

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Modelagem, simulação e desenvolvimento da rede de microcanais de um sistema de diluição para uso na fabricação de biossensores.

RENATA CORRÊA VICENTINO

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Estadual de Maringá como parte integrante do requisito para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química, área de Modelagem, Controle e Automação de Processos.

**Maringá- PR,
Fevereiro de 2017**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Modelagem, simulação e desenvolvimento da rede de microcanais de um sistema de diluição para uso na fabricação de biossensores.

Renata Corrêa Vicentino

Engenheira Química, Unioeste, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Marcos de Souza

Coorientador: Prof. Flávio Faria de Moraes, PhD.

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Estadual de Maringá como parte integrante do requisito para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química, área de Modelagem, Controle e Automação de Processos.

Maringá-PR,
Fevereiro de 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

V633m Vicentino, Renata Corrêa
Modelagem, simulação e desenvolvimento da rede de microcanais de um sistema de diluição para uso na fabricação de biossensores / Renata Corrêa Vicentino. -- Maringá, 2017.
110 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcos de Souza.
Co-orientador(a): Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação Engenharia Química, 2017.

1. Microcanais. 2. Microdiluição. 3. *Soft-litografia*. 4. PDMS. 5. Marcadores de câncer. 6. COMSOL. I. Souza, Marcos de, orient. II. Moraes, Flávio Faria de, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação Em Engenharia Química. IV. Título.

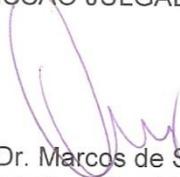
CDD 21.ed. 660.284

AHS-CRB-9/1065

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Dissertação de Mestrado apresentada por
Renata Corrêa Vicentino perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado
em Engenharia Química em 24 de fevereiro de 2017.

COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Marcos de Souza
Orientador / Presidente



Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes
Membro



Prof. Dr. Paulo Eduardo Polon
Membro



Prof. Dr. Johnny Paulo Monteiro
Membro

Aos meus pais, que possibilitaram minha formação intelectual durante toda minha vida e que fizeram, a seus modos, ser quem eu sou hoje.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo incentivo, apoio, suporte e fé em mim;

A meus companheiros de estudo e mestrado, em especial a Taysa Braniz, Gimerson Weigert e Natalia Beluci pelas muitas horas de companheirismo e aprendizado;

Ao Paulo Buzzetti pela parceria e realização dos testes e análises laboratoriais;

Ao meu orientador Marcos de Souza por seus ensinamentos, auxílios e direcionamentos durante toda a pesquisa;

A meus tantos amigos que me ajudaram a manter a calma e relaxar, e ver que a vida é maravilhosa por tê-los por perto;

E a Deus por TUDO!

*“Todos esses que aí estão
Atravancando meu caminho
Eles passarão...
Eu passarinho!”*

Mario Quintana

Modelagem, simulação e desenvolvimento da rede de microcanais de um sistema de diluição para uso na fabricação de biossensores.

Autor: Renata Corrêa Vicentino

Orientador: Marcos de Souza

Coorientador: Flávio Faria de Moraes

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, Bloco E-46, Sala 09; CEP 87020-900 – Maringá-PR-Brasil, defendida em 24 de Fevereiro de 2017.

RESUMO

Dispositivos microfluídicos e tecnologia lab-on-a-chip vêm se mostrando cada vez mais promissores. São aparelhos de micro dimensões com os quais se projetam sistemas analíticos, dispositivos biomédicos, ferramentas para química e bioquímica e sistemas para investigação fundamental, áreas crescentes de aplicações onde esses dispositivos podem ser empregados. A obtenção de gradientes de concentração bem definidos para estudos em sistemas com dimensões características na faixa de pequenos micra é um dos desafios que podem ser resolvidos por meio de dispositivos microfluídicos. Estes sistemas têm potencial para uma vasta gama de aplicações. Modificar dispositivos para microdimensões ocasiona diversos benefícios, principalmente a redução de custos.

Este trabalho tem o intuito de auxiliar no desenvolvimento de biossensores portáteis para a dosagem de marcadores de câncer. Para isso foi elaborado e produzido diversos sistemas de microcanais com sistema de diluição.

Durante a pesquisa foram projetados dispositivos para análises distintas. Inicialmente eles foram elaborados em AutoCAD 3D e importados no programa COMSOL *Multiphysics*[®] para realização de simulações. Após, foram redesenhados em CorelDRAW X8 para impressão de fotolitos para a construção dos dispositivos em laboratório. No laboratório foi utilizada a técnica de *soft-litografia* para construção dos microdispositivos em polidimetilsiloxano (PDMS). Foi utilizada Albumina de Soro Bovino (BSA) em solução tampão para avaliação da diluição e construção de gradientes de concentração.

Alguns dispositivos foram projetados para verificação do comprimento necessário para mistura completa das substâncias analisadas, os quais possuíam duas entradas e duas saídas. Posteriormente foram projetados dispositivos para a avaliação do comportamento do fluido em relação à divisão do fluxo entre os microcanais, os quais puderam ser usados para verificação do comprimento de mistura novamente. Estes dispositivos foram fabricados inicialmente com duas entradas e três saídas, depois com duas entradas e quatro saídas, e finalmente, projetou-se um sistema de microdiluição contendo cinco valores de concentração de saída, indo do mais concentrado (concentração inicial de BSA) até o mais diluído (solução tampão). Como dispositivos contendo n saídas possuem $n - 2$ etapas de diluição, o dispositivo com cinco saídas possui três etapas de diluição.

Foi verificado que, para se obter o perfil de diluição requerido, a separação das correntes em cada etapa é mais eficiente quando possuem o formato em Y ao invés da câmara retangular observada na maioria dos trabalhos, pois assim se garante uma melhor separação do fluido.

As simulações tridimensionais efetuadas por meio do programa COMSOL *Multiphysics*[®] auxiliaram muito no projeto do microssistema de diluição. Os resultados das concentrações de saída, obtidos a partir do COMSOL, para o microdispositivo contendo cinco concentrações de saída com a separação das correntes de escoamento realizadas por meio de junções de microcanais em formato Y, apresentaram grande melhora em relação ao *design* anterior e ficaram próximos aos resultados obtidos experimentalmente. Esse foi o sistema que apresentou os melhores resultados.

