é dado por,

$$Q = \Delta P/R \quad (2.4)$$

onde  $\Delta P$  representa a perda de pressão ao longo do canal e  $R$  é a resistência ao fluxo.

$R$  depende do tipo de geometria dos canais. Assim sendo para geometrias cilíndricas temos,

$$R = \frac{8\mu L}{\pi r^4} \quad (2.5)$$

sendo  $\mu$  a viscosidade do fluido,  $L$  o comprimento do canal e  $r$  o raio do canal.

No caso de canais rectangulares, a resistência é calculada através de

$$R = \frac{12\mu L}{\omega h^3} \quad (2.6)$$

onde  $\omega$  é a largura e  $h$  a altura do canal [31].

### 2.3.1.4. TENSÃO SUPERFICIAL

É o resultado da coesão entre as moléculas do líquido na interface com líquido/gás. Quando são usados canais na ordem dos micrómetros, o movimento do fluido é muito afectado pela tensão superficial e pela relação entre a aderência líquido-sólido e a coesão do líquido [31, 32].

## 2.3.2. DISPOSITIVOS DE MICROFLUÍDICA

Inicialmente, a maioria dos dispositivos de microfluídica era fabricada em substratos de silício ou vidro, seguindo as técnicas utilizadas em microelectrónica. Contudo, devido à necessidade de comercialização destas novas tecnologias, foram notadas bastantes desvantagens relativamente ao tipo de materiais e seus métodos de fabricação destes.

São materiais dispendiosos, tendo em conta que os dispositivos de microfluídica necessitam de ter uma área considerável pois, ao contrário da microelectrónica, a diminuição progressiva das dimensões compromete a sensibilidade do dispositivo (menos quantidade de fluído) [33].

No geral, os métodos de microfabricação em silício e vidro têm um elevado custo, são bastante morosos e requerem competências, equipamentos e instalações muito especializados.

O silício também apresenta a desvantagem de ser opaco, não sendo por isso adequado a certas aplicações biológicas baseadas em detecção óptica [34]. Ainda assim, são ambos, muito bons substratos para aplicações químicas que requerem fortes solventes, altas temperaturas ou superfícies quimicamente estáveis [31].

Mais recentemente, os materiais poliméricos têm demonstrado ser a resposta a estas dificuldades, apresentando uma grande versatilidade para a fabricação em massa de dispositivos de microfluídica [33]. De entre as suas características, destaca-se essencialmente o facto de alguns deles possuírem uma grande biocompatibilidade, quando comparados com o silício e o vidro. Outras vantagens estão associadas ao facto da fabricação de dispositivos poliméricos poder ser feita em grande escala e a um baixo custo. Destas advém a particularidade dos dispositivos fabricados poderem ser descartáveis, o que evita que haja contaminações entre testes [34]. Contudo, o facto de, comparativamente ao vidro, terem menor resistência a químicos, e menor estabilidade mecânica e ao UV pode comprometer a sua utilização para certas aplicações [33, 35].

### 2.3.2.1. POLÍMEROS

Os polímeros são compostos macromoleculares com grande massa molecular com mais de 1000 unidades monoméricas. Dividem-se em três grandes grupos, de acordo com o seu comportamento termofísico: termoplásticos, termoendurecíveis e elastómeros.

Os polímeros termoplásticos são aqueles que se tornam moles e fluídos através de um aumento de temperatura, podendo ser moldados em formas específicas que mantêm depois do arrefecimento. Este comportamento deve-se às fracas ligações entre cadeias moleculares. Temos como exemplos deste tipo de polímeros o Polietileno (PE), o Polipropileno (PP), o Nylon, o Polimetilmetacrilato (PMMA), o Polistireno (PS), o Policarbonato (PC), o Polietileno Tereftalado modificado com Glicol (PETG), o Policloreto de Vinil (PVC) e Copolímero de Olefin cíclico (COC).

Contrariamente, os termoendurecíveis têm fortes ligações entre cadeias (reticulação), sendo por isso polímeros extremamente rígidos e frágeis. A elevada reticulação confere uma grande estabilidade térmica impedindo que o polímero funda a altas temperaturas. Os poliésteres insaturados, os ésteres de vinil, o fenol formaldeído, o SU-8 e o uretano são exemplos de polímeros pertencentes a este grupo.

Os elastómeros não possuem grande reticulação entre cadeias mas, se uma força externa for aplicada, há deformação seguida de retorno ao estado inicial. Estes polímeros não fundem a altas temperaturas, mas têm uma temperatura de decomposição. Faz parte deste grupo, o polidimetilsiloxano (PDMS), usado neste trabalho como material de fabricação do biossensor [34].

## 2.4. DETECÇÃO COLORIMÉTRICA DE ADN EM MICROFLUÍDICA

Nos sistemas de detecção, os problemas de sensibilidade surgem quando os sistemas são miniaturizados. A redução dos volumes a analisar significa diminuição do número de analitos disponíveis, o que torna a detecção mais difícil. Por esta razão, a escolha do tipo de detecção em sistemas microfluídicos torna-se dependente da sua sensibilidade e escalabilidade à reduzida escala.

A detecção de colorimetria, baseada na absorvância, é bastante comum em sistemas de detecção à macroescala. Contudo, apesar da grande gama de aplicações deste método, é um sistema ainda muito pouco explorado em microfluídica. As reduzidas dimensões dos canais, que resultam numa grande diminuição do volume de solução a analisar, podem comprometer a performance destes sistemas, em termos de sensibilidade e precisão da medida de absorvância, como se pode prever através da lei de Lambert-Beer [30],

$$A = \epsilon lc \quad (2.7)$$

em que  $A$  representa a absorvância,  $\epsilon$  o coeficiente de absorção molar,  $l$  é o percurso óptico e  $c$  a concentração da solução. Como se pode observar, para uma mesma concentração de solução, a absorvância é directamente proporcional ao caminho óptico.

O percurso óptico nos sistemas microfluídicos pode ser alargado através de um segmento de canal no dispositivo utilizando fibras ópticas com transmissão longitudinal, células de detecção com percursos ópticos alargados (por exemplo, microcanais em forma de Z ou U [36]), células de multi-reflexão [37, 38], entre outros.

Além disso, há necessidade de acoplar e integrar componentes ópticos nos sistemas de microfluídica. A possibilidade de fabricar dispositivos complexos, que integram óptica e fluídica, através de simples técnicas de fabricação de polímeros foi um dos mais importantes

desenvolvimentos nesta área. Existem duas abordagens de detecção: abordagem *off-chip*, em que os componentes são acoplados ao dispositivo de microfluídica (fontes luminosas, normalmente LED ou laser e fibras ópticas); e abordagem *on-chip* em que os componentes são integrados no dispositivo (microlentes 2D [39] e guias de onda [40]).

No caso específico da detecção colorimétrica, a abordagem *off-chip* recorre à incorporação de fibras ópticas no chip de microfluídica, minimizando o número de componentes ópticos necessários. A abordagem *on-chip* integra microlentes com gradiente de índice de refração ou guias de onda no dispositivo de forma a focar o feixe para o canal ou aumentar o percurso óptico, aumentando o sinal de detecção [16].

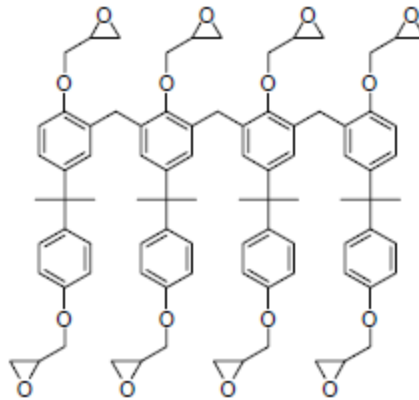


### 3. DESENVOLVIMENTO DO CHIP DE MICROFLUÍDICA

#### 3.1. MATERIAIS

##### 3.1.1. SU-8

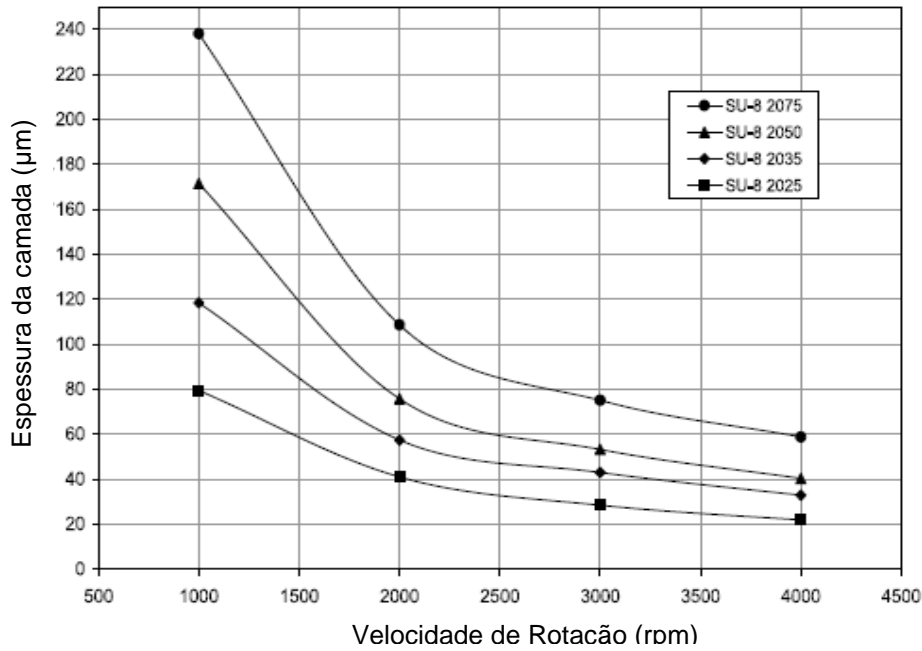
O SU-8 é um fotorresiste negativo, baseado num composto de epóxi [41]. Na Figura 3.1 está representada a estrutura química deste composto.



**Figura 3.1** – Estrutura química do oligómero da epóxi Bisphenol A Novolak contida nas formulações de SU-8. Oito grupos epóxi reactivos permitem um elevado grau de polimerização depois da fotoactivação.  
Adaptado de [42].

Apresenta grande eficiência de polimerização quando irradiado, possuindo adequada reactividade para alcançar um elevado contraste, elevada resolução e elevada sensibilidade. Depois do processamento, origina um elevado módulo de Young que se traduz também numa elevada estabilidade mecânica e térmica. Por estas razões, é um material bastante indicado para constituir estruturas com elevado coeficiente de esbeltez (*high-aspect-ratio, HAR*) [42].

Por ser bastante viscoso, tem a possibilidade de formar no substrato (geralmente silício ou vidro) camadas espessas estáveis (de 2  $\mu\text{m}$  a alguns milímetros), o que o torna apropriado para constituir padrões para canais de microfluídica [34]. Existem diferentes lotes de SU-8, com diferentes graus de viscosidade que, associados a velocidades de rotação diferentes, originam diferentes gamas de espessuras de camadas. No gráfico da Figura 3.2 estão representados vários lotes de SU-8 da gama do SU-8 2000 (*Microchem, USA*).



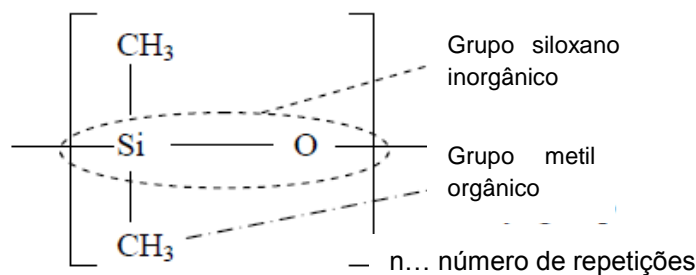
**Figura 3.2** – Espessura da camada de diferentes fotorresistes do grupo do SU-8 2000 em função da velocidade de rotação da deposição (*Microchem, USA*).

Como se pode observar, há uma dependência da espessura das camadas originadas com uma determinada velocidade de rotação: para uma mesma velocidade podem ser obtidas espessuras diferentes, consoante o lote de SU-8 2000 usado.

Durante a sua exposição à radiação UV, o processo de reticulação é iniciado fortemente devido à presença dos oito grupos epóxi por monómero, bastante reactivos. Este facto leva a que atinja boas propriedades químicas, mecânicas e térmicas que tornam, como efeito secundário, o seu processamento bastante moroso [42].

### 3.1.2. PDMS

O polidimetilsiloxano é um elastómero que faz parte do grupo dos siloxanos. Na sua estrutura está presente um grupo siloxano inorgânico e dois grupos metilo. Cada monómero é representado por  $[-Si(CH_3)_2-]$  e está representado na Figura 3.3.



**Figura 3.3** – Estrutura química do PDMS. Adaptado de [43].



É um excelente material de fabricação de sistemas de microcanais pois consegue reproduzir estruturas à escala do micrómetro com grande precisão através do processo de moldagem de réplicas (*replica molding*). É comercializado na sua forma líquida, como pré-polímero e agente de polimerização, e torna-se sólido após reticulação das cadeias [44].

É opticamente transparente, até a 280 nm, pelo que pode ser utilizado em inúmeros esquemas de detecção (absorvância e fluorescência), polimeriza a baixas temperaturas e é reversivelmente deformado depois de curado. Pode também ser selado reversivelmente com ele próprio ou com outros materiais que possuam ligações de silício, apenas através do contacto entre as superfícies, formando ligações de van der Waals; ou irreversivelmente após a exposição a um plasma de ar formando ligações covalentes entre superfícies. Do ponto de vista biológico, tem como vantagens o facto de ser um material inerte, flexível e não tóxico [35, 43].

O facto de possuir uma baixa tensão de superfície reduz a acção da capilaridade para soluções aquosas. No entanto, através de tratamento de plasma, pode ter comportamento hidrofílico durante algum tempo, regressando depois ao seu estado hidrofóbico. Não apresenta grande resistência a solventes; a sua elevada elasticidade e absorção de algumas moléculas pode ser impeditivo para algumas aplicações [43].

### **3.2. TÉCNICAS DE MICROFABRICAÇÃO**

Têm vindo a ser desenvolvidos inúmeros métodos de fabricação dependentes das propriedades físicas e químicas dos polímeros que se pretende usar. Contudo, estes métodos podem ser divididos em duas áreas: fabricação por replicação e fabricação directa.

Na fabricação por replicação é necessário ter um molde de precisão através do qual muitas microestruturas poliméricas podem ser produzidas. Fazem parte destes métodos a litografia suave (*soft lithography*), o molde por injeção (*injection molding*) e a gravação em relevo (*hot embossing*). As características finais da superfície do polímero dependem da qualidade do molde e da qualidade do processo de replicação. Este método torna-se economicamente vantajoso quando se pretende uma grande quantidade de dispositivos idênticos.

A fabricação directa é feita sem recorrer a um molde e, portanto, as superfícies poliméricas são produzidas individualmente. Integram-se nesta técnica a ablação por laser (*laser ablation*), a fotolitografia (litografia óptica) e litografia de raio-X (*X-ray lithography*). Como não é necessário molde, é um método mais selectivo em termos de número de dispositivos finais e alterações do desenho do padrão.

### 3.2.1. FOTOLITOGRAFIA

A litografia consiste na transferência de um padrão para um substrato através de um processo de erosão. Quando é levada a cabo com o recurso a um polímero fotossensível, fotorresiste, e a uma fonte de irradiação, passa a denominar-se de fotolitografia [42].

Num processo de fotolitografia, a radiação selectiva inicia uma série de processos fotoquímicos no fotorresiste, alterando a sua solubilidade e permitindo a sua remoção selectiva no processo de revelação [42, 45]. Consiste na projecção de imagens de um padrão representado numa máscara, normalmente uma placa de quartzo transparente com as estruturas opacas, numa película de resiste [46].

Este método envolve uma série de passos sequenciais. Primeiramente, o substrato é sujeito a um pré-tratamento, de forma a aumentar a aderência do fotorresiste à sua superfície, normalmente aquecimento de forma a remover alguma humidade que possa estar presente. Este processo é então seguido da aplicação do fotorresiste no substrato em rotação, espalhamento (*spin-coating*), para que este forme uma película homogénea em toda a área. Dependendo da velocidade da rotação e da viscosidade do fotorresiste, são obtidas diferentes espessuras da película. Após o *spin-coating*, é efectuado um aquecimento de forma a densificar a película. Depois do arrefecimento, procede-se à exposição selectiva da camada, seguida da revelação.