O dispositivo promoveu um gradiente de concentração possibilitando a realização de leitura de concentrações bastante reduzidas. Isto indica que ele pode ser acoplado a um biossensor em arranjos de nanoburacos que visa a detecção de pequenas concentrações de marcadores.

Este estudo abre portas para uma maior exploração da fluidodinâmica computacional com aplicações para sistemas biológicos e químicos.

Palavras chave: Microcanais; Microdiluição; *Soft-litografia*; PDMS; Marcadores de câncer; COMSOL.

Modeling, simulation and development of the microchannel network of a dilution system for use in the manufacture of biosensors.

Author: Renata Corrêa Vicentino

Supervisor: Marcos de Souza

Supervisor: Flávio Farias de Moraes

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; State University of Maringá; Colombo Av., 5790, E-46-09; ZIP 87020-900 – Maringá-PR-Brazil, presented in February, 24rd 2017.

ABSTRACT

Microfluidic devices and lab-on-a-chip technology have shown to be increasingly promising. They are devices of micro dimensions with which are projected analytical systems, biomedical devices, tools for chemistry and biochemistry and systems for fundamental investigation, increasing areas of applications where these devices can be used. Obtaining well defined concentration gradients for studies in systems with characteristic dimensions in the small micron range is one of the challenges that can be solved by means of microfluidic devices. These systems have the potential for a wide range of applications. Modifying devices for microdimensions brings several benefits, especially cost savings.

This work aims to assist in the development of portable biosensors for the determination of cancer markers. For this purpose, several microchannel systems with dilution system were developed and produced.

During the research, devices were designed for different analyzes. Initially they were developed in AutoCAD 3D and imported into the COMSOL Multiphysics® program for simulations. Afterwards, they were redesigned in CorelDRAW X8 for printing of photoliths for the construction of the devices in the laboratory. In the laboratory, the soft-lithography technique was used to construct the microdevices in polydimethylsiloxane (PDMS). Bovine Serum Albumin (BSA) was used in buffer solution for the evaluation of dilution and construction of concentration gradients.

Some devices were designed to verify the length required for complete mixing of the analyzed substances, which had two inputs and two outputs. Subsequently, devices were designed to evaluate the behavior of the fluid in relation to the division of the flow between

the microchannels, which could be used to check the mixing length again. These devices were initially manufactured with two inputs and three outputs, then with two inputs and four outputs, and finally a microdilution system containing five output concentration values, ranging from the most concentrated (initial BSA concentration) to the more diluted (buffer solution). As devices containing n outputs have $n-2$ dilution steps, the five-output device has three dilution steps.

It was found that, in order to obtain the required dilution profile, the separation of the chains in each step is more efficient when they have the Y-shape instead of the rectangular chamber observed in most of the works, because this guarantees a better separation of the fluid.

The three-dimensional simulations carried out through the COMSOL Multiphysics® program greatly aid in the design of the dilution microsystem. The results of the output concentrations obtained from the COMSOL for the microdevice containing five output concentrations with the separation of the flow currents performed by means of microchannel junctions in Y format showed great improvement over the previous design and were close to the results obtained experimentally. This was the system that presented the best results.

The device promoted a concentration gradient allowing the reading of very low concentrations. This indicates that it can be coupled to a biosensor in nanobox arrangements that aims to detect small concentrations of markers.

This study opens the door to further exploration of computational fluid dynamics with applications for biological and chemical systems.

Keywords: Microchannels; Microdilution; Soft-Lithography; PDMS; Cancer markers; COMSOL;

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplo de dispositivo de tecnologia lab-on-a-chip. Construção de um chip de proteína eletroquímica: (a) estrutura decomposta ilustrada camada por camada; (b) imagem do chip (R.E., eletrodo de referência, A.E., eletrodo auxiliar, W.E., eletrodo de trabalho); (c) chip montado em um suporte de fichas. Foto vista do lado oposto.	21
Figura 2 - Exemplos de microdispositivos. Dispositivo gerador de gradiente de concentração (CGG) fabricado por meio da técnica de <i>soft-litografia</i> . (a) CGG para perfil de concentração em forma de dente de serra e (b) CGG para perfil de concentração em forma de sino duplo.....	25
Figura 3 - Microfabricação fotolitográfica de canais em silício.....	29
Figura 4 - Volume de controle.....	42
Figura 5 – Coordenadas do microcanal.....	71
Figura 6 - Dimensões requeridas dos microcanais devido à disposição dos nanoburacos para leitura de concentração por Laser.	73
Figura 7 - Microdispositivos desenhados em AutoCAD com comprimento de canal de mistura de (A) 6000 μm , (B) 4500 μm e (C) 1000 μm	74
Figura 8 - Microdispositivos com duas entradas e três saídas, com canal central bifurcado, tendo comprimento de mistura de (A) 9960 μm e (B) 16000 μm	75
Figura 9 - Microdispositivos com duas entradas e quatro saídas tendo comprimento de mistura de (A) 9960 μm e (B) 16000 μm	75
Figura 10 - Microdispositivo com duas entradas e cinco saídas com canais de mistura de 25000 μm de comprimento e junção dos microcanais no formato de Y.	76
Figura 11 - Microdispositivo para construção do gradiente de concentração final e dosagem simultânea de amostra, tendo comprimento de mistura de 25000 μm e junção dos microcanais em formato de Y.	77
Figura 12 - Esquema de impulsão dos fluidos nos dispositivos microfluídico e coleta posterior passagem.	78
Figura 13 – Variação de concentração no dispositivo microfluídico de 6000 μm de comprimento de contato e difusividade constante de $5,9 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$	82
Figura 14 - Variação de concentração no dispositivo microfluídico de 4500 μm de comprimento de contato e difusividade constante de $5,9 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$	83