Podem considerar-se dois tipos de fotorresiste, positivo e negativo, em função das zonas sofrem alteração com a exposição (Figura 3.4). No positivo as áreas expostas à radiação sofrem aumento de solubilidade e são removidas na revelação, ficando com o mesmo padrão da máscara. Pelo contrário, no fotorresiste negativo, as zonas expostas tornam-se insolúveis devido a um aumento de polimerização e têm como padrão resultante a imagem complementar à zona à zona opaca da máscara.

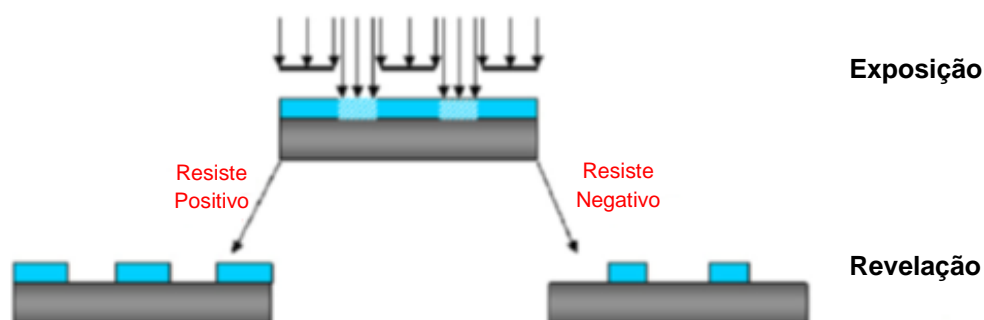


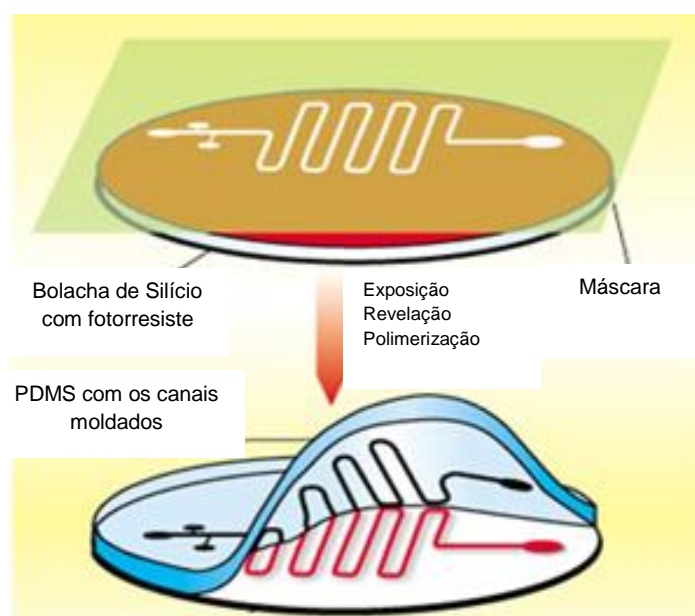
Figura 3.4– Diferença entre fotorresiste positivo e negativo. Adaptado de [46].

Independentemente do tipo de fotorresiste, há características comuns que todos necessitam de possuir, como contraste de revelação e estabilidade face a todos os processos a que são sujeitos [46].

### 3.2.2. LITOGRAFIA SUAVE

A litografia suave é um processo não fotolitográfico baseado na rápida prototipagem e moldagem de réplicas (*replica molding*) de polímeros, especialmente elastómeros, através de um molde mestre. Este molde poder ser fabricado por inúmeros métodos, incluindo fotolitografia de uma máscara previamente desenhada num programa CAD. Uma vez fabricado o molde, este é coberto com um pré-polímero, que depois de polimerizado gera a réplica negativa do molde [34, 35].

Na Figura 3.5 estão representados os passos de um processo de litografia suave, desde a padronização da bolacha de silício com fotorresiste.



**Figura 3.5** – Esquemático da técnica de litografia suave – *Replica molding*. Adaptado de [47].

Os materiais elastoméricos, nomeadamente o PDMS, são os preferidos para esta técnica uma vez que são facilmente libertados dos moldes rígidos e fazem contacto total com as superfícies, mesmo que não sejam planas, conseguindo replicar com extrema resolução todas as estruturas presentes no molde [44].

Os procedimentos rápidos e flexíveis tornaram esta técnica de fabricação a mais usada para sistemas microfluídicos de laboratório.

### **3.2.3. TRATAMENTO DE SUPERFÍCIES POR PLASMA**

O plasma é o quarto estado da matéria e distingue-se do estado gasoso por possuir um elevado nível de energia. É formado por partículas neutras, radicais e carregadas, por vezes acompanhadas por radiação UV e UV visível. Por estas razões, é um estado muito reactivo.

O tratamento de superfícies com plasma envolve mecanismos bastante complexos associados ao tipo de plasma, ao material a tratar, à atmosfera e às condições de tratamento. Estes factores são dependentes do tipo de propriedades que se pretende. O tratamento por plasma apenas afecta a camada superior (à escala do nanómetro) e não todo o volume de material.

Este procedimento é bastante útil para tratamento de substratos poliméricos com microestruturas. Nestes casos, a geração de plasma é feita a frio de forma a prevenir a deformação dos polímeros [48].

Mais especificamente, neste trabalho foi utilizado o tratamento de plasma com atmosfera de oxigénio com o intuito de activar a superfície de PDMS e vidro, de forma a que se formem fortes ligações Si-O-Si entre as duas superfícies, assegurando a perfeita e irreversível selagem dos canais.

## **3.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO**

### **3.3.1. MICROSCOPIA ÓPTICA**

O microscópio óptico é um dos mais versáteis e úteis equipamentos num laboratório de microfabricação. Contudo, tem como limitação a impossível visualização de estruturas abaixo dos 0,5  $\mu\text{m}$  [49].

Foi utilizado para verificar e medir (utilizando um instrumento de medida integrado) as estruturas fabricadas (100 – 200  $\mu\text{m}$ ), tanto de topo como em perfil através de cortes transversais nas amostras. Identifica facilmente qualquer malformação ou partícula nas estruturas, que podem comprometer o seu funcionamento.

### **3.3.2. PERFILOMETRIA DE CONTACTO**

Faz uma análise superficial da amostra com uma agulha. Consiste na medida do deslocamento vertical que é provocado na agulha enquanto esta percorre a superfície da amostra. Com as medidas resultantes é possível traçar o perfil da zona da amostra analisada.

No contexto do trabalho teve como função medir a espessura e avaliar o perfil das estruturas em SU-8.

### **3.3.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO (SEM)**

Um microscópio electrónico utiliza um feixe de electrões para produzir uma imagem ampliada da amostra. A imagem de microscopia electrónica de varrimento é obtida através da detecção

do sinal produzido pelos electrões secundários, emitidos quando a amostra é atingida pelo feixe de electrões incidente [49].

Este método foi utilizado para analisar as superfícies fabricadas de SU-8 e PDMS, em termos de características e resolução.

### 3.3.4. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO UV-VISÍVEL

Foi utilizada para quantificar as soluções de nanopartículas de ouro.

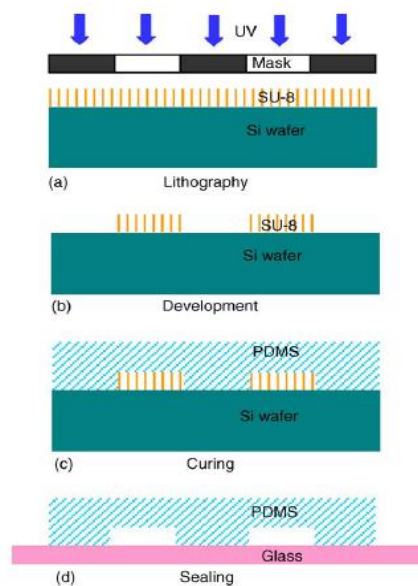
Consiste na comparação da intensidade radiação incidente com a intensidade da radiação depois de atravessar uma solução. Fazendo uso da Lei de Lambert-Beer, calcula a absorvância da solução para os vários comprimentos de onda.

## 3.4. PROCESSAMENTO DO CHIP

O desenvolvimento do chip de microfluídica foi processado com os métodos descritos anteriormente:

1. Fotolitografia em SU-8 num substrato de silício;
2. Litografia suave em PDMS, usando como molde o produto obtido em fotolitografia;
3. Fabricação de um molde intermédio numa resina epóxi;
4. Selagem dos chips através de plasma de oxigénio.

Os processos mais representativos do processamento (fotolitografia em SU-8, litografia suave em PDMS e selagem) estão presentes na Figura 3.6.



**Figura 3.6** – Processos de Fabricação do chip de microfluídica: (a) fotolitografia em SU-8, (b) revelação, (C) replicação do negativo do molde através da polimerização de PDMS, (D) selagem do PDMS com vidro através de plasma de oxigénio. Adaptado de [34].

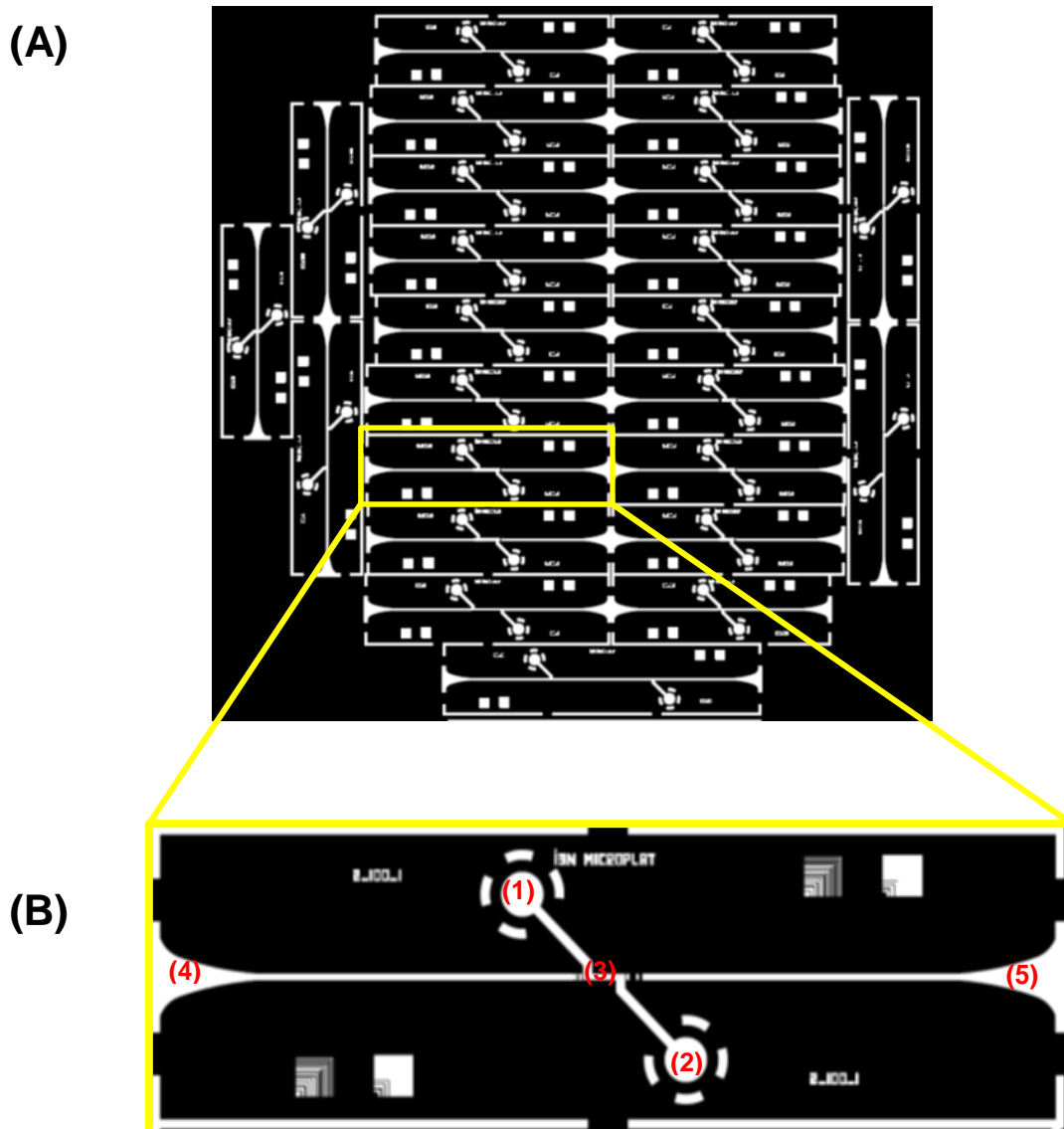
Todo o trabalho, excepto a selagem, decorreu na câmara limpa de forma a evitar contaminações. O processo de fotolitografia teve lugar na chamada “zona amarela” da câmara limpa, que é uma sala onde a radiação com comprimentos de onda mais baixos é indesejada por reagir com o fotorresiste.

### 3.4.1. FABRICAÇÃO DO MOLDE EM SU-8

#### 3.4.1.1. MÁSCARA

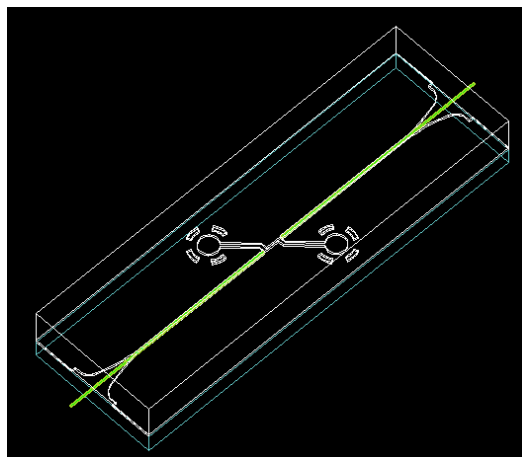
Foi utilizada uma máscara de crómio em substrato de vidro (*JD Photo-tools, UK*) para efectuar a fotolitografia em SU-8.

O padrão presente na máscara foi desenhado no *software* AutoCAD e engloba várias configurações de chips, como se pode observar na Figura 3.7.



**Figura 3.7** – (A) *design* presente na máscara de crómio utilizada na fotolitografia, com as diversas configurações de chips; (B) Chip único em que (1) e (2) representam a entrada e saída de fluido, respectivamente; (3) é a zona de detecção e (4) e (5) são inserções de fibras ópticas.

Como também se pode ver na Figura 3.7, cada chip é constituído por um microcanal com entrada e saída de fluido, conectadas pela zona de detecção, e duas ranhuras para inserção das fibras ópticas. Na Figura 3.8 está ilustrado o chip de microfluídica projectado em vista 3D.



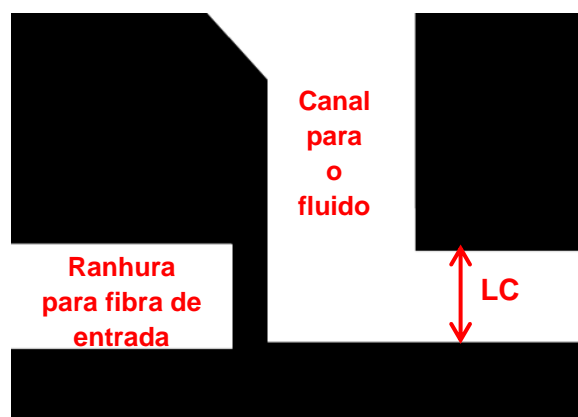
**Figura 3.8** – Imagem a três dimensões do chip de microfluídica projectado.

As diferentes configurações são resultado de diferentes dimensões da zona de detecção, percurso óptico de 0,25 a 10 mm e largura do canal de 100 ou 200  $\mu\text{m}$ , e introdução de diferentes conformações de lentes de entrada e saída, que se encontram entre as ranhuras da fibras e a zona de detecção.

As diferentes configurações de lentes foram desenhadas utilizando aproximação paraxial *Ray Tracing*, pelo Prof. Paulo Lopes da Universidade de Aveiro, no contexto do projecto MicroPlat, financiado pelo laboratório associado I3N, onde está inserida esta dissertação de mestrado.

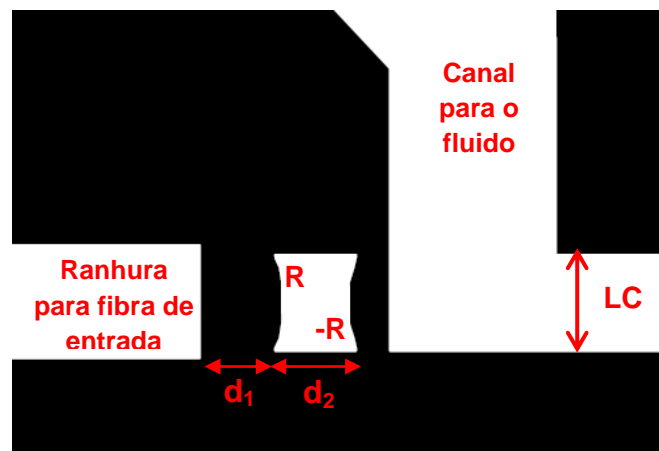
### CONFIGURAÇÃO DAS LENTES

#### Ausência de lentes à entrada e saída do canal de detecção



**Figura 3.9** – *Design* da configuração sem lentes.

Configuração 1 de entrada: microlente bicôncava de ar entre PDMS

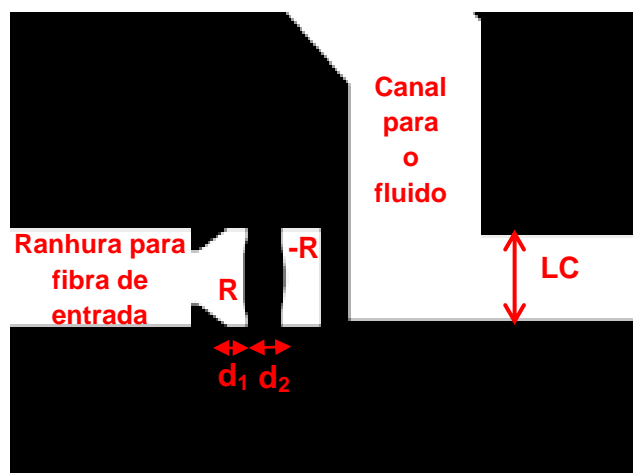


**Figura 3.10** – Configuração 1 de lentes de entrada e respectivos parâmetros.

Os parâmetros variam em função da largura do canal de detecção (LC):

- ✓ Para LC de 100  $\mu\text{m}$ , tem-se um R de -175  $\mu\text{m}$ ,  $d_1$  de 100  $\mu\text{m}$  e  $d_2$  de 80  $\mu\text{m}$ .
- ✓ Para LC de 200  $\mu\text{m}$ , tem-se um R de -350  $\mu\text{m}$ ,  $d_1$  de 400  $\mu\text{m}$  e  $d_2$  de 120  $\mu\text{m}$ .

Configuração 2 de entrada: microlente biconvexa de PDMS entre ar



**Figura 3.11** – Configuração 2 de lentes de entrada e respectivos parâmetros.

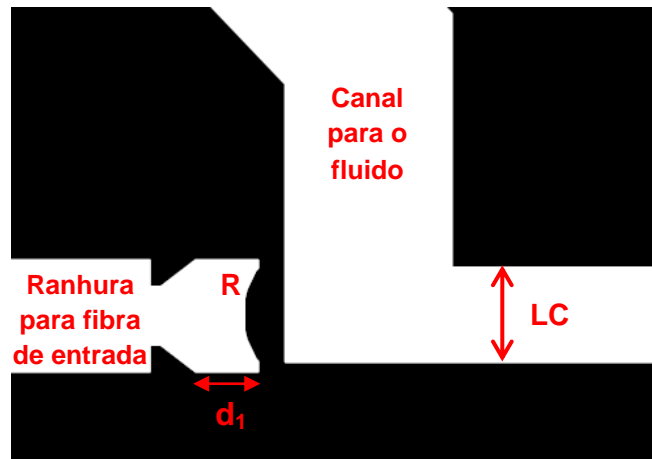
Os parâmetros variam em função da largura do canal de detecção (LC):

- ✓ Para LC de 100  $\mu\text{m}$ , tem-se um R de 250  $\mu\text{m}$ ,  $d_1$  de 80  $\mu\text{m}$  e  $d_2$  de 70  $\mu\text{m}$ .



- ✓ Para LC de 200  $\mu\text{m}$ , tem-se um R de 440  $\mu\text{m}$ ,  $d_1$  de 300  $\mu\text{m}$  e  $d_2$  de 100  $\mu\text{m}$ .

Configuração 3 de entrada: microlente convexa ar/PDMS

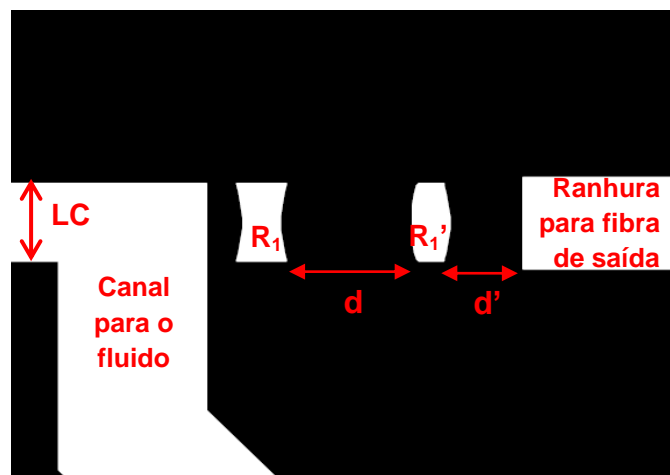


**Figura 3.12** – Configuração 3 de lentes de entrada e respectivos parâmetros.

Os parâmetros variam em função da largura do canal de detecção (LC):

- ✓ Para LC de 100  $\mu\text{m}$ , tem-se um R de 100  $\mu\text{m}$  e  $d_1$  de 115  $\mu\text{m}$ .
- ✓ Para LC de 200  $\mu\text{m}$ , tem-se um R de 192  $\mu\text{m}$  e  $d_1$  de 335  $\mu\text{m}$ .

Configuração de lentes de saída (presente nos chips com as três configurações de lentes de entrada)



**Figura 3.13** – Configuração das lentes de saída e respectivos parâmetros.

Os parâmetros variam em função da largura do canal de detecção (LC):

- ✓ Para **LC** de 100  $\mu\text{m}$ , tem-se um  $R_1$  de -210  $\mu\text{m}$ ,  $R_1'$  de 180  $\mu\text{m}$ ,  $d$  de 180  $\mu\text{m}$  e  $d'$  de 50  $\mu\text{m}$ .
- ✓ Para **LC** de 200  $\mu\text{m}$ , tem-se um  $R_1$  de -300  $\mu\text{m}$ ,  $R_1'$  de 170  $\mu\text{m}$ ,  $d$  de 255  $\mu\text{m}$  e  $d'$  de 50  $\mu\text{m}$ .

### DESIGNAÇÃO DOS CHIPS

Para um mais simples reconhecimento dos chips e das suas características, a cada um foi atribuído uma identificação que indica presença ou não de lentes, o tipo de configuração destas, a largura do canal e o comprimento do percurso óptico.

Assim sendo, a identificação toma a seguinte forma:

**Configuração das lentes de entrada\_Largura do canal ( $\mu\text{m}$ )\_Comprimento do percurso óptico (mm)**

Os chips fabricados estão descritos na Tabelas 3.1 e 3.2.

**Tabela 3.1** – Chips fabricados com largura de canal de detecção de 100 $\mu\text{m}$ .

Comprimento	Sem lentes	Configuração 1	Configuração 2	Configuração 3
0,1 mm	100_0,1			
0,25 mm	100_0,25			
0,5 mm	100_0,5		2_100_0,5	
1 mm	100_1	1_100_1	2_100_1	3_100_1
2 mm	100_2	1_100_2	2_100_2	3_100_2
3 mm	100_3			
4 mm	100_4		2_100_4	
10 mm	100_10			

**Tabela 3.2** – Chips fabricados com largura de canal de detecção de 200 $\mu\text{m}$ .

Comprimento	Sem lentes	Configuração 1	Configuração 2	Configuração 3
1 mm	200_1	1_200_1	2_200_1	3_200_1
2 mm	200_2	1_200_2	2_200_2	3_200_2

#### 3.4.1.2. FOTOLITOGRAFIA EM SU-8

Como substrato para o SU-8 (*SU-8 2050, Microchem, USA*) foram utilizadas bolachas de silício (4", *monitors*, orientação 100 cz, *MEMC Electronic Materials, Inc., USA*).

As bolachas foram previamente limpas e aquecidas, para evaporar quaisquer possíveis resíduos de água presentes na superfície. Depois do arrefecimento, procedeu-se à cobertura das bolachas com fotorresiste numa plataforma rotativa (*Karl Suss CT62, Suss MicroTec, Germany*), variando a velocidade de rotação. Uma vez cobertas, procedeu-se a uma cura suave do fotorresiste (placa de aquecimento *HS40A-2, Torrey Pines Scientific, Inc., USA*) e posterior arrefecimento.

A exposição foi efectuada com o alinhador de máscaras (*MA6, Suss MicroTec, Germany*), com a máscara de crómio anteriormente descrita (*JD Photo-tools, UK*) recorrendo à radiação UV e ao filtro *i-line (G180336, Suss MicroTec, Germany)* de forma a evitar o “efeito T” no fotorresiste (menor quantidade de energia atinge a zona inferior da camada).

Seguiu-se uma pós-cura, uma vez que a exposição apenas inicia a amplificação química, sendo que a reacção de reticulação entre cadeias é muito lenta à temperatura ambiente. A posterior revelação foi feita com propilenoglicol metil eter acetato (*Sigma-Aldrich, Germany*) e seguida de lavagem com isopropanol.

A fotolitografia foi efectuada em 6 bolachas de silício, variando apenas a velocidade de rotação do espalhamento do fotorresiste, tendo sempre em conta que a temperatura ambiente afecta a viscosidade do SU-8. Um aumento da temperatura provoca a diminuição da viscosidade do SU-8, que implica que a velocidade de rotação necessária para obter os mesmos resultados tenha de ser inferior ao valor tabelado. As condições do procedimento para obtenção de estruturas com espessura na gama dos 115 – 120  $\mu\text{m}$  estão descritos na Tabela 3.3.

As estruturas obtidas foram observadas sob o microscópio óptico, assegurando que apenas prosseguiriam para o passo seguinte as que não tivessem qualquer tipo de deformação que pudesse comprometer os objectivos finais. A medição da espessura das estruturas foi realizada no perfilómetro *Ambios Technology XP-200 (Ambios Technology, Inc., Santa Cruz, USA)* e, através do corte transversal no microscópio óptico. A análise das características da superfície foi efectuada no SEM (*Zeiss Auriga, Germany*).

**Tabela 3.3** – Descrição dos procedimentos e variação de parâmetros nos vários testes de microfabricação efectuados.

Bolacha	Temperatura ambiente	Preparação do Substrato	<i>Spin Coating</i>	Cura Suave	Exposição	Pós-cura	Revelação	Lavagem
P0		Limpas em ultras- sons com acetona e isopropanol. Aquecimento 10minutos a 180°C. Arrefecimento durante 10 minutos.	500rpm/7s com aceleração 100rpm/s, seguido de 1450rpm/30s com aceleração 300rpm/s	5 minutos a 65°C seguidos de 24 minutos a 95°C.  Arrefecimento durante 10 minutos.	Com filtro <i>i-</i> <i>line</i> , modo <i>soft contact</i> , e modo tensão constante. 330mJ/cm <sup>2</sup> durante 21s.	5 minutos a 65°C seguidos de 24 minutos a 95°C.	Com o revelador propilenoglicol metil eter acetato durante 18 minutos a 500rpm.	Com isopropanol até retirar todos os vestígios de revelador. Secagem com azoto.
P1	18,1°C		500rpm/7s com aceleração 100rpm/s, seguido de 1520rpm/30s com aceleração 300rpm/s					
P2	18,1°C		500rpm/7s com aceleração 100rpm/s, seguido de 1540rpm/30s com aceleração 300rpm/s					
P3	20,8°C		500rpm/7s com aceleração 100rpm/s, seguido de 1530rpm/30s com aceleração 300rpm/s					
P4	20,8°C		500rpm/7s com aceleração 100rpm/s, seguido de 1530rpm/30s com aceleração 300rpm/s					
P5	20,8°C		500rpm/7s com aceleração 100rpm/s, seguido de 1540rpm/30s com aceleração 300rpm/s					

### **3.4.2. PRODUÇÃO DE RÉPLICAS EM PDMS**

Tendo os moldes em SU-8 já preparados, o passo seguinte foi utilizá-los para moldar o PDMS (*Sylgard 184, Dow Corning, Spain*) através do processo de litografia suave.

Como foi referido anteriormente, comercialmente este polímero apresenta-se sob a forma líquida como pré-polímero e agente de polimerização.

O PDMS foi produzido através da adição do agente de polimerização ao pré-polímero, numa razão de 1:10 em massa. A gaseificação provocada pela agitação foi eliminada colocando o PDMS num excicador até que todas as bolhas de ar fossem eliminadas.

De forma a proteger a superfície e tornar o procedimento de retirar o PDMS do molde, foi feita silanização da bolacha de silício com SU-8: durante 1 hora em vácuo com tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahidro octil triclorosilano (*Microchem, USA*).

Seguidamente, foi colocado o PDMS sobre o molde de SU-8 e cozido a 100°C durante 2 horas. Depois de sólido, descolou-se a camada de PDMS moldada do molde em SU-8.

Foi medida a espessura com o microscópio óptico, assegurando réplicas perfeitas do molde de SU-8, e analisada a superfície no SEM (*Zeiss Auriga, Germany*).

### **3.4.3. MOLDE INTERMÉDIO EM RESINA EPÓXI**

De forma a produzir moldes mais resistentes para produção de grandes quantidades de PDMS, foi introduzida uma resina epóxi (*ES562, Permabond*) no processo.

Após a primeira réplica de PDMS ser produzida pela bolacha com SU-8, foi utilizada para fabricar um novo molde de resina epóxi (de padrão idêntico ao SU-8). Foi colocada uma camada, de aproximadamente 2mm de espessura, de resina sobre a estrutura de PDMS previamente moldada. A desgaseificação foi feita num excicador até que todas as bolhas fossem eliminadas da camada, seguindo-se a cura num forno a 120°C durante aproximadamente 40 minutos.

Quando solidificada, retirou-se do PDMS e passou a ser usada como molde mestre para produção de novo PDMS, através do método já descrito com moldes de SU-8 no ponto anterior.

### **3.4.4. SELAGEM**

Os chips foram cortados individualmente e furados na entrada e saída do canal de fluido. Foram igualmente cortados vidros com as mesmas dimensões dos chips. Ambos os materiais foram limpos em ultra-sons com acetona e isopropanol, 10 minutos em cada reagente. Após a limpeza foram cuidadosamente secos com azoto.

Para selar os canais, foi necessário unir o chip de PDMS ao vidro através de um tratamento de plasma às superfícies.

A câmara de plasma (*Plasma treatment, BuckTechnologien, Germany*), é utilizada basicamente para preparação de superfícies: limpeza com plasma, decapagem e activação de superfície.

O gás usado para activar as superfícies foi o oxigénio durante 60s, com uma potência de 104W e a 13Pa, de forma a tornar a união irreversível. Após o tratamento, foram mantidas durante alguns minutos a 100°C, para que aumentasse a força das ligações.

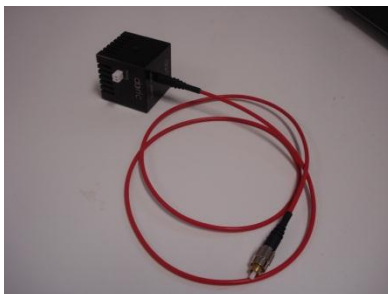
A observação dos microchips ao microscópio óptico, assegurou que houve perfeita união das duas superfícies, sem deformação das estruturas presentes no PDMS.

### 3.5. INTEGRAÇÃO NA PLATAFORMA OPTOELECTRÓNICA

A plataforma optoelectrónica foi constituída por duas partes, a fonte de radiação e zona de fotodeteccção. A fonte de radiação era formada por dois LEDs acoplados a fibra óptica multimodo (*Fiber Pigtailed LED, High Brightness, Doric Lenses*), representados na Figura 3.14.