Figura 15 - Variação de concentração no dispositivo microfluídico de 1000 μm de comprimento de contato e difusividade constante de $5,9 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$	83
Figura 16 - Microdispositivos projetados em CorelDRAW com duas entradas e duas saídas, com comprimentos de mistura de (A) 6000 μm , (B) 4500 μm e (C) 1000 μm	84
Figura 17 – Sistema de microcanais de comprimento 9962 μm com duas entradas e três saídas com canal central bifurcado.	86
Figura 18 - Sistema de microcanais de comprimento 16000 μm com duas entradas e três saídas com canal central bifurcado.	87
Figura 19 - Microdispositivos projetados em CorelDRAW com duas entradas e três saídas, com canal central bifurcado, tendo comprimento de mistura de (A) 9962 μm e (B) 16000 μm	88
Figura 20 - Sistema de microcanais de comprimento 9962 μm com duas entradas e quatro saídas.	91
Figura 21 - Sistema de microcanais de comprimento 16000 μm com duas entradas e quatro saídas.	91
Figura 22 - Microdispositivos projetados em CorelDRAW com duas entradas e quatro saídas tendo comprimento de mistura de (A) 9960 μm e (B) 16000 μm	92
Figura 23 - Remodelagem dos <i>designs</i> da etapa de encontro dos microfluidos.	95
Figura 24 - Sistema de microcanais de comprimento 25000 μm com duas entradas e cinco saídas.	96
Figura 25 – Microdispositivo projetado em CorelDRAW com comprimento de mistura de 25000 μm tendo duas entradas e cinco saídas.	97
Figura 26 - Microdispositivo em PDMS com comprimento de mistura de 25000 μm tendo duas entradas e cinco saídas.	97
Figura 27 - Gráfico de comparação entre concentrações de saída esperadas e reais a partir do teste laboratorial.	99
Figura 28 – Microdispositivo em 3D para construção do gradiente de concentração final e leitura simultânea de amostra tendo comprimento de mistura de 25000 μm e aproximação dos nanoburacos para leitura a laser.	101
Figura 29 - Microdispositivo projetado em CorelDRAW com comprimento de mistura de 25000 μm tendo duas entradas e seis saídas, entrada e saída para amostra de análise, mais espaço determinado para leitura de concentrações a laser.	102

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Biomarcadores associados ao diagnóstico e prognóstico de câncer.	36
Tabela 2 - Equações de balanço e constitutivas relacionadas com os respectivos transportes.	41
Tabela 3 - Exemplos de fenômenos acoplados e dispositivos que se pode modelar usando o módulo microfluídico.....	54
Tabela 4 - Escala de vários fenômenos físicos com comprimento (L) e consequências para dispositivos microfluídicos.	55
Tabela 5 - Dados iniciais e de entrada do fluxo.	67
Tabela 6 - Concentrações de saídas dos microcanais com comprimentos de contato de 6000 μm , 4500 μm e 1000 μm e variação do coeficiente de difusividade em comparação com as concentrações encontradas nos testes laboratoriais.....	84
Tabela 7 - Concentrações de saída do sistema de microcanais de duas entradas e três saídas com comprimentos de contato de 9962 μm em comparação com as concentrações encontradas nos testes laboratoriais.	88
Tabela 8 - Concentrações de saída do sistema de microcanais de duas entradas e três saídas com comprimentos de contato de 16000 μm em comparação com as concentrações encontradas nos testes laboratoriais.	90
Tabela 9 - Concentrações de saída do sistema de microcanais de duas entradas e quatro saídas com comprimentos de contato de 9962 μm em comparação com as concentrações encontradas nos testes laboratoriais.	93
Tabela 10 - Concentrações de saída do sistema de microcanais de duas entradas e quatro saídas com comprimentos de contato de 16000 μm em comparação com as concentrações encontradas nos testes laboratoriais.	93
Tabela 11 - Concentrações de saída do sistema de microcanais de duas entradas e cinco saídas com comprimentos de contato de 25000 μm em comparação com as concentrações encontradas nos testes laboratoriais.	98

NOTAÇÕES

a	Raio da partícula, (m)
A	Área do canal, (m ²)
c	Concentração molar, (mol/L)
c_0	Concentração molar inicial, (mol/L)
c_A	Concentração molar da espécie A, (mol/L)
C_p	Capacidade de calor específico a pressão constante (J/kgK)
d	Diâmetro do tubo, (m)
d_h	Diâmetro hidráulico do tubo, (m)
D	Coeficiente de difusão, (m ² /s)
D	Dimensão de difusão,
D_{AB}	Coeficiente de difusão entre as espécies A e B, (m ² /s)
f	Força motriz vetorial
F	Forças externas aplicadas ao campo, (N/m ³)
g	Gravidade, (m/s ²)
h	Altura do canal
I	Matriz identidade, (—)
j_i	Fluxo vetorial mássico da espécie i, (kg/m ² s)
$j_{x,y}$	Fluxo na direção y através da superfície perpendicular a direção x.
J_i	Fluxo vetorial molar da espécie i, (mol/m ² s)
k	Constante de Boltzman k ($k = 1,373 \times 10^{-23}$ J/K)
l	Distância de difusão perpendicular ao sentido do fluxo, (m)
L	Comprimento característico, (m)
L_e	Comprimento para desenvolver 99% do fluxo, (m)
L_i	Coeficiente cinético da espécie i,
$N_{A,z}$	Fluxo molar combinado da espécie A na direção z, (mol/m ² s)
p	Pressão, (Pa)
P	Perímetro do canal, (m)
q	Vetor fluxo de calor, (W/m ²)
Q	Contém as fontes de calor, (W/m ³)
Q_0	Vazão de entrada, (m ³ /s)

R	Taxa de reação da espécie, (mol/m ³ s)
R_A	Taxa de geração da espécie A, (mol/m ³ s)
S	Tensor taxa de deformação, (—)
t	Tempo, (s)
T	Temperatura, (K)
\mathbf{u}	Vetor velocidade, (m/s)
\mathbf{v}	Velocidade mássica média, (kg/s)
v	Velocidade do fluido, (m/s)
x_A	Fração molar da espécie A, (—)
w	Largura do canal, (m)
x, y, z	Coordenadas cartesianas
r, θ, z	Coordenadas cilíndricas
r, θ, ϕ	Coordenadas esféricas
β	Razão de aspecto, (—)
δ	Tensor unitário com components δ_{ij} ,
Δ	Varição,
η	Viscosidade absoluta do solvent,
κ	Viscosidade dilatacional, (kg/m. s)
λ	Caminho livre médio das moléculas, (m)
μ	Viscosidade, (kg/m. s)
π	Tensor fluxo molecular de momento.
ρ	Massa específica, (kg/m ³)
τ	Tensor fluxo viscoso ou tensor de cisalhamento, (Pa)
τ_{yx}	Tensão de cisalhamento ou fluxo de momento de direção x na direção positiva de y
φ	Quantidade de entrada e/ou saída do sistema
ϕ	Tensor fluxo de momento combinado
ω_A	Fração mássica da espécie A, (—)
∇	Gradiente
∂	Derivada parcial