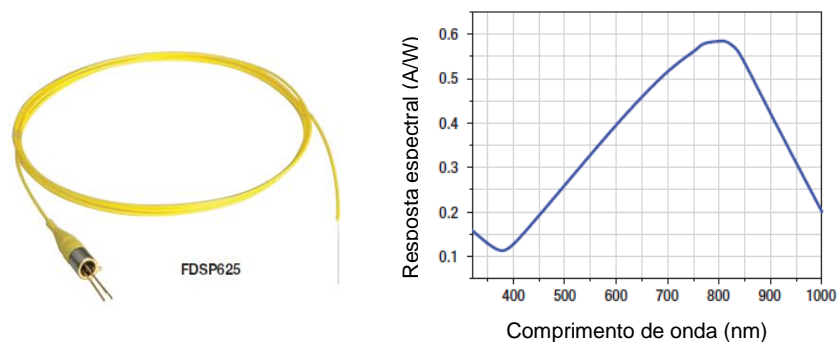
O LED vermelho tem comprimento de onda de 625 nm e largura de banda de 25 nm e LED verde tem comprimento de onda de 525 nm e largura de banda de 35 nm.

Foram alimentados por uma fonte de corrente de 300mA.



**Figura 3.14** – LED (*Fiber pigtailed LED – High brightness*).

O elemento de fotodeteccção foi constituído por um fotodíodo (*FDSP625 - Pigtailed Silicon Photodiode, GI Multimode Fiber, Thorlabs*), representado na Figura 3.15, ligado a um multímetro e picoamperímetro.



**Figura 3.15** – Fotodetector FDS625 e respectiva resposta espectral.

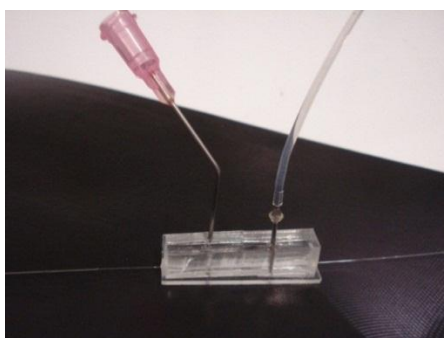
### 3.5.1. INSERÇÃO DAS FIBRAS ÓPTICAS

As fibras ópticas (multimodo, revestimento: 125 $\mu$ m, núcleo 62,5 $\mu$ m, *Thorlabs, Germany*) foram inseridas nas ranhuras de entrada e de saída do chip. De forma a reduzir a fricção, foi injectada uma gota de etanol antes de inserção. Recorrendo ao microscópio óptico, é possível certificar que a fibra é colocada até ao final do canal sem quebrar as paredes de PDMS.

### 3.5.2. PROCEDIMENTO PARA AS MEDIÇÕES

Depois do chip imobilizado sob o microscópio óptico, foi conectada a fibra de entrada com um dos LEDs e a fibra de saída com o fotodetector. A alimentação dos LEDs foi feita com corrente de 300mA e o fotodetector ligado ao multímetro em modo tensão.

Nos furos feitos anteriormente, foi introduzida uma agulha para seringa na entrada e um tubo capilar na saída do microcanal, como se demonstra na Figura 3.16.

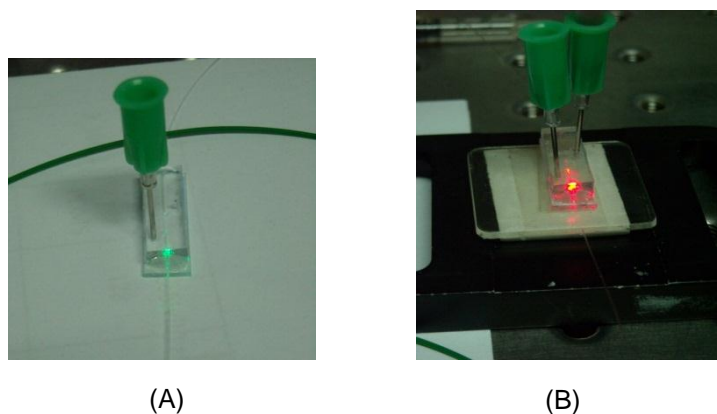


**Figura 3.16** – Microchip com agulha no canal de entrada e tubo capilar no canal de saída, com as fibras já inseridas.

A primeira medição é feita sem introdução de qualquer fluido. Seguidamente foi injectado isopropanol no microcanal, com o intuito de evitar a formação de bolhas de ar e remover qualquer impureza

Foram preparadas soluções de 5nM de nanopartículas de ouro. A solução positiva foi preparada adicionando a mesma quantidade de água e de solução de 5nM de nanopartículas de ouro, de forma a obter concentração de 2,5nM (a mesma utilizada na detecção de ADN). A solução negativa foi processada misturando à solução de 5nM de nanopartículas, água e cloreto de magnésio de forma a que este tivesse uma concentração final de 0,02M. As duas soluções foram analisadas no espectrofotómetro.

As medições foram feitas com água (*baseline*), solução positiva e solução negativa, com os dois LEDs (Figura 3.17) em cada situação. Cada medição foi repetida três vezes.



**Figura 3.17** – Procedimento para as medições. (A) LED verde, (B) LED vermelho.

Foram feitas 3 medições com cada solução (água, solução positiva e solução negativa de nanopartículas de ouro) e registados os respectivos valores de tensão à saída com o multímetro e corrente com um picoamperímetro.



## 4. RESULTADOS DO PROCESSO DE MICROFABRICAÇÃO

### 4.1. OPTIMIZAÇÃO DA MICROFABRICAÇÃO COM SU-8

A etapa mais morosa do processo de microfabricação foi a produção do molde de SU-8. O PDMS replica com nano-precisão de forma bastante fácil e rápida todas as estruturas presentes no molde, o que implica que a fabricação do molde seja crítica para todo o processo.

O SU-8 é um resiste altamente fotossensível e as suas propriedades finais podem ser afectadas pelos parâmetros do seu processamento. Este processamento é bastante demorado e consiste em cinco etapas: espalhamento (*spin-coating*), cura suave, exposição, pós-cura e revelação. Os parâmetros óptimos de fabricação podem mudar entre lotes de SU-8 devido a pequenas variações na sua própria composição, assim como decomposição gravimétrica dos componentes poliméricos ao longo do tempo [41]. Por estas razões, a fabricação de SU-8 para além de ser optimizada em função de uma espessura específica, também para um lote específico.

#### 4.1.1. TENSÃO INTERNA

Este factor é uma das desvantagens do SU-8. Está relacionado com a elevada tensão a que fica sujeito depois da polimerização. Este facto deriva do seu coeficiente de expansão termal ser bastante superior ao coeficiente de expansão termal dos habituais substratos, silício e vidro, o que resulta numa grande tensão entre a interface dos materiais, provocada pelo seu encolhimento durante a polimerização. Este efeito é mais pronunciado em grandes estruturas de SU-8 e no caso de má aderência ao substrato há risco de ser eliminado da sua superfície [50].

Este efeito foi reduzido escolhendo um substrato adequado (silício), ou seja, com um coeficiente de expansão termal semelhante ao do SU-8 e utilização de uma geometria de fotolitografia que evitasse grandes áreas cobertas com o fotorresiste (zonas de elevada polimerização).

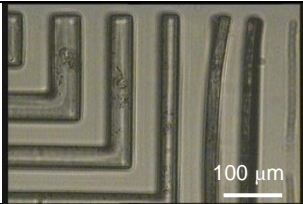
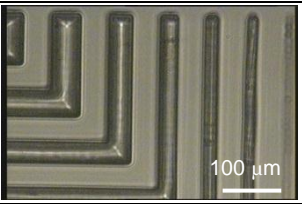
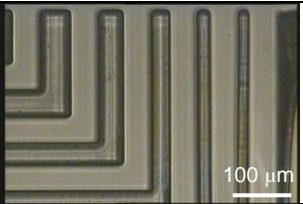
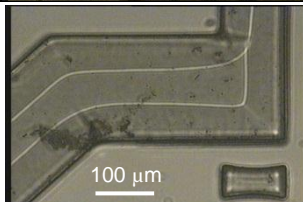
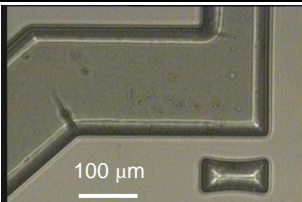
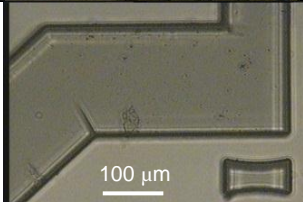
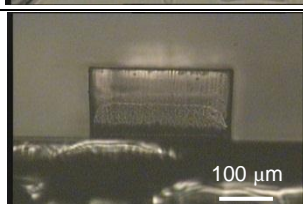
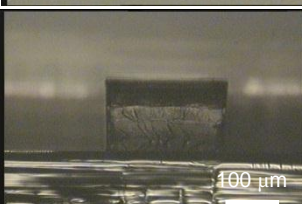
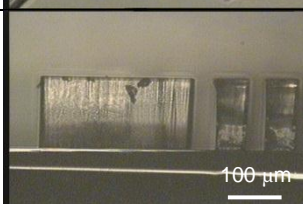
#### 4.1.2. ADERÊNCIA

O SU-8 apresenta uma aderência selectiva aos substratos, em substratos como silício ou ouro tem elevada aderência, o que não se verifica quando é utilizado vidro, nitritos, óxidos, onde esta é bastante fraca e o fotorresiste é facilmente eliminado da superfície durante a fase de revelação. A aderência pode ser melhorada em certos substratos usando um promotor de aderência ou adicionando aditivos ao SU-8 [50].

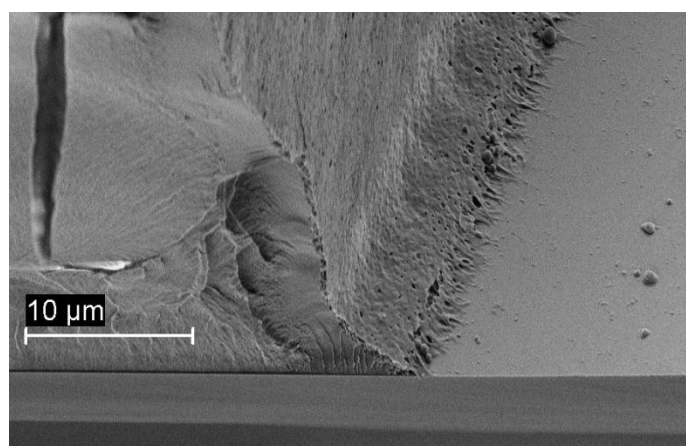
Para além disso, observou-se que há um aumento da aderência do SU-8 ao silício para altas doses de exposição, superiores à tabelada ( $250 \text{ mJ/cm}^2$ ). A Tabela 4.1 mostra imagens microscópicas de estruturas em SU-8 para diferentes doses de exposição. Com  $330 \text{ mJ/cm}^2$

pode observar-se que as estruturas mais pequenas da barra de escala permaneceram intactas após a revelação.

**Tabela 4.1** – Imagens microscópicas das estruturas de SU-8 com diferentes doses de exposição.

	Dose de exposição 209 mJ/cm <sup>2</sup>	Dose de exposição 241 mJ/cm <sup>2</sup>	Dose de exposição 330 mJ/cm <sup>2</sup>
Barras de escala			
Canal e lente de saída			
Perfil			

A Figura 4.1 mostra a boa aderência do SU-8 à camada de silício com 330 mJ/cm<sup>2</sup> de dose de exposição.



**Figura 4.1** – Imagem obtida por SEM que ilustra a aderência da estrutura de SU-8 ao substrato de silício. Este SU-8 teve uma dose de exposição de 330 mJ/cm<sup>2</sup>.

### 4.1.3. ESPESSURA VS. VELOCIDADE DE SPIN COATING

O processamento de SU-8 é muito sensível à variação de certos parâmetros. Foi notada que a variação da temperatura ambiente tem grande influência na viscosidade e, conseqüentemente, no espalhamento do fotorresiste.

O objectivo da microfabricação foi produzir canais de PDMS com 125  $\mu\text{m}$  de profundidade (apropriados para introduzir fibra óptica de 125  $\mu\text{m}$  de diâmetro), ou seja, uma camada de SU-8 com esse mesmo valor em espessura. Foram por isso testadas várias velocidades de *spin-coating* de SU-8, para além do valor teórico tabelado (Figura 3.2). Os resultados obtidos para as diferentes amostras estão apresentados na Tabela 4.2. As medições foram realizadas sob o microscópio óptico em cortes transversais nos chips de PDMS.

Tabela 4.2 – Espessuras obtidas para os vários testes com SU-8.

Bolacha	Temperatura ambiente (°C)	Velocidade (rpm)	Espessura dos canais ( $\mu\text{m}$ )
P0		1450	134 – 152
P1	18,1	1520	127 – 136
P2	18,1	1540	126 – 134
P3	20,8	1530	118 – 126
P4	20,8	1530	114 – 120
P5	20,8	1530	110 – 118

Foi observado que aumentos de 1°C na temperatura ambiente implicavam uma diminuição de aproximadamente 25 rpm no *spin coating*, para obter estruturas com espessuras de aproximadamente 125  $\mu\text{m}$ .

A não uniformidade dos valores obtidos está relacionada com a dificuldade de planarização da camada de SU-8. Devido à rotação a zona central de SU-8 tende a ficar mais fina do que na restante área. Note-se que apenas são consideradas espessuras até à área correspondente a um raio de 4cm da bolacha, visto que a partir daí há maior deposição devido às bordas (*edge bead*) [42].

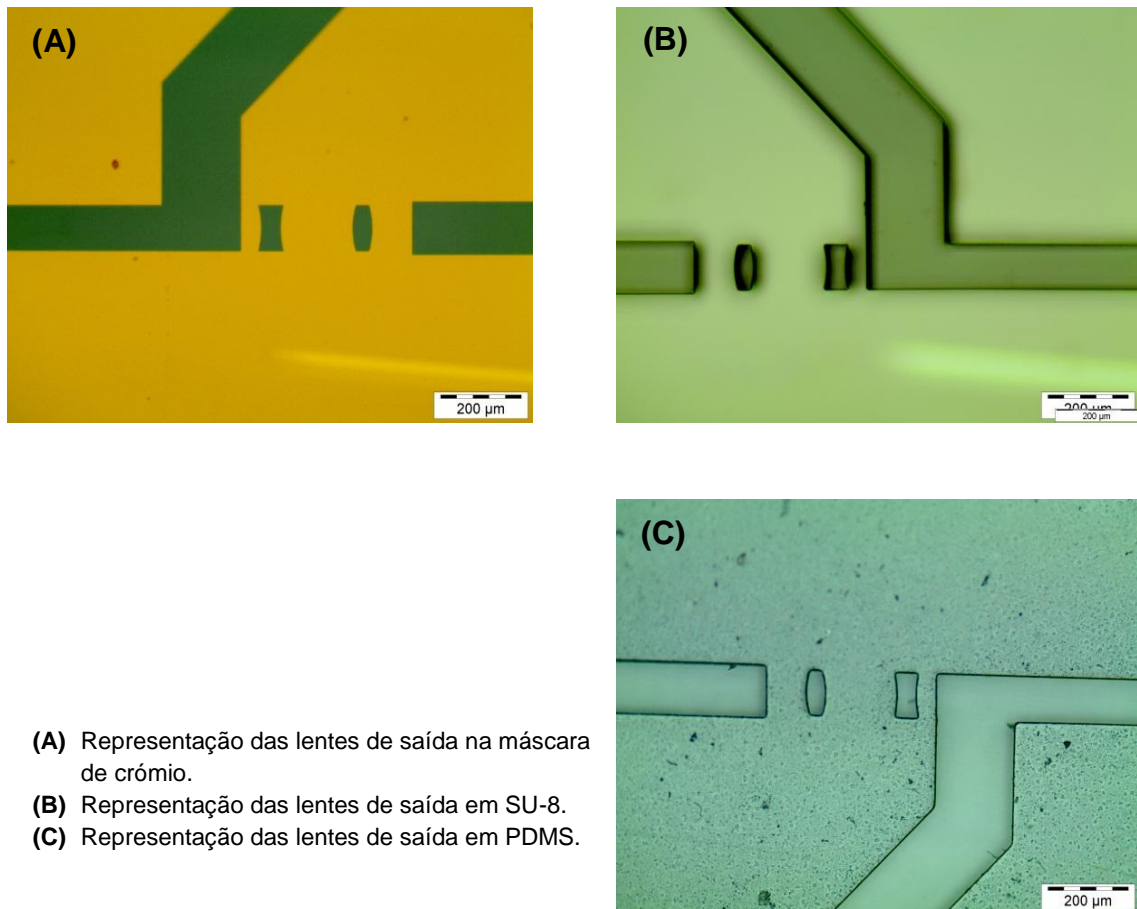
A bolacha P0 foi imediatamente excluída, visto que, tendo a grande diferença entre a espessura e o diâmetro da fibra óptica poderiam comprometer o alinhamento “automático” das fibras de entrada e de saída do dispositivo. Os melhores resultados foram obtidos para a bolacha P3 pois, apesar de o limite inferior ser inferior ao diâmetro da fibra, teve-se em conta a elasticidade do PDMS.