SUBSCRITOS

i, j	Espécies em sistemas multicomponentes.
A, B	Espécies A e B em sistemas binários

SIGLAS

A.E.	Eletrodo Auxiliar
BSA	Albumina de Soro Bovino
CE	Eletroforese capilar
CGG	Concentration gradient generator (Gerador de gradiente de concentração)
EOF	Fluxo eletro-osmótico.
GC	Cromatografia gasosa.
K_n	Número de Knudsen
LC	Cromatografia líquida.
MEMS	Sistemas microeletromecânicos
PBS	Solução tampão fosfato-salino
PDMS	Polidimetilsiloxano
Pe	Número de Péclet
PMMA	Polimetilmetacrilato
PPF	Plasma-polymerized film (Filme polimerizado com plasma)
Re	Número de Reynolds
R.E.	Eletrodo de Referência
SAM	Self-assembled monolayers (técnicas de monocamadas automontadas)
W.E.	Eletrodo de trabalho

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	19
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Motivação	21
1.2. Objetivo	24
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1. Dispositivos Microfluídicos.....	25
2.1.1. Técnicas de Fabricação	28
2.1.1.1. Fotolitografia	28
2.1.1.2. Deposição química a vapor	29
2.1.1.3. Litografia branda.....	30
2.1.1.4. Microusinagem a laser	30
2.1.1.5. Microusinagem por eletrodescarga.....	30
2.1.2. Aplicações	30
2.1.3. PDMS.....	34
2.2. Microdispositivos para Detecção de Marcadores de Câncer	35
2.3. Microfabricação por <i>soft-litografia</i>	37
2.3.1. Prototipagem rápida.....	38
2.3.2. Replicação de moldagem.....	38
2.3.3. Vedação.....	39
2.4. Revisão para Modelagem.....	39
2.4.1. Fenômenos de Transporte	39
2.4.1.1. Interação entre os Fenômenos de Transporte	40
2.4.1.2. Transporte de massa.....	43
2.4.1.3. Transporte de quantidade de movimento	45
2.4.1.4. Hipótese do Contínuo.....	49

2.4.1.5. Caracterização do Fluxo.....	49
2.4.2. COMSOL Multiphysics®	51
2.4.2.1. Módulo CFD – Fluidodinâmica Computacional	52
2.4.2.2. Módulo Microfluídico	53
2.4.2.3. Teoria Geral de Fluxo de Fase Única	57
2.4.2.4. Transporte de Espécies Químicas	60
CAPÍTULO III	66
3. MATERIAIS E MÉTODOS	66
3.1. Construção do Dispositivo Microfluídico e Método de Análise de Amostra	67
CAPÍTULO IV	70
4. DESENVOLVIMENTO.....	70
4.1. Modelagem matemática.....	70
4.2. Desenvolvimento dos dispositivos microfluídicos.....	72
4.3. Simulação em COMSOL <i>Multiphysics</i> ®	78
CAPÍTULO V.....	81
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	81
5.1. Análise I – Teste de difusividade	81
5.2. Análise II – Teste de comportamento microfluídico.....	85
5.3. Análise III – Mudança no <i>Design</i>	94
CAPÍTULO VI	103
6. CONCLUSÕES.....	103
CAPITULO VII.....	104
7. SUGESTÕES DE PROXIMOS TRABALHOS	104
REFERÊNCIAS	105

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Sistemas analíticos, dispositivos biomédicos, ferramentas para química e bioquímica e sistemas para investigação fundamental são as crescentes aplicações atuais onde dispositivos microfluídicos estão sendo empregados (CHEN; LAM, 2003; KAMHOLZ; YAGER, 2001; MCDONALD et al., 2000; VIRK; HOLDO, 2008). Os dispositivos microfluídicos vêm revolucionando variadas áreas da ciência e tecnologia devido às suas diferentes aplicações, como em ensaios de DNA, seleção de alto rendimento, armazenagem e separação de células, entre outras funções que necessitam de alto rendimento (KAMHOLZ et al., 1999; KAMHOLZ; YAGER, 2001; SAHU; GOLIA; SEN, 2012). Estes dispositivos juntamente com a tecnologia lab-on-a-chip desempenharam um considerável impacto em análises químicas, aplicações biomédicas e sínteses químicas (DERTINGER et al., 2001; MILOŽIČ et al., 2014). A tecnologia lab-on-a-chip proporciona a capacidade de produzir sistemas miniaturizados (como sistemas microfluídicos e microeletromecânicos) capazes de automatizar e integrar mais de uma etapa de um ensaio em um mesmo dispositivo de tamanho muito reduzido. A obtenção de gradientes de concentração bem definidos para estudos em sistemas com dimensões características na faixa de pequenos micra é um dos desafios que podem ser resolvidos por meio de dispositivos microfluídicos. Como exemplo, células biológicas sensíveis a variações de concentrações muito baixas necessitam de gradientes de concentração com resolução de pequenas ordens (entre 10 e 100 μm) (PARENT; DEVREOTES, 1999).

O campo da microfluídica vem evoluindo à medida que engenheiros e cientistas exploram novos caminhos tecnológicos para a fabricação de equipamentos para a indústria microeletrônica. Estas tecnologias permitiram a integração de estruturas complexas de dimensões na ordem de micron e submicron com sistemas eletrônicos fabricados a baixo custo. Os dispositivos mecânicos fabricados utilizando estas tecnologias se tornaram conhecidos como sistemas microeletromecânicos (MEMS), enquanto os dispositivos fluídicos são vulgarmente designados por sistemas microfluídicos ou dispositivos “lab-on-a-chip” (COMSOL, 2014a; MATSUMOTO; COLGATE, 1990; YAO et al., 2006).