## 4.2. CARACTERIZAÇÃO

### 4.2.1. CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE

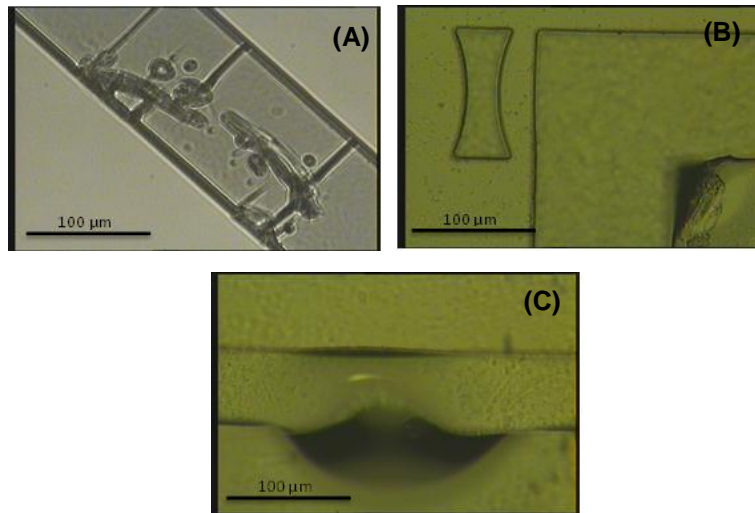
A caracterização da superfície foi feita através da observação da conformação das estruturas ao microscópio óptico e com maior ampliação e resolução através de SEM.

A análise através do microscópio óptico avaliou se as estruturas presentes na máscara de crómio foram reproduzidas perfeitamente no molde de SU-8 e, conseqüentemente, no PDMS, como é exemplificado na Figura 4.2.



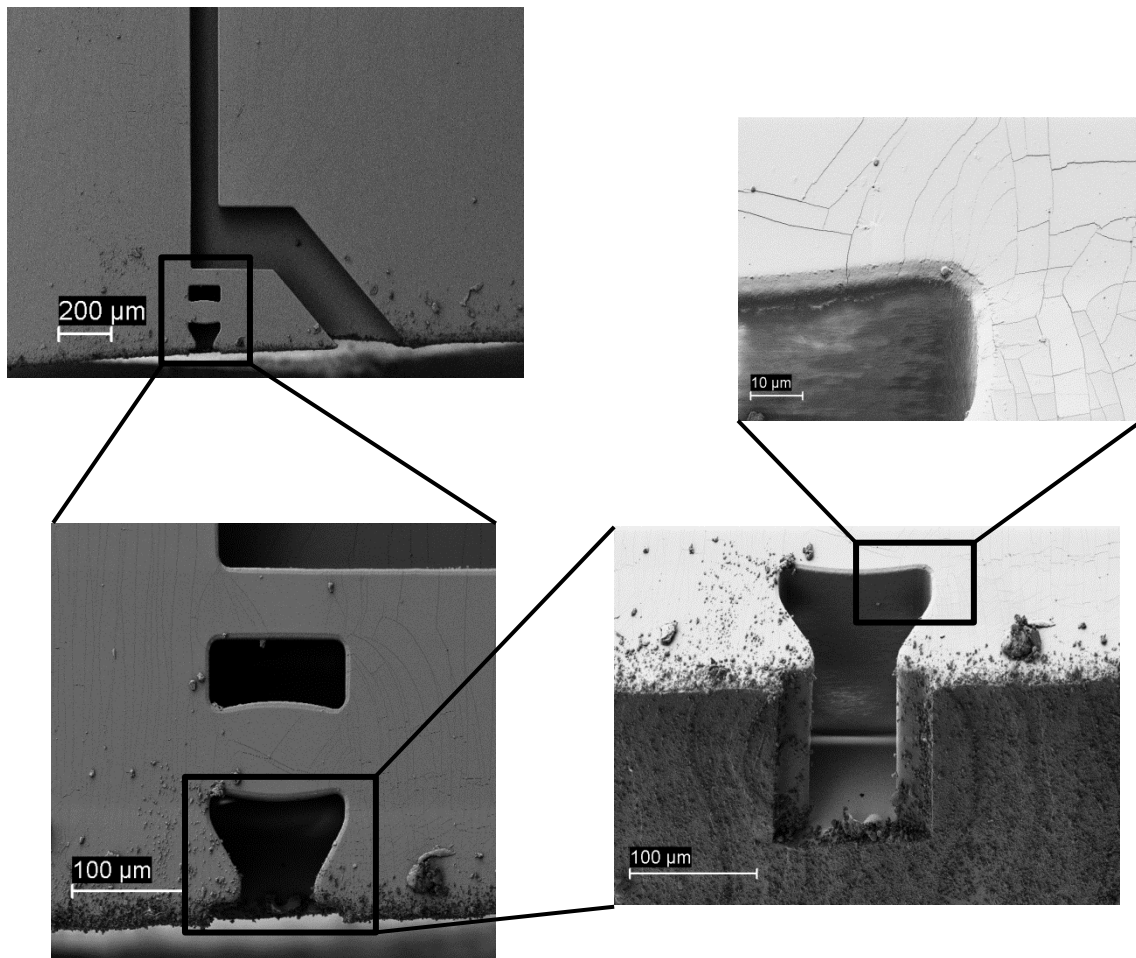
**Figura 4.2** – Imagens microscópicas das lentes de saída nas várias etapas de fabricação: máscara (A), molde de SU-8 (B) e PDMS (C).

A presença de bolhas de ar (derivadas do espalhamento do SU-8) ou de partículas podem levar à malformação do molde de SU-8. Estes defeitos são replicados pelo PDMS e podem comprometer a utilização do dispositivo, como se pode observar nos exemplos presentes na Figura 4.3. As bolhas de ar também podem resultar da fase de cura do PDMS, quando ar fica preso em certas estruturas.



**Figura 4.3** – Imagens microscópicas de malformações obtidas nos moldes de SU-8 (A) e em alguns chips de PDMS (B) e (C).

A análise através de SEM de um chip de PDMS permitiu a observação do tipo de superfície obtida, definição das estruturas resultantes e uma primeira ideia sobre a verticalidade e regularidade das paredes destas estruturas, como se pode observar na Figura 4.4.



**Figura 4.4** – Imagens obtidas por SEM das estruturas e superfície em PDMS.

Como se pode verificar através das imagens de SEM, as estruturas estão perfeitamente definidas, não apresentando irregularidades derivadas do processamento. A superfície do PDMS não está perfeitamente lisa, apresentando pequenas fissuras, provavelmente formadas aquando da remoção do PDMS do molde de SU-8. As partículas presentes na superfície e estruturas são derivadas da facilidade do PDMS em agarrar impurezas. A limpeza com acetona e álcool em ultra-sons resolve este problema.

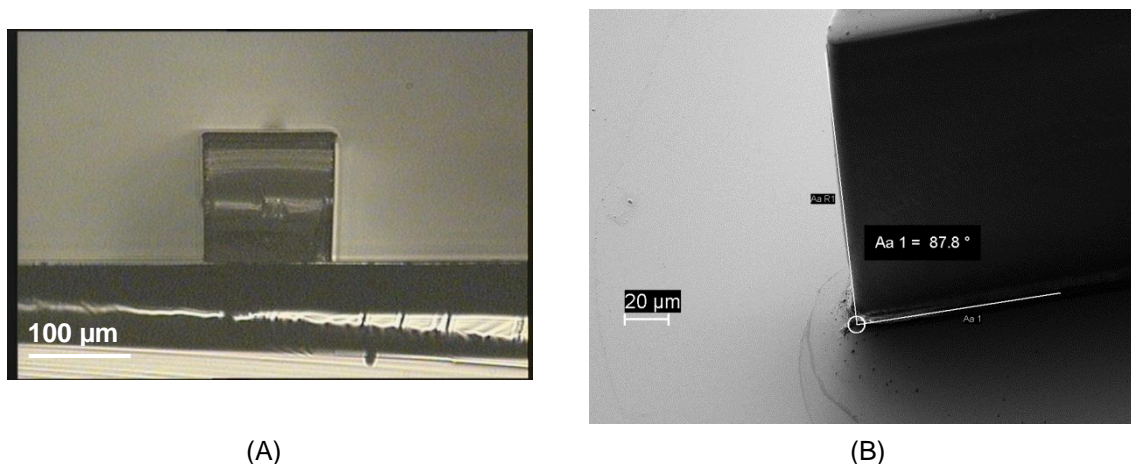
Numa primeira análise pode também afirmar-se que as paredes dos canais e estruturas estão bastante verticais e lisas.

#### 4.2.2. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DAS ESTRUTURAS

O perfil das estruturas obtidas em SU-8 foi analisado com recurso conjunto do perfilómetro (*Ambios Technology, Inc., Santa Cruz, USA*), do microscópio óptico e SEM.

Durante o processo de exposição, grande parte da radiação UV cujo comprimento de onda é inferior a 350 nm é absorvida pela superfície da camada de SU-8. Este facto resulta numa camada de SU-8 em forma de T, ou seja, zona superior mais larga do que a inferior, junto ao substrato, afectando a aderência. Este efeito foi corrigido utilizando um filtro-i durante a exposição, que previne a transmissão de radiação UV abaixo dos 350nm [51].

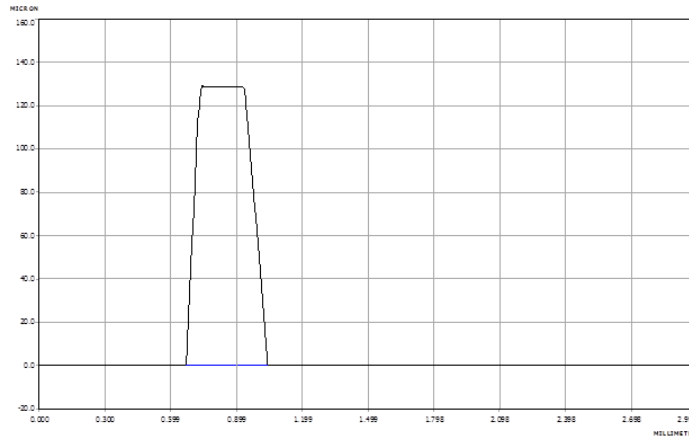
Os resultados obtidos através do microscópio e SEM mostram que as paredes das estruturas contidas nas amostras de SU-8, fabricadas utilizando com filtro-i, são bastante regulares e perpendiculares à superfície do substrato, como se pode observar na Figura 4.5.



**Figura 4.5** – Imagens obtidas pelo microscópio óptico (A) e por SEM (B) que ilustram a verticalidade e homogeneidade das estruturas de SU-8.

De facto, através da imagem obtida por SEM pôde estimar-se o ângulo entre a superfície do substrato e a camada de SU-8. O valor obtido foi de 87,8°.

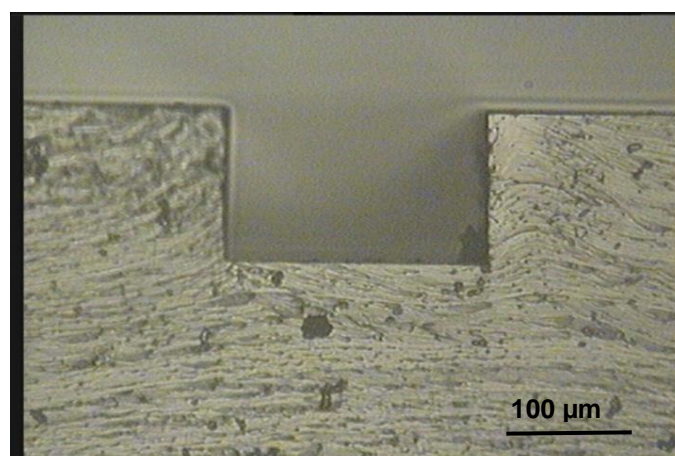
Recorreu-se também à uma análise de perfilómetro. Na Figura 4.6 está representado o perfil obtido. As paredes ligeiramente inclinadas devem-se ao facto de a largura da agulha a impedir de atingir a zona de interface do SU-8 e silício. Pode concluir-se, mais uma vez, que as superfícies obtidas são homogéneas.



**Figura 4.6** – Perfil de uma estrutura de SU-8 obtida através de análise por perfilómetro.

Como se pode observar pelos resultados obtidos pelos três métodos, SEM, microscópio óptico e perfilómetro, o processo de fabricação utilizado produziu estruturas bastante bem definidas. Através da análise da imagem em corte de SU-8, podemos também deduzir que houve uma boa aderência da camada de SU-8 ao substrato de silício.

A análise do perfil dos canais foi feita observando ao microscópio óptico os cortes transversais das estruturas em PDMS (Figura 4.7), já que é um material demasiado mole para ser analisado pelo perfilómetro. Pretendiam-se paredes direitas e regulares, de forma a que não houvesse dificuldade na introdução das fibras de forma a que ficassem alinhadas, nem alteração da propagação da luz ao longo do canal de detecção.



**Figura 4.7** – Imagem microscópica do perfil de um canal de microfluídica em PDMS.

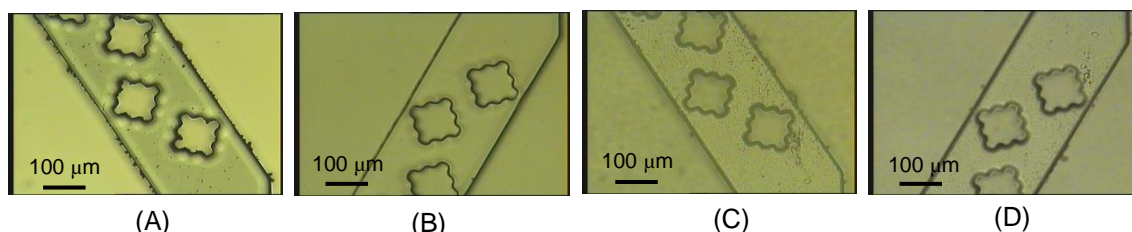
Como se pode observar pela Figura 4.7, a replicação do PDMS foi feita perfeitamente, pois os canais mantêm a verticalidade apresentada pelas estruturas em SU-8.

### 4.3. RESINA EPÓXI

Os moldes de SU-8 tem um tempo de vida relativamente curto, pois foi observado que depois da produção de algumas réplicas de PDMS, as estruturas em SU-8 começavam a perder a aderência à superfície do substrato, sendo necessário produzir de novo moldes em SU-8. Contudo, o SU-8 é um material dispendioso e o seu processo de microfabricação é bastante moroso e tem de ser feito no ambiente de sala limpa.

Como resposta a este problema, integrou-se no processo de fabricação um molde intermédio produzido com uma resina epóxi. Sendo um molde formado por um só material, torna-se mais resistente do que um molde formado pela interface entre o fotorresiste e o substrato.

O processo moldagem é feito recorrendo a uma única réplica de PDMS, derivada do SU-8, na superfície da qual se espalha uma camada de epóxi, que quando curada forma o negativo das estruturas presentes no PDMS, tornando-se assim no novo molde mestre. Este molde pode ser usado para inúmeras replicações sem perder a resolução das estruturas [52]. As estruturas resultantes de cada etapa desse processo estão apresentadas na Figura 4.8.



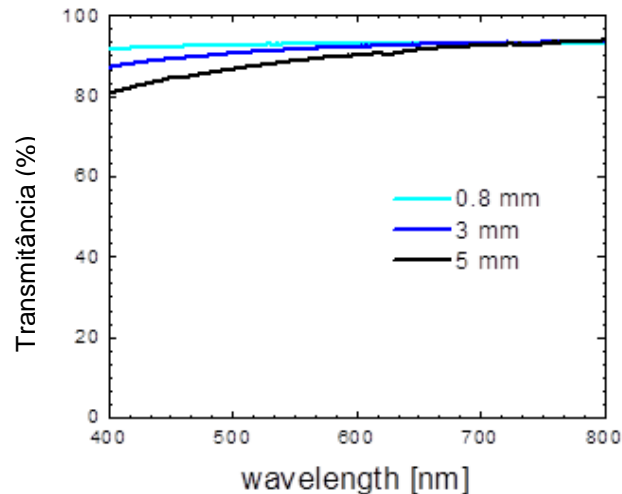
**Figura 4.8** – Imagens microscópicas de topo das estruturas fabricadas. O molde de SU-8 (A) foi utilizado para fabricar o primeiro PDMS (B), que serviu para produzir o molde de resina epóxi (C) para produção em massa de novas estruturas em PDMS (D). Como se pode verificar não houve alteração das conformações originais. Este estudo foi realizado com outra máscara fotolitográfica para fabricação de micromisturadores, uma vez que contem estruturas mais pequenas, requerendo maior resolução.