De acordo com Reis, Giné and Kronka (1988), a análise química por injeção em fluxo contínuo para a detecção de espécies altamente diluídas consiste na introdução de solução

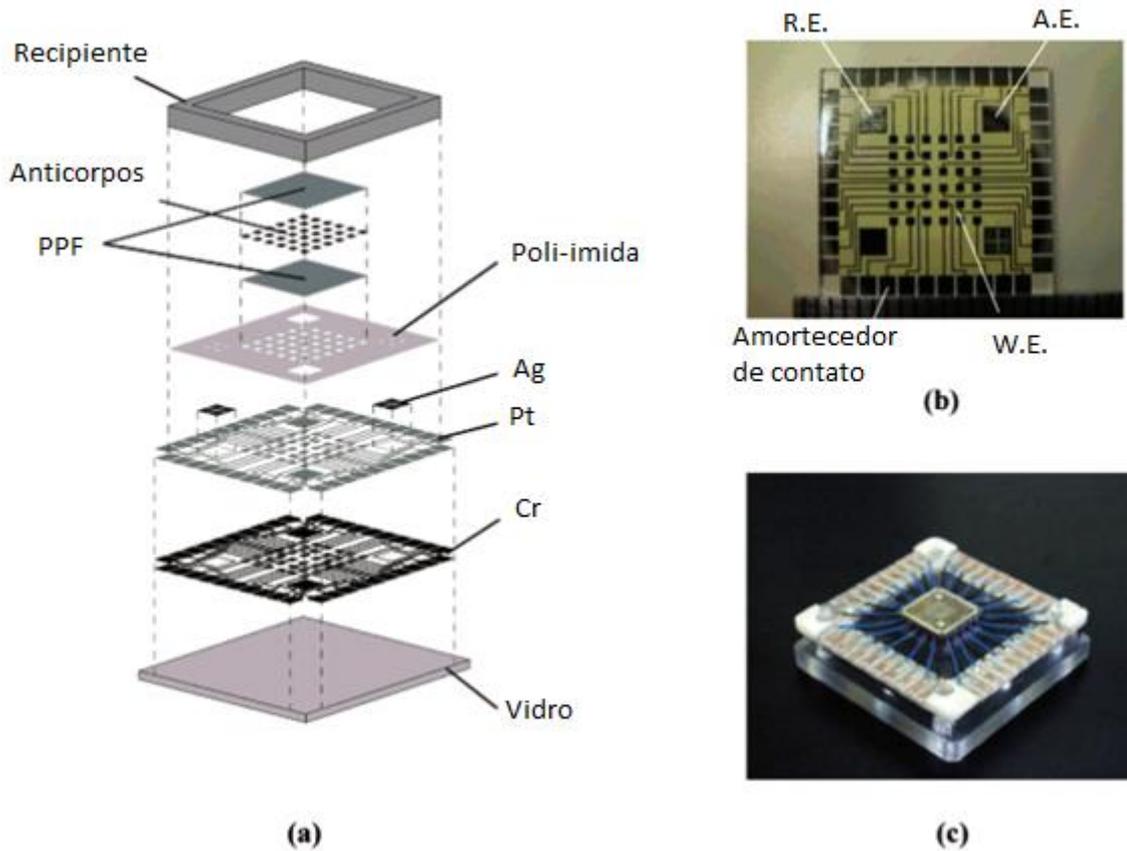
aquosa contendo a amostra em um fluido carregador até um detector, podendo, nesse trajeto, ocorrer reação, separação, concentração, entre outros fenômenos. Nesse processo ocorrem as etapas de propulsão dos fluidos, injeção da amostra, reação e detecção, sendo que nem todas as etapas são obrigatoriamente presentes. Esse processo proposto em 1975 por Ruzicka e Hansen, e implementado no Brasil em 1976 por pesquisadores do CENA/USP (BERGAMIN; REIS; ZAGATTO, 1978; RUZICKA; STEWART; ZAGATTO, 1976; STEWART et al., 1976), é amplamente utilizado em diversas áreas analíticas.

Quando se tem pequenas escalas, diferentes efeitos do fluxo se tornam mais relevantes, tornando alguns processos ineficientes e outros inúteis. O fluxo de fluidos em sistemas microfluídicos é inteiramente dominado por forças viscosas, tornando a difusão o mecanismo de mistura predominante. Além disso, uma fração maior de moléculas é perdida para a adsorção superficial à medida que os dispositivos diminuem de tamanho (BRODY; KAMHOLZ; YAGER, 1997). A investigação de características de mistura em micromisturadores passivos de tipo T variando o fluxo e parâmetros geométricos mostrou que o comprimento de mistura no canal é altamente dependente da variação do número de Reynolds, do número de Péclet e da relação de aspecto geométrica (VIRK; HOLDO, 2008).

As atividades microfluídicas de pesquisa estão mudando os processos de diagnóstico médico, como a análise de DNA, e estão estimulando o desenvolvimento de produtos comerciais bem sucedidos (COMSOL, 2014a; KAMHOLZ et al., 1999; MCDONALD et al., 2000; SAHU; GOLIA; SEN, 2012; SIA; WHITESIDES, 2003). Micromisturadores, sensores de fluxo ou dispositivos capilares de separação, muitas vezes são componentes de sistemas complexos de microdispositivos integrados, permitindo, por exemplo, a melhoria do controle do processo em aplicações industriais (KOCH et al., 1998). Um exemplo desses microdispositivos é apresentado na Figura 1.

Aliando baixos custos com matérias primas e necessidade de pequenos espaços para realização de análises e confecção, além da possibilidade de análise de fluidos com concentrações baixíssimas, os microdispositivos vêm se mostrando uma tecnologia extremamente promissora.

Figura 1 – Exemplo de dispositivo de tecnologia lab-on-a-chip. Construção de um chip de proteína eletroquímica: (a) estrutura decomposta ilustrada camada por camada; (b) imagem do chip (R.E., eletrodo de referência, A.E., eletrodo auxiliar, W.E., eletrodo de trabalho); (c) chip montado em um suporte de fichas. Foto vista do lado oposto.