A introdução desta etapa no processamento trouxe a enorme vantagem de permitir a produção de muitos dispositivos com as mesmas características, de forma a que os testes possam ser feitos com reprodutibilidade.



#### 4.4. PROPRIEDADES ÓPTICAS DO PDMS

A Figura 4.9 ilustra o espectro de transmitância para diferentes espessuras de PDMS. Para uma espessura de 5 mm, a transmitância é de 80%, enquanto que para espessuras de 0,8 mm há transmissão a 90%.

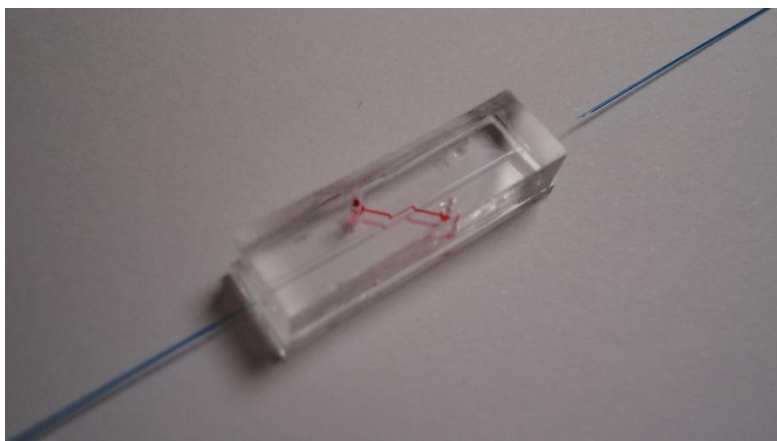


**Figura 4.9** – Espectro de transmitância de camadas de PDMS com várias espessuras.

Para camadas mais espessas, a transmitância para a gama de comprimentos de onda de 400 a 700 nm é bastante inferior do que na gama dos 700 a 800 nm. Contudo, este fenómeno é irrelevante para este trabalho, já que nos dispositivos fabricados a radiação apenas tem de atravessar uma parede de PDMS de 50  $\mu\text{m}$  (parede que separa a ranhura da fibra e o canal de detecção).

#### 4.5. DISPOSITIVO SELADO

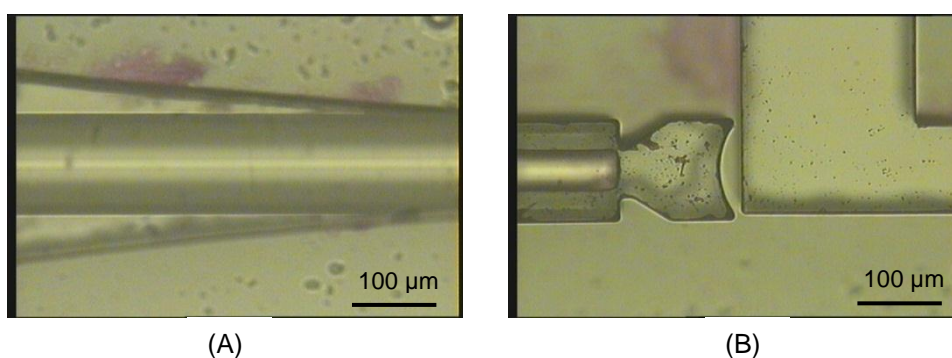
Apesar das fissuras presentes na superfície de PDMS, a selagem através de plasma de oxigénio foi bem-sucedida, sem que houvesse fuga dos canais, como se pode observar na Figura 4.10. Foi inserido corante no canal de detecção de forma a certificar que não houve fuga de fluido.



**Figura 4.10** – Chip de microfluídica preenchido com corante de forma a testar presença de fugas.

A inserção das fibras é um procedimento bastante preciso devido à sua fragilidade.

Na Figura 4.11 estão representadas imagens microscópicas que ilustram o posicionamento da fibra num chip de microfluídica. As impurezas presentes são derivadas do facto de que o chip representado era um dispositivo teste, onde foi inserido corante no canal.



**Figura 4.11** – Imagens microscópicas que mostram o correcto posicionamento da fibra no chip de microfluídica. A imagem (A) representa o início da ranhura e a (B) o final da ranhura com lente.

Aparentemente, os chips mais apropriados para as medições eram os resultantes da bolacha P3. Contudo, com P4, apesar de espessuras inferiores, foi também possível inserir as fibras devido à elasticidade do PDMS. O facto de as espessuras dos canais serem iguais ou ligeiramente inferiores ao diâmetro da fibra garante que as duas fibras (entrada e saída) fiquem alinhadas, maximizando a transferência de sinal. A boa clivagem e limpeza da ponta da fibra são factores extremamente importantes a ter em conta antes da inserção da fibra na ranhura.

Na figura 4.12 está representado um chip com fibras inseridas, pronto a ser utilizado.



**Figura 4.12** – Chip de microfluídica fabricado.



## 5. RESULTADOS DOS TESTES DE DETECÇÃO

No dispositivo de microfluídica fabricado a propagação da luz é feita através de um microcanal de detecção. O transporte da luz recorre à utilização de uma fibra óptica desde a fonte luminosa até ao canal, e depois, do canal até ao fotodetector. As fibras são automaticamente alinhadas, devido ao tipo de conformação impressa no dispositivo de microfluídica, ficando separadas da solução a analisar por uma parede de PDMS de 50  $\mu\text{m}$ .

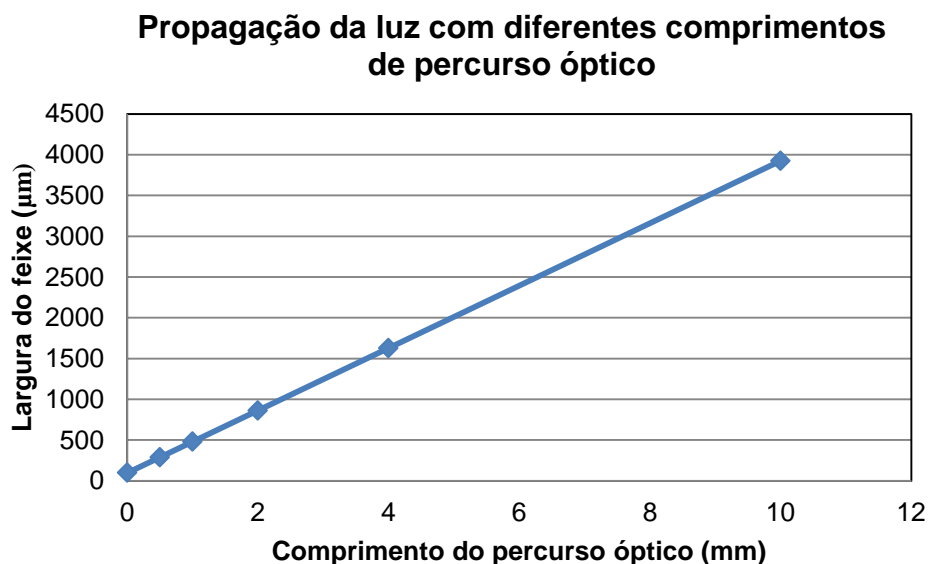
A diferença nos índices de refração entre o PDMS, ar e soluções provoca desvios na propagação da luz proveniente a fibra óptica nas interfaces destes meios, que pode comprometer a quantidade de fluxo luminoso que é recebido pela fibra de saída.

Recorrendo à Lei de Difracção de Snell pode calcular-se a direcção do raio refractado em cada interface. Esta lei relaciona os senos dos ângulos, incidente e refractado, numa interface entre dois meios com índices de refração diferentes. É então descrita como [53],

$$\frac{\text{sen } i}{\text{sen } r} = \frac{n_r}{n_i} \quad (5.1)$$

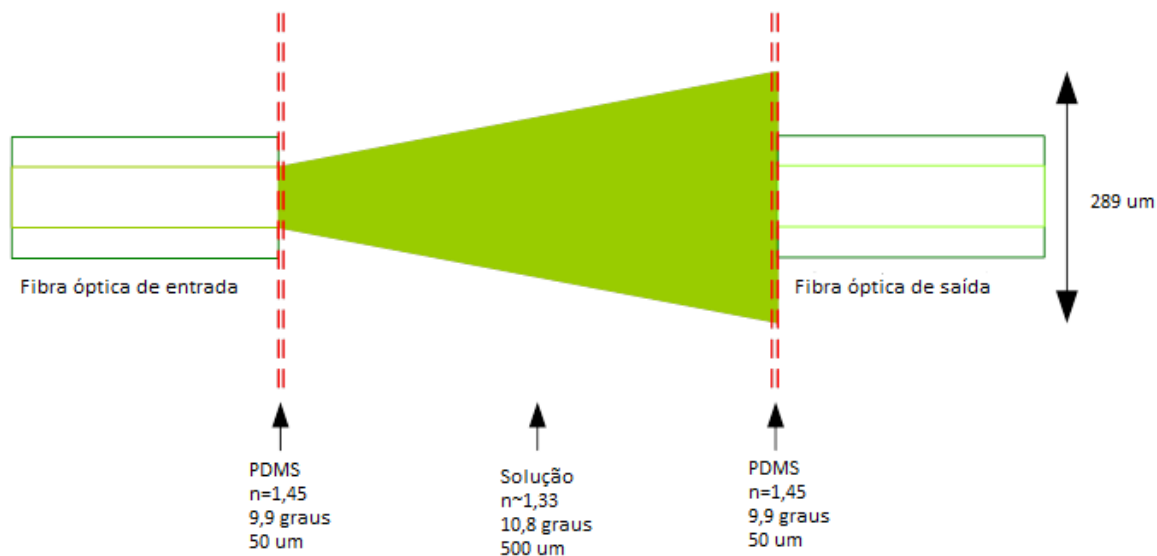
onde  $i$  represento ângulo incidente,  $r$  o ângulo refractado,  $n_i$  o índice de refração do meio incidente e  $n_r$  o índice de refração do meio onde há refração.

Sabendo que a abertura numérica de uma fibra óptica é de 0,25, pôde prever-se a propagação da luz no chip de microfluídica em função do comprimento do caminho óptico, como se pode observar na Figura 5.1.



**Figura 5.1** – Gráfico representativo da largura do feixe originado pela fibra óptica em função dos percursos ópticos presentes nos chips de microfluídica fabricados.

O esquema da Figura 5.2 ilustra o comportamento da radiação ao longo do chip de microfluídica, desde a sua emissão pela fibra de entrada até à fibra de saída.

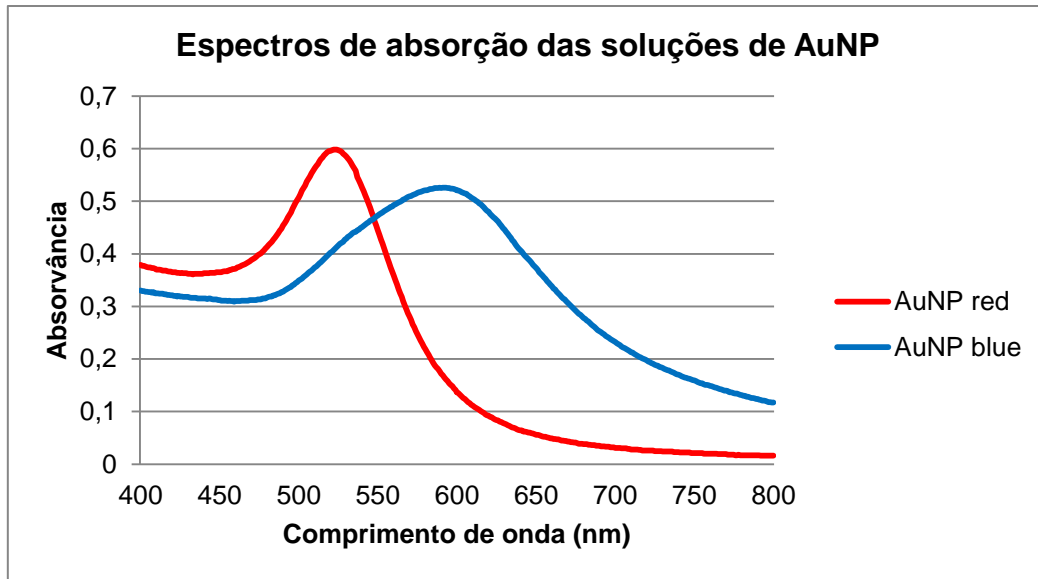


**Figura 5.2** – Representação esquemática da propagação da radiação num chip com percurso óptico de 0,5 mm.

Como se pode observar pelo esquema da Figura 5.2, o feixe luminoso não sofre grande alteração de propagação na interface PDMS – solução, uma vez que, para além dos meios possuírem índices de refração semelhantes (1,45 e 1,33, respectivamente), a parede de PDMS tem uma reduzida espessura.

## 5.1. ESPECTRO DE ABSORÇÃO

Os testes de detecção foram efectuados com soluções de nanopartículas de ouro, uma vez que são bastante mais económicas e mimetizam o comportamento colorimétrico das soluções de nanopartículas funcionalizadas com ADN [26, 54]. Os espectros de absorção das soluções 2,5 nM de nanopartículas de ouro foram efectuados por espectrofotometria UV-visível, antes de se iniciarem os testes. Os espectros obtidos estão apresentados na Figura 5.4.



**Figura 5.3** – Espectros de absorção obtidos para as soluções de AuNP utilizadas nos testes dos microchips.

Como era de esperar, a solução com nanopartículas dispersas, que apresenta uma coloração avermelhada possui grande o pico absorção aos 530 nm, enquanto que a solução de cor azul, com nanopartículas agregadas absorve mais aos 600 nm.

## 5.2. TESTES DE DETECÇÃO COM SOLUÇÕES COLOIDAIS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

Outro factor que determina a quantidade de solução necessária é a presença de volume morto de fluido na agulha da seringa.

As medições efectuadas com água têm como intuito definir uma linha de base, para que todas as posteriores medidas sejam relativas a esta.

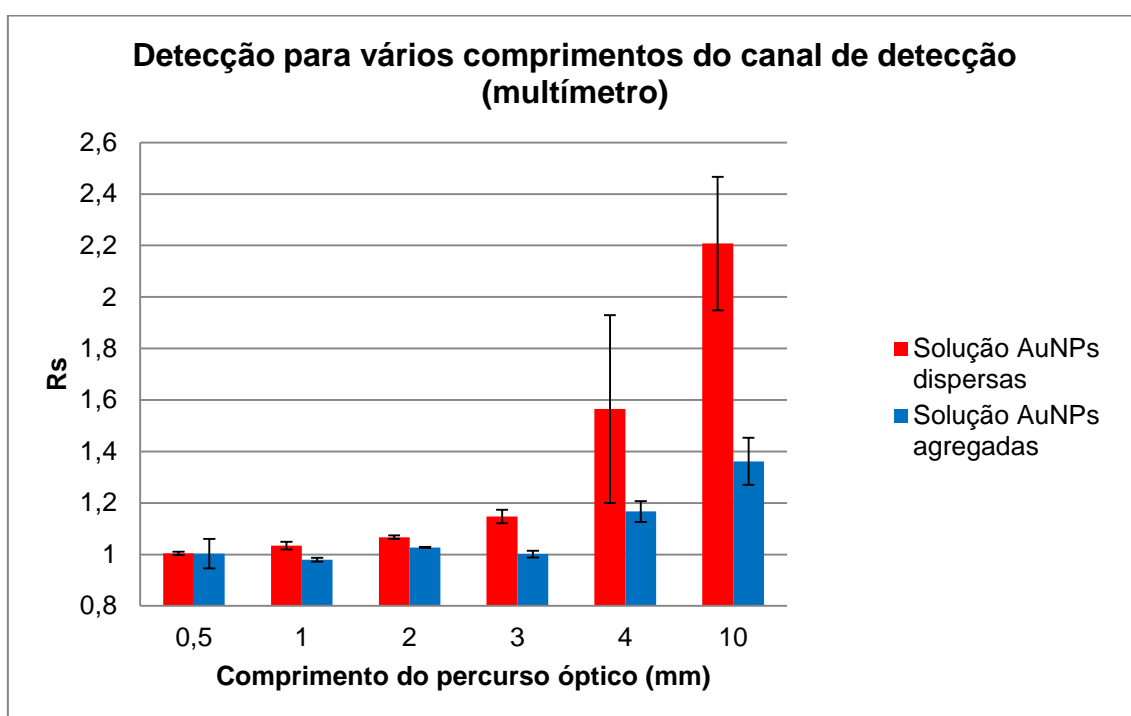
Num mesmo chip de microfluídica foram efectuados três testes com cada solução de forma a verificar a reprodutibilidade do método. Para cada solução foi calculado o respectivo rácio entre os resultados obtidos pelos dois LEDs, normalizado pela linha de base. A equação (5.2) representa o cálculo do rácio  $R_s$  [2],

$$R_s = \frac{Amostra_{vermelho} \times Linha\ de\ Base_{verde}}{Amostra_{verde} \times Linha\ de\ Base_{vermelho}} \quad (5.2)$$

onde, *Amostra* representa a leitura, em tensão ou corrente, da solução a analisar; *Linha de Base* indica o valor obtido para as medições com água, que servem como referência para as soluções; os índices *vermelho* e *verde* indicam o LED utilizado para a leitura em questão.