Fonte: (KOJIMA et al., 2003)

1.1. Motivação

Os sistemas microfluídicos tem potencial para uma vasta gama de aplicações. Modificar dispositivos para microdimensões ocasiona diversos benefícios como redução de custos (tanto na fabricação quanto na utilização e descarte de dispositivos), redução de tempo de análise, menor consumo de reagentes, diminuição de rejeitos, elevação da eficiência, crescimento da portabilidade, baixa demanda de energia, possibilidade de operações em paralelo com outros dispositivos e versatilidade no *design*. Estudos que antes eram praticamente impossíveis em maiores escalas tornam-se alcançáveis com a miniaturização do equipamento. Canais microfluídicos podem simular condições *in vivo* de capilares possuindo fluxos com cerca de 10 μm e 0,1 cm/s. Dispositivos com características semelhantes às

biológicas poderiam levar a informações que ajudam entender melhor sistemas fisiológicos (MCDONALD et al., 2000). A determinação do coeficiente de difusão, por exemplo, em microcanais requer pequenos volumes de amostra (< 1 mL) e tempo reduzido de processo (minutos ou até segundos), (KAMHOLZ et al., 1999; MILOŽIČ et al., 2014; SIA; WHITESIDES, 2003), além de se poder encontrar o coeficiente de difusão e a constante de velocidade de reação num mesmo conjunto de experimentos (BRODY; KAMHOLZ; YAGER, 1997; KAMHOLZ et al., 1999).

Micromisturadores passivos necessitam de energia externa somente para direcionar o fluxo, sendo ele transversal induzido pela interação do fluxo principal com a geometria do canal especificamente concebida. Portanto, o aumento da mistura nesses micromisturadores é baseado na sua geometria, aumentando a área interfacial entre fluidos ou reduzindo o comprimento difusivo. Em micromisturadores ativos a eficiência de mistura pode ser ajustada mudando a energia de entrada e o fluxo transversal é produzido por forçamento oscilatório no canal de mistura. De modo geral, micromisturadores ativos são mais eficientes que passivos, porém micromisturadores passivos são mais simples de serem fabricados e mais fáceis de serem integrados a sistemas microfluídicos. Micromisturadores de laminação paralela são os mais comuns, que basicamente é um misturador longo com duas entradas. Ele pode ser chamado de misturador T (KAMHOLZ et al., 1999; KAMHOLZ; YAGER, 2001; KOCH et al., 1998) ou misturador Y (GOBBY; ANGELI; GAVRIILIDIS, 2001) de acordo com sua geometria (SAHU; GOLIA; SEN, 2012). Nestes micromisturadores a difusão desempenha um papel crucial. Inicialmente usado em diagnósticos de ensaios químicos, utiliza interdifusão de analito e indicador partindo de duas ou mais correntes produzindo uma mudança de sinal mais correlacionado a concentração. Possuindo número de Reynolds geralmente pequeno (menor que 1), apresenta fluxo laminar, com transporte entre fluxos ocorrendo apenas por difusão (BRODY; KAMHOLZ; YAGER, 1997; KAMHOLZ; YAGER, 2001; VIRK; HOLDO, 2008).

Uma das possibilidades de aplicação de sistemas microfluídicos é a obtenção de gradientes de concentração. De modo a manter um gradiente de concentração estável com o tempo, deve-se proporcionar um elevado grau de controle de fluxo de entrada, concentração de cada substância de entrada e velocidade do fluido dentro do equipamento (DERTINGER et al., 2001). Nos gradientes de concentração produzidos em redes microfluídicas as moléculas se difundem entre os múltiplos fluxos de forma laminar. O mais comum são redes de microcanais de vários estágios seguidos de um único microcanal de saída, sendo que em cada estágio as correntes são divididas em um número maior de correntes que são recombinadas

para mistura completa entre os fluxos por meio da difusão das amostras. As diversas recombinações geram o gradiente de concentração desejado (ZHOU et al., 2009).

De modo geral, a finalidade da rede de microcanais é dividir, combinar e misturar as substâncias de maneira controlada, além de proporcionar a confecção de um dispositivo capaz de realizar leituras de substâncias com baixíssimas concentrações, como é o caso de substâncias marcadoras de câncer encontradas no plasma sanguíneo.

Marcadores de câncer são substâncias produzidas por células cancerígenas e por outras células do corpo em resposta ao câncer ou a tumores benignos. Estas substâncias podem ser encontradas no sangue, na urina, no tecido do tumor ou em outros tecidos. Atualmente já foram identificados mais de 100 tipos de substâncias que podem ser encontradas em concentrações alteradas no organismo de pacientes portadores de algum tipo câncer (ALMEIDA et al., 2007; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2017; LIMA, 2010).

Atualmente, muitos tipos de câncer podem ser curados. Na verdade, mais da metade dos casos de câncer tem cura, desde que tratados em estágios iniciais. Esta dependência da possibilidade de cura com o tratamento da doença na fase inicial demonstra a importância do diagnóstico precoce. Um dos principais desafios no diagnóstico precoce é que não há um marcador comum para os mais de 100 tipos de câncer (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2017). Portanto, os médicos não podem simplesmente utilizar um sensor para detectar a presença de uma forma específica de câncer. Devido à falta de sistemas que proporcionem detecção eficiente e rápida, o diagnóstico e prognóstico de câncer atualmente dependem de análises que patologistas têm usado por mais de 100 anos. Há a estimativa de que nos Estados Unidos são gastos, anualmente, cerca de R\$ 206 bilhões em tratamentos que, de modo geral, são direcionados para melhorar as chances daqueles que estão nas fases avançadas. No Brasil, R\$ 3,5 bilhões foram gastos no ano de 2015 (AGÊNCIA ESTADO, 2016). Infelizmente, todo este investimento em muitos casos aumenta apenas marginalmente o tempo de sobrevivência do paciente, ao custo de muito sofrimento. Assim sugerem que a oportunidade para aumentar consideravelmente os índices de cura de câncer é investir pesado na detecção precoce da doença (NOGUEIRA, 2009). A estimativa para o Brasil nos anos de 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer. Com exceção do câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), vão ocorrer cerca de 420 mil casos novos de câncer. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais recorrentes. Desconsiderando os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago

(6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) estarão entre os principais. (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2017)

Assim, o desenvolvimento de um dispositivo de microdimensões com eficiência para detecção de concentrações baixíssimas e alta portabilidade seria de grande ajuda no combate a uma doença tão devastadora quanto o câncer.

1.2. Objetivo

Com o propósito de auxiliar no desenvolvimento de biossensores portáteis para a dosagem de marcadores de câncer, este trabalho tem por objetivo geral: elaborar e produzir um sistema microfluídico contendo a rede de microcanais do sistema de diluição, o qual poderá ser utilizado na geração de perfis de concentração conhecidos da substância a ser analisada, visando a integração em biossensores plasmônicos baseados em arranjos de nanoburacos.

Para que o objetivo geral seja alcançado, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Conceber e projetar uma rede de microcanais com o auxílio de um software CAD;
- Modelar o processo de diluição e implementá-lo no programa COMSOL *Multiphysics*[®];
- Verificar os perfis de velocidade e concentração de diversas substâncias;
- Reproduzir em PDMS o sistema microfluídico projetado;
- Comparar a distribuição de concentração teórica, obtida por meio da modelagem e simulação, com os resultados experimentais.

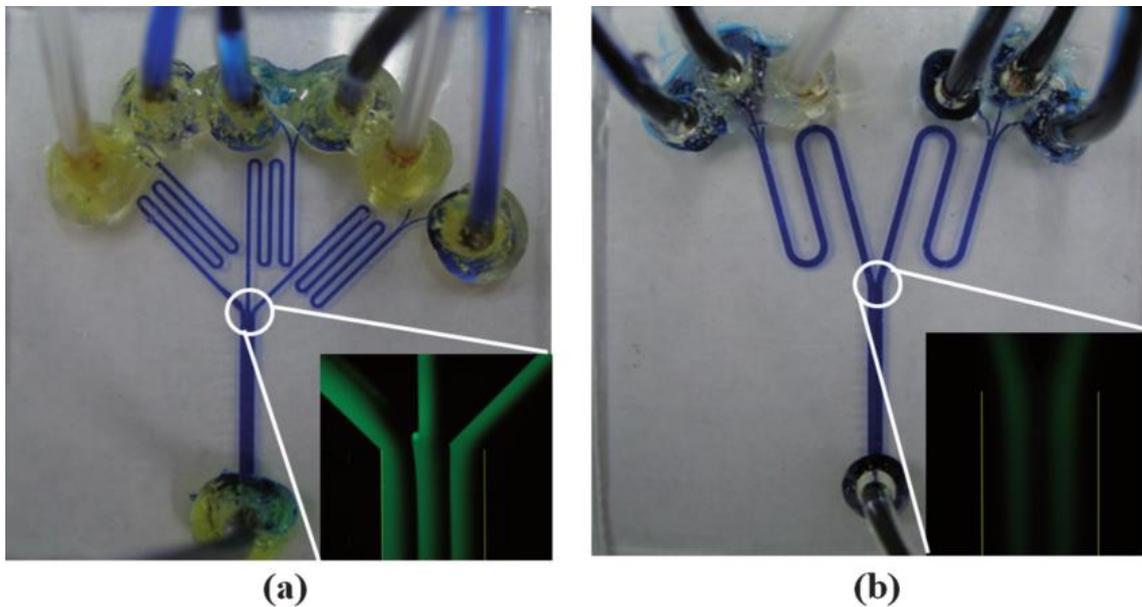
CAPÍTULO II

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Dispositivos Microfluídicos

Convencionalmente os dispositivos microfluídicos são fabricados em materiais de vidro e silício. Entretanto, a fabricação de dispositivos em polidimetilsiloxano (PDMS) por *soft-litografia* tem se mostrado mais rápida e menos dispendiosa quando comparada com outros métodos onde se aplicam soluções aquosas (MCDONALD et al., 2000). A Figura 2 exemplifica um sistema microfluídico.

Figura 2 - Exemplos de microdispositivos. Dispositivo gerador de gradiente de concentração (CGG) fabricado por meio da técnica de *soft-litografia*. (a) CGG para perfil de concentração em forma de dente de serra e (b) CGG para perfil de concentração em forma de sino duplo.



Fonte: (ZHOU et al., 2009)

Diferentes das escalas macroscópicas, outros efeitos físicos são importantes no domínio de microescalas. Propriedades de área de superfície do sistema, como a viscosidade e a tensão superficial, tornam-se mais importantes em comparação com propriedades de volume, como a inércia. A transferência de massa é geralmente limitada pela difusão, o fluxo de fluido é quase sempre laminar. Como as duplas camadas elétricas contidas nas interfaces

do sistema interagem com campos externos aplicados, os efeitos eletrocinéticos tornam-se importantes. Como os sistemas são miniaturizados, o caminho livre médio do fluido pode se tornar semelhante ao tamanho do sistema, tornando os efeitos de rarefação importantes. Com números de Knudsen moderados, (razão entre o caminho livre médio e o tamanho do sistema), ainda há a possibilidade de usar as equações de Navier-Stokes para resolver o fluxo, entretanto, são necessárias condições de contorno especiais que levam em conta o efeito do deslizamento do fluido nas paredes (COMSOL, 2014a; SAHU; GOLIA; SEN, 2012).

Por meio de sistemas microfluídicos é possível realizar um controle de velocidade e concentração que proporcione um gradiente espacial e temporariamente estável. Sistemas de microcanais podem realizar o fenômeno de transporte por difusão de forma rápida e compacta, intensificando o processo. Por meio de um escoamento laminar, sem turbulência, é possível manter um fluxo de diferentes concentrações em pequenos capilares. Podem-se criar diversos perfis de concentração controlando a composição química de fluxos particulares de entrada. Como são necessários pequenos volumes de amostras para realização de uma análise, este método é eficiente mesmo para substâncias onerosas (DERTINGER et al., 2001; JEON et al., 2000; KENIS; ISMAGILOVE; WHITESIDES, 1999; MILOŽIČ et al., 2014; TAKAYAMA et al., 1999).