### 5.2.1. VARIAÇÃO DO COMPRIMENTO DO PERCURSO ÓPTICO

Foram testados chips de microfluídica com percurso óptico de 10, 4, 3, 1, e 0,5 mm de comprimento. Os resultados obtidos para a discriminação das soluções estão ilustrados no gráfico da Figura 5.4. As medições foram efectuadas com um multímetro, em tensão, pois as correntes geradas pelo fotodetector utilizado são na ordem dos nA, impossíveis de detectar com o multímetro.



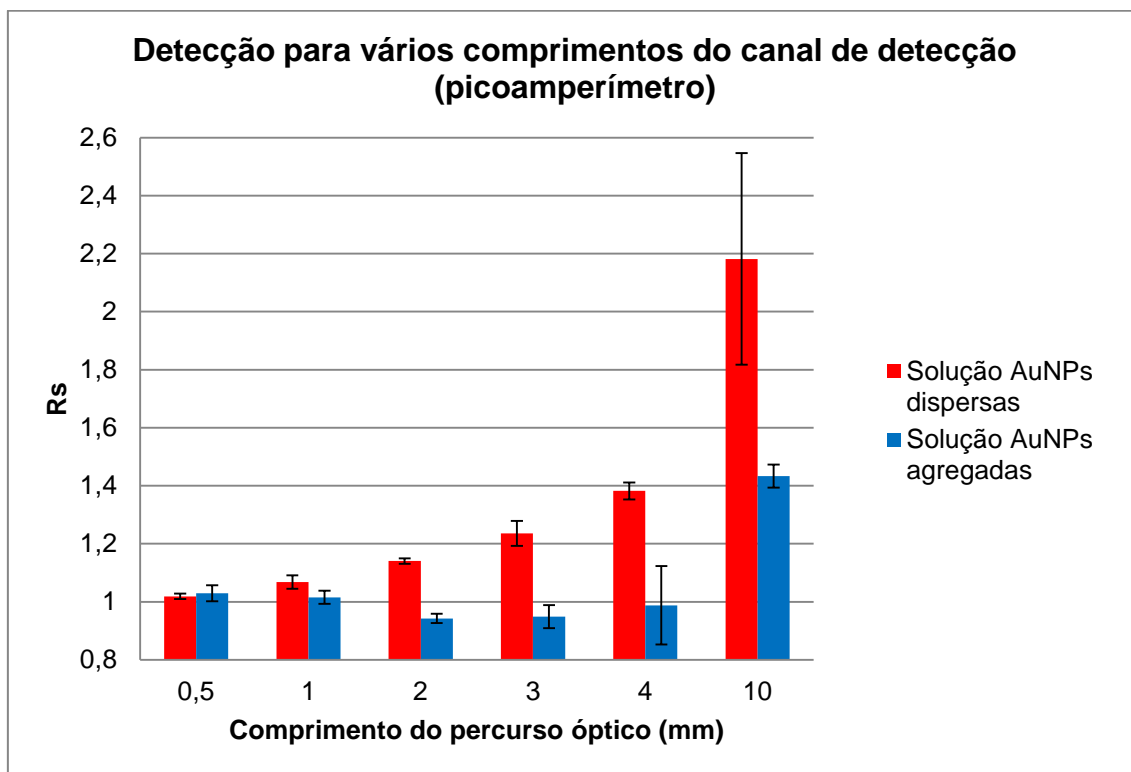
**Figura 5.4** – Resultados da variação do comprimento do percurso óptico. Medições feitas em tensão com recurso ao multímetro.

Pela observação dos valores obtidos, pode afirmar-se que a discriminação entre soluções aumenta com o aumento do caminho óptico. Contudo, para maiores comprimentos há também maior ruído, resultando em medidas com maiores erros associados.

Para percursos ópticos inferiores a 2 mm, esta discriminação não é suficientemente clara. Por essa razão, foi utilizado um picoamperímetro (*Keithley 238 High-Current Source-Measure Unit, Keithley Instruments Connection*), mais preciso do que o multímetro (este não detecta valores de corrente tão baixos), para que se tornasse claro até que valor de comprimento de percurso



óptico há detecção das duas soluções. Os resultados destas novas medições estão apresentados na Figura 5.5.



**Figura 5.5** – Resultados da variação do comprimento do percurso óptico. Medições feitas em corrente com recurso ao picoamperímetro.

Através desta análise (Figura 5.5), pode concluir-se que o valor mínimo de percurso óptico para que haja correcta discriminação dos resultados é de 1 mm, apesar de o facto de os valores, tendo em conta as barras de erros, ficam muito próximos.

O comprimento de percurso óptico óptimo é de 4 mm, tendo em conta o nível de discriminação entre soluções, o erro associado às medições e o volume necessário para a detecção.

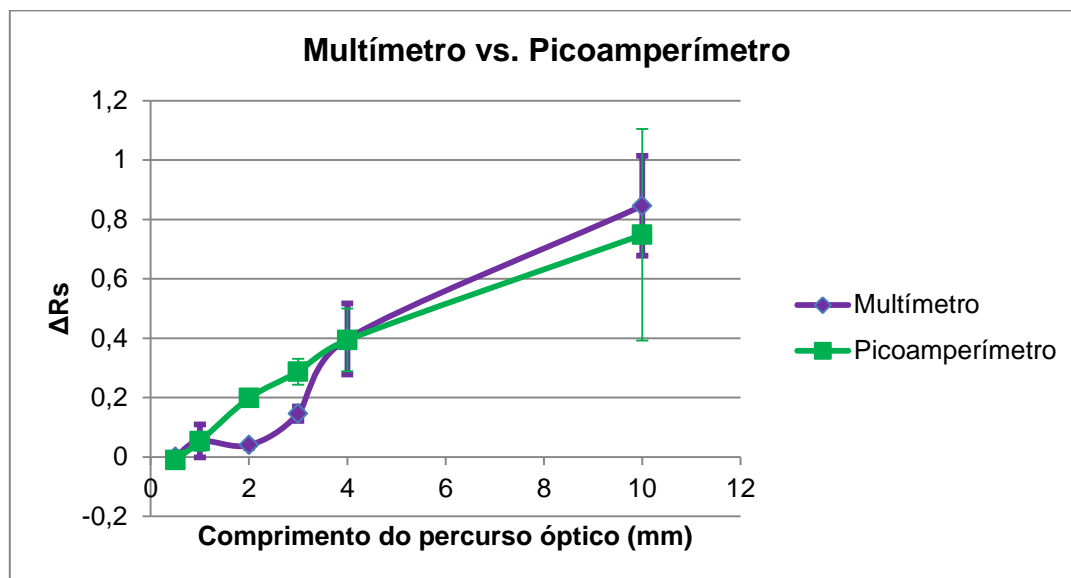
Na tabela 5.1 estão apresentados os volumes de solução necessários correspondentes a cada comprimento de percurso óptico.

**Tabela 5.1** – Volumes de solução necessários para preencherem o canal de detecção em função do comprimento do seu percurso óptico.

Comprimento do percurso óptico (mm)	0,5	1	2	3	4	10
Volume de solução (nL)	315	322	336	351	365	451

Devido às oscilações verificadas entre os dois instrumentos de medição, multímetro e picoamperímetro, foi feito um estudo sobre qual o mais adequado para efectuar as medições de teste.

Na Figura 5.9 estão representados os gráficos referentes às medições com os dois instrumentos.



**Figura 5.6** – Gráficos correspondentes às medições efectuadas com o multímetro e com o pico amperímetro.

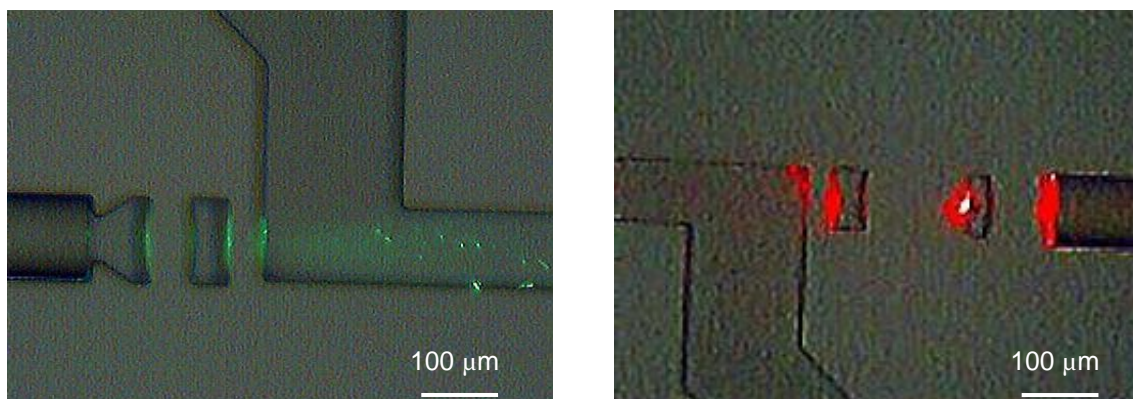
Pode afirmar-se que para caminhos ópticos reduzidos o picoamperímetro faz medições mais precisas, sem grandes variações e erros associados, enquanto que para caminho ópticos superiores a 4 mm, nomeadamente para 10 mm, apresenta elevadas barras de erro. Estas poderão estar associadas às elevadas perdas de luz por dispersão do feixe e, sendo este instrumento extremamente sensível detecta mais facilmente qualquer oscilação de sinal.

O multímetro foi a escolha inicial para instrumento de medida pois pretendia-se simplificar miniaturizar o sistema e este apresenta uma maior portabilidade e um custo inferior do que o picoamperímetro e, tendo em conta as semelhanças na medições para o dispositivo de 4 mm de comprimento, crê-se ser suficientemente bom para posterior utilização.

### 5.2.2. INTRODUÇÃO DE LENTES

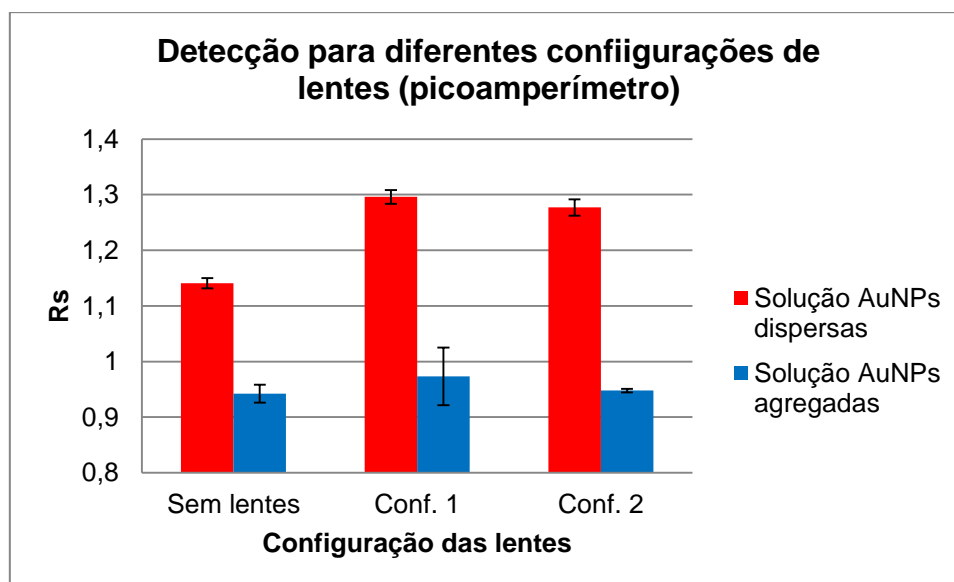
Como se pode observar pela Figura 5.2, mesmo para pequenos percursos ópticos (0,5 mm), a maior parte da radiação é dispersa, pouca conseguindo atingir o núcleo da fibra de saída. As perdas seriam significativamente reduzidas se o feixe fosse focado para o canal. Nesse contexto foram incorporadas no *design* do chip de microfluídica, microlentes 2D, que tirando partido das diferenças entre o índice de refração entre o ar e o PDMS, diminuíssem a abertura do feixe, focando-o para o canal de detecção,

Na Figura 5.6 estão representadas fotografias exemplificativas do comportamento de algumas lentes.



**Figura 5.7** – Propagação do feixe luminoso num chip de microfluídica com recurso a lentes. Imagem à esquerda: microlente biconvexa de PDMS (configuração 2) de entrada com LED verde; imagem da direita: lentes de saída com utilização do LED vermelho.

Os testes das configurações 1 (microlente bicôncava de ar) e 2 (microlente biconvexa de PDMS) foram efectuados com recurso aos chips de percurso óptico de 2 mm. As medições foram feitas em corrente com recurso a um picoamperímetro de forma a apresentarem uma maior precisão e os resultados estão representados na Figura 5.7.



**Figura 5.8** – Resultados obtidos para diferentes configurações de chips com 2 mm de percurso óptico: sem lentes, microlente bicôncava de PDMS (Conf. 1) e microlente biconvexa de ar (Conf. 2).

Como se pode observar, ambas as configurações de lentes aumentam significativamente a discriminação entre as duas soluções, apesar de a sua presença aumentar o número de interfaces de meios.

Pode concluir-se que a introdução de uma microlente biconvexa de ar (conf. 2) é a que apresenta melhores resultados, já que é a que resulta numa maior discriminação de soluções (discriminação 0,006 superior à configuração 1). Para além disso, tem reduzido valor de erro associado, quando comparado com o erro associado a mesma medida para a configuração 1. Este, por ser superior apenas para uma solução, pode estar relacionado com alguma alteração da mesma, aquando da medição. Para além de agregação, a solução também vai sofrendo sedimentação ao longo do tempo, portanto é necessário ter um maior controlo na duração das medições.

### 5.3. ESPECTROFOTÓMETRO VS. CHIP DE MICROFLUÍDICA FABRICADO

Foi feita uma comparação entre os resultados obtidos para o espectrofotómetro e para os obtidos com o chip de microfluídica produzido com o mesmo percurso óptico (10mm).

O cálculo dos rácios do espectro de absorção das soluções do espectrofotómetro foi feito através do valor da absorvância a 525 nm (verde) e a 625 nm (vermelho).

A variação dos rácios para os dois elementos está apresentada no gráfico da Figura 5.8.

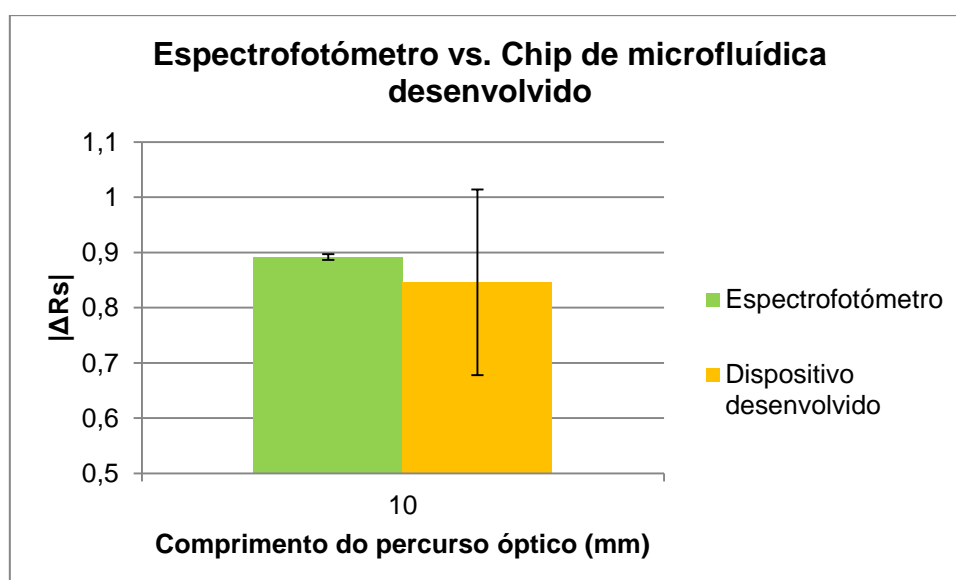


Figura 5.9 – Variação dos rácios para o espectrofotómetro e para o microchip com percurso óptico de 10 mm.

De notar que, o cálculo do módulo da variação dos rácios está relacionado com o facto de os dados provenientes dos espectrofotómetro serem de absorção de radiação, enquanto que os do sistema desenvolvido são de radiação transmitida. Portanto, a variação dos rácios tem sinal diferente.

Como se pode observar, a discriminação obtida pelo dispositivo fabricado é bastante satisfatória, muito próxima da obtida pelo espectrofotómetro. A ter em conta que como a comparação é feita com o chip com percurso óptico de 10 mm, sem microlentes, há muitas perdas de luz derivadas da grande dispersão do feixe emitido. O que intui que para um percurso óptico inferior (2 ou 4 mm) e introdução de microlentes, para além da maior discriminação, também se reduziriam os erros associados. De enfatizar também, que com 10 mm de caminho óptico apenas é necessário um volume de detecção de 451 nL, quantidade aproximadamente 100 vezes inferior à necessária para o espectrofotómetro. Para além disso, a nova plataforma tem um custo bastante menor do que o espectrofotómetro.

Notou-se, por vezes, que ao longo das sucessivas medições, os canais começavam a acumular resíduos em certos locais, podendo os erros associados derivar deste facto. Assim sendo, os dispositivos fabricados devem ser descartáveis.



## 6. CONCLUSÃO

Foi desenvolvido um dispositivo de microfluídica que, integrado na respectiva plataforma optoelectrónica, detecta alterações colorimétricas de soluções de nanopartículas de ouro de concentração de 2,5 nM.

O dispositivo de microfluídica foi fabricado recorrendo a métodos litográficos. Foi processado um molde com o fotorresiste SU-8 em substrato de silício, pelo método de fotolitografia. Todo este processo foi otimizado pois verificaram-se algumas variações em relação aos parâmetros inicialmente estipulados. De entre essas variações destacam-se a velocidade de espalhamento do fotorresiste na bolacha de silício e a dose de exposição do fotorresiste. A velocidade utilizada para obter uma determinada espessura da camada de fotorresiste é dependente da viscosidade deste, que é facilmente afectada pela temperatura ambiente. Um aumento de temperatura, traduz-se num aumento de viscosidade, o que implica que a velocidade de rotação tenha de ser reduzida (aumento de 1°C implicou uma diminuição de aproximadamente 25rpm). A dose certa de exposição do fotorresiste resulta na correcta reticulação das cadeias do polímero nas zonas expostas, impedindo que a zona inferior da camada (em contacto com o substrato) receba menos energia e, portanto, não sofra o mesmo grau de posterior polimerização. Para camadas mais espessas, é necessário aumentar a dose de exposição. Este factor é determinante para que as paredes das estruturas formadas fiquem regulares e verticais.

As estruturas de SU-8 resultantes do processo de fotolitografia foram depois utilizadas como molde para PDMS. Neste processo deve-se desgaseificar o polímero, para evitar que as bolhas de ar influenciem a perfeita replicação do molde pelo PDMS. Caso contrário, os chips resultantes podem ficar inutilizáveis. As replicações consecutivas pelo PDMS danificaram as estruturas de SU-8 fabricadas. Foi por isso, incluído no processo um molde intermédio produzido através de uma resina epóxi. Esta, sendo mais resistente, permitiu a produção de dispositivos em massa.

A caracterização das estruturas obtidas em SU-8 e PDMS foi feita com recurso ao microscópio óptico, ao microscópio electrónico de varrimento e ao perfilómetro. Com estes métodos de análise podemos concluir que os métodos de fabricação utilizados produziram estruturas com bastante definição e espessura desejada.

O tratamento das superfícies de PDMS e vidro por plasma de oxigénio resultou na irreversível e completa união entre elas, não permitindo a fuga de fluido dos canais fabricados.

Foram fabricadas várias configurações de microchips com percursos ópticos diferentes e várias configurações de lentes, de forma a fazer um estudo sobre quais os elementos que maximizam a detecção.

Os dispositivos desenvolvidos foram então integrados numa plataforma optoelectrónica constituída por uma fonte luminosa e um fotodetector.

Concluiu-se que o caminho óptico mínimo ideal tem um comprimento de 4 mm. Isto porque apesar de serem detectadas alterações colorimétricas com comprimentos inferiores, há que ter em conta que este tipo de dispositivos é normalmente utilizado para detecção de doenças e, por isso, devem ser minimizados os erros associados às medições.

A introdução de microlentes nas configurações dos chips (biconvexas de ar e bicôncavas de PDMS), apesar de representarem um aumento do número de interfaces dos meios (que poderiam resultar numa maior dispersão do feixe incidente), provocou um aumento do sinal obtido e uma maior discriminação das soluções.

Apesar de em testes preliminares, a plataforma desenvolvida ter demonstrado ter uma discriminação de soluções ligeiramente inferior, com maior erro associado, em comparação com o espectrofotómetro (para 10 mm de comprimento de percurso óptico), mostrou possuir potencial para ser utilizado em testes reais. A grande diminuição de volume de detecção (de 70  $\mu\text{L}$  para 365 nL), a simplicidade de utilização e o facto possuir uma instrumentação bastante mais económica, são factores de bastante peso para apoiar este resultado.

No entanto, o facto de as soluções terem sido injectadas com seringas, fez com que houvesse uma grande quantidade de volume morto no sistema, aumentando a quantidade de solução necessária para efectuar a medição.

Por esta razão não foi possível testar o dispositivo desenvolvido com solução de nanopartículas de ouro funcionalizadas com ADN, já que pouca quantidade pode ser dispensada para testes.

De uma forma geral, o objectivo proposto para esta Dissertação de Mestrado foi cumprido, tendo-se fabricado um dispositivo de microfluídica para futura detecção de ADN. Os testes com solução de nanopartículas de ouro (com as mesmas propriedades ópticas que as mesmas contendo ADN) revelaram que o sistema funciona e tem grande potencial para ser aplicado em material biológico.

## **6.1. TRABALHO FUTURO**

O dispositivo fabricado ainda possui algumas limitações. Como objectivos futuros pretende-se:

- Testar outras configurações fabricadas, nomeadamente a configuração 3 (microlente convexa de ar e PDMS) de entrada e configurações com largura de canal superior a 100  $\mu\text{m}$ .
- Diminuição a quantidade de volume morto necessário para cada teste.



- Tornar todo o sistema mais *user-friendly* e portátil.
- Integração com sistemas de mistura de reagentes, hibridação e PCR com a finalidade de constituir um *Lab-on-a-Chip*.
- Desenvolvimento de *software* que faça várias leituras por teste e tratamento de resultados.



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Teles, F.R.R. and L.P. Fonseca, *Trends in DNA biosensors*. Talanta, 2008. **77**(2): p. 606-623.
2. Silva, L.B., et al., *Portable optoelectronic biosensing platform for identification of mycobacteria from the Mycobacterium tuberculosis complex*. Biosensors and Bioelectronics, 2011. **26**(5): p. 2012-2017.
3. Marks, R.S., *Handbook of biosensors and biochips*. Vol. 1. 2007: John Wiley & Sons. 1500.
4. Zhai, J., H. Cui, and R. Yang, *DNA based biosensors*. Biotechnology Advances, 1997. **15**(1): p. 43-58.
5. Malhotra, B.D. and A. Chaubey, *Biosensors for clinical diagnostics industry*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2003. **91**(1-3): p. 117-127.
6. Passarge, E., *Color Atlas of Genetics*. 3rd ed. 2006: Thieme. 496.
7. Lewis, R., *Human Genetics - Concepts and Applications*. 5th ed. 2003: The McGraw-Hill Companies.
8. Watson, J.D. and F.H.C. Crick, *THE STRUCTURE OF DNA*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1953. **18**: p. 123-131.
9. Strachan, T. and A.P. Read, *Human Molecular Genetics*. 2nd ed. 1999, New York: Wiley-Liss.
10. Stryer, L., J.M. Berg, and J.L. Tymoczko, *Biochemistry*. 5th ed. 2002, New York: W H Freeman.
11. Ma, Z., et al., *Optical DNA detection based on gold nanorods aggregation*. Analytica Chimica Acta, 2010. **673**(2): p. 179-184.
12. Dolatabadi, J.E.N., et al., *Optical and electrochemical DNA nanobiosensors*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2011. **30**(3): p. 459-472.
13. Vercootere, W. and M. Akeson, *Biosensors for DNA sequence detection*. Current Opinion in Chemical Biology, 2002. **6**(6): p. 816-822.
14. Rashid, B., *BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004. **56**(11): p. 1565-1586.
15. Ligler, F.S., *Perspective on Optical Biosensors and Integrated Sensor Systems*. Analytical Chemistry, 2008. **81**(2): p. 519-526.
16. Kuswandi, B., et al., *Optical sensing systems for microfluidic devices: A review*. Analytica Chimica Acta, 2007. **601**(2): p. 141-155.

17. W, F., *DNA-gold conjugates for the detection of specific molecular interactions*. Reviews in Molecular Biotechnology, 2001. **82**(1): p. 37-46.
18. Auffan, M., et al., *Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective*. Nat Nano, 2009. **4**(10): p. 634-641.
19. *Making and conjugating colloidal metals*. [cited 2012 11-04-2012]; Available from: [http://www.ansci.wisc.edu/facstaff/Faculty/pages/albrecht/albrecht\\_web/Programs/microscopy/colloid.html](http://www.ansci.wisc.edu/facstaff/Faculty/pages/albrecht/albrecht_web/Programs/microscopy/colloid.html).
20. Ghosh, S.K. and T. Pal, *Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications*. Chemical Reviews, 2007. **107**(11): p. 4797-4862.
21. Jain, P., et al., *Review of Some Interesting Surface Plasmon Resonance-enhanced Properties of Noble Metal Nanoparticles and Their Applications to Biosystems*. Plasmonics, 2007. **2**(3): p. 107-118.
22. Homola, J., S.S. Yee, and G. Gauglitz, *Surface plasmon resonance sensors: review*. Sensors and Actuators B: Chemical, 1999. **54**(1-2): p. 3-15.
23. Willets, K.A. and R.P. Van Duyne, *Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing*. Annual Review of Physical Chemistry, 2007. **58**(1): p. 267-297.
24. Sato, K., K. Hosokawa, and M. Maeda, *Colorimetric Biosensors Based on DNA-nanoparticle Conjugates*. Analytical Sciences, 2007. **23**(1): p. 17-20.
25. Mirkin, C.A., et al., *A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 607-609.
26. Baptista, P., et al., *Colorimetric detection of eukaryotic gene expression with DNA-derivatized gold nanoparticles*. Journal of Biotechnology, 2005. **119**(2): p. 111-117.
27. Baptista, P., et al., *Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **391**(3): p. 943-950.
28. Larginho, M. and P.V. Baptista, *Gold and silver nanoparticles for clinical diagnostics — From genomics to proteomics*. Journal of Proteomics, (0).
29. Eaton, P., et al., *Imaging Gold Nanoparticles for DNA Sequence Recognition in Biomedical Applications*. NanoBioscience, IEEE Transactions on, 2007. **6**(4): p. 282-288.
30. Bruus, H., *Theoretical Microfluidics*. 2008, New York: Oxford University Press Inc.
31. Beebe, D.J., G.A. Mensing, and G.M. Walker, *PHYSICS AND APPLICATIONS OF MICROFLUIDICS IN BIOLOGY*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2002. **4**(1): p. 261-286.
32. Streeter, V.L. and E.B. Wylie, *Mecânica dos Fluidos*. 7ª ed. 1982, São Paulo: McGraw-Hill Ltda.

33. Becker, H. and C. Gärtner, *Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications*. ELECTROPHORESIS, 2000. **21**(1): p. 12-26.
34. Sun, Y. and Y.C. Kwok, *Polymeric microfluidic system for DNA analysis*. Analytica Chimica Acta, 2006. **556**(1): p. 80-96.
35. McDonald, J.C., et al., *Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)*. ELECTROPHORESIS, 2000. **21**(1): p. 27-40.
36. Mogensen, K.B., et al., *Monolithic integration of optical waveguides for absorbance detection in microfabricated electrophoresis devices*. ELECTROPHORESIS, 2001. **22**(18): p. 3930-3938.
37. Verpoorte, E., et al., *A silicon flow cell for optical detection in miniaturized total chemical analysis systems*. Sensors and Actuators B: Chemical, 1992. **6**(1-3): p. 66-70.
38. Llobera, A., et al., *Multiple internal reflection poly(dimethylsiloxane) systems for optical sensing*. Lab on a Chip, 2007. **7**(11): p. 1560-1566.
39. Camou, S., H. Fujita, and T. Fujii, *PDMS 2D optical lens integrated with microfluidic channels: principle and characterization*. Lab on a Chip, 2003. **3**(1).
40. Fleger, M. and A. Neyer, *PDMS microfluidic chip with integrated waveguides for optical detection*. Microelectronic Engineering, 2006. **83**(4-9): p. 1291-1293.
41. Hammacher, J., et al., *Stress engineering and mechanical properties of SU-8-layers for mechanical applications*. Microsystem Technologies, 2008. **14**(9): p. 1515-1523.
42. Campo, A.d. and C. Greiner, *SU-8: a photoresist for high-aspect-ratio and 3D submicron lithography*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2007. **17**(6): p. R81.
43. Kuncova-Kallio, J. and P.J. Kallio. *PDMS and its Suitability for Analytical Microfluidic Devices*. in *Engineering in Medicine and Biology Society, 2006. EMBS '06. 28th Annual International Conference of the IEEE*. 2006.
44. Xia, Y. and G.M. Whitesides, *SOFT LITHOGRAPHY*. Annual Review of Materials Science, 1998. **28**(1): p. 153-184.
45. Franssila, S., *Introduction to Microfabrication*. 2004, West Sussex, England: John Wiley & Sons, Ltd.
46. Mortini, B., *Photosensitive resists for optical lithography*. Comptes Rendus Physique, 2006. **7**(8): p. 924-930.
47. Cutkosky, M.R. *PDMS Process Notes*. 2008 [12-03-2012]; Available from: <http://bdml.stanford.edu/twiki/bin/view/Rise/PDMSProceSS.html>.
48. Wu, Z., et al., *Polymer microchips bonded by O<sub>2</sub>-plasma activation*. ELECTROPHORESIS, 2002. **23**(5): p. 782-790.

49. Schroder, D.K., *Semiconductor Material and Device Characterization*. 3rd ed. 2006, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
50. Conradie, E.H. and D.F. Moore, *SU-8 thick photoresist processing as a functional material for MEMS applications*. JOURNAL OF MICROMECHANICS AND MICROENGINEERING, 2002: p. 368-374.
51. Lee, S.J., et al. *Top-edge profile control for SU-8 structural photoresist*. in *University/Government/Industry Microelectronics Symposium, 2003. Proceedings of the 15th Biennial*. 2003.
52. Xia, Y., et al., *Replica molding using polymeric materials: A practical step toward nanomanufacturing*. Advanced Materials, 1997. **9**(2): p. 147-149.
53. Freeman, M.H. and C.C. Hull, *Optics*. 11th ed. 2003, Spain: Butterworth-Heinmann. 17-19.
54. Baptista, P.V., et al., *Gold-Nanoparticle-Probe-Based Assay for Rapid and Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in Clinical Samples*. Clinical Chemistry, 2006. **52**(7): p. 1433-1434.