O pequeno número de Reynolds indica fluxo laminar onde ocorre um ambiente controlado de transferência de massa convectiva na direção do fluxo, mas em microcanais a mistura pode ser conseguida unicamente por difusão (MILOŽIČ et al., 2014).

A microfluídica manipula líquidos e gases em canais com dimensões transversais com cerca de 10 – 100 μm e tem seu desenvolvimento focado na miniaturização de sistemas para aplicações químicas, biológicas e médicas. Essas aplicações são subdivididas em grandes áreas, como sistemas analíticos miniaturizados, dispositivos biomédicos, ferramentas para química e bioquímica, e sistemas para investigação fundamental. De modo a obter sistemas eficazes são necessárias características específicas de aplicação, como propriedades ópticas e químicas de superfície e serem fabricados em materiais de custo reduzido (MCDONALD et al., 2000).

Uma GC (cromatografia gasosa) miniaturizada foi o primeiro dispositivo microfluídico desenvolvido. Seu desenvolvimento ocorreu em 1970 na Universidade de Stanford (TERRY; JERMAN; ANGELL, 1979). Apesar desse sistema não ter sido ampliado, a expansão da tecnologia para a análise de misturas de macromoléculas complexas, como DNA e proteínas em soluções aquosas por CE (eletroforese capilar) e LC (cromatografia líquida), foi estimulada pelo crescimento da biologia molecular, em especial a genômica.

Quatro laboratórios analisaram sistemas microfluídicos inicialmente: os de Manz, Harrison, Ramsey e Mathies. A tecnologia inicial empregada pela maioria para fabricação desses sistemas iniciais foi derivada da microeletrônica, como a fotolitografia e a gravura em silício e vidro, devido ao desenvolvimento dessas tecnologias na época, mas esses materiais apresentam algumas desvantagens. O silício é relativamente oneroso e possui opacidade na região visível/UV do espectro, não sendo adequado para sistemas que utilizam detecção óptica. Embora o vidro seja transparente, possui a característica de ser amorfo e menor capacidade de corrosão que o silício. Mesmo que a produção desses dispositivos possa ocorrer em larga escala, dispositivos de silício ou vidro necessitam de ambientes limpos para sua confecção e elevadas tensões ou temperaturas para sua selagem. Uma vantagem de dispositivos com esses materiais é possuir a superfície com carga negativa que suporta fluxo eletro-osmótico (EOF). Além disso, ocorre a limpeza da superfície na fabricação dos canais por decação. Os sistemas fabricados em vidro mostraram eficiência quando empregado na separação de sequências de DNA, mas ocorre adsorção quando utilizado com proteínas (MCDONALD et al., 2000).

Os fluxos de fluidos em microcanais eram geralmente conduzidos por campo elétrico e/ou gradiente de pressão em processos dependentes da concentração. Quando utilizado campo elétrico o fluido era conduzido eletrocineticamente, o que limitava a um solvente polar e poderia ocasionar danos à amostra por aquecimento Joule. Para ser empregados em mecanismos de ramificação, eram utilizados gradientes de pressão para impulsionar o fluido, o que requeria grandes comprimentos de misturas e ocasionava volumes mortos. Havia grandes taxas de consumo de analito devido à alta taxa de fluxo. Mesmo assim, é mais indicado utilizar o fluxo orientado por pressão por apresentar pertinente facilidade, flexibilidade de fabricação, não ser sensível a contaminação de superfície, entre outras vantagens. Quando o fluxo é inserido em fenda retangular gera uma complexidade adicional pelo fato de o perfil parabólico de velocidade distribuir os analitos nas dimensões transversais. Outro fator é a distribuição por difusão ser relativa ao gradiente de velocidade referente a largura do microcanal. Logo, o mecanismo de dispersão é o que dita a distribuição da substância analisada. Assim, começa a serem investigados os fenômenos específicos para escoamento lado-a-lado conduzidos por pressão (CHEN; LAM, 2003).

O T-sensor é um dispositivo em formato de T e um exemplo de microdispositivo que, por possuir microdimensões e baixas vazões volumétricas, apresenta pequeno número de Reynolds, podendo ser inferior a 1 (um). Sua formatação mais simples apresenta fluxos percorrendo entradas separadas e fluindo adjacientemente. Conforme sua microescala, o fluxo

é induzido a laminar não havendo mistura convectiva entre os fluxos. Portanto, moléculas pequenas se difundem em um menor intervalo de tempo que moléculas grandes, em um mesmo fluxo. A dimensão de difusão D é a dimensão crítica que limita a dimensão de interdifusão, onde ocorre a difusão entre as correntes. O valor de D fixa o tempo médio de residência, assim como o comprimento do canal L , sua largura W e as taxas de fluxo de entrada (KAMHOLZ et al., 1999).

Mudanças na cor ou fluorescência do sistema ao longo do fluxo podem corresponder a alterações das propriedades químicas e físicas do sistema. Estudos recentes monitoram pH e viscosidade de fluorescência da amostra. O T-sensor também vem sendo utilizado para aferir concentrações de moléculas eletricamente ativas e realizar separações eletroforéticas, além da concentração, quando se adiciona eletrodos ao canal (KAMHOLZ et al., 1999).

2.1.1. Técnicas de Fabricação

Microdispositivos possuem métodos de fabricação típicos semelhantes a técnicas desenvolvidas por indústrias de semicondutores. Deste modo, são geralmente feitos de silício, porém, por meio de técnicas novas como fotolitografia, deposição química a vapor, usinagem a laser e usinagem por eletrodescarga, possibilita a utilização de outros materiais como metais, cerâmicas, vidros e plásticos (BEEBE; MENSING; WALKER, 2002; FLETCHER et al., 2002; MCCREEDY, 2000; WEIGL; BARDELL; CABRERA, 2003). Os avanços tecnológicos na fabricação de microdispositivos vêm possibilitando um elevado grau de complexidade em sua estrutura (AJMERA et al., 2002; BEEBE; MENSING; WALKER, 2002; SOUZA, 2007).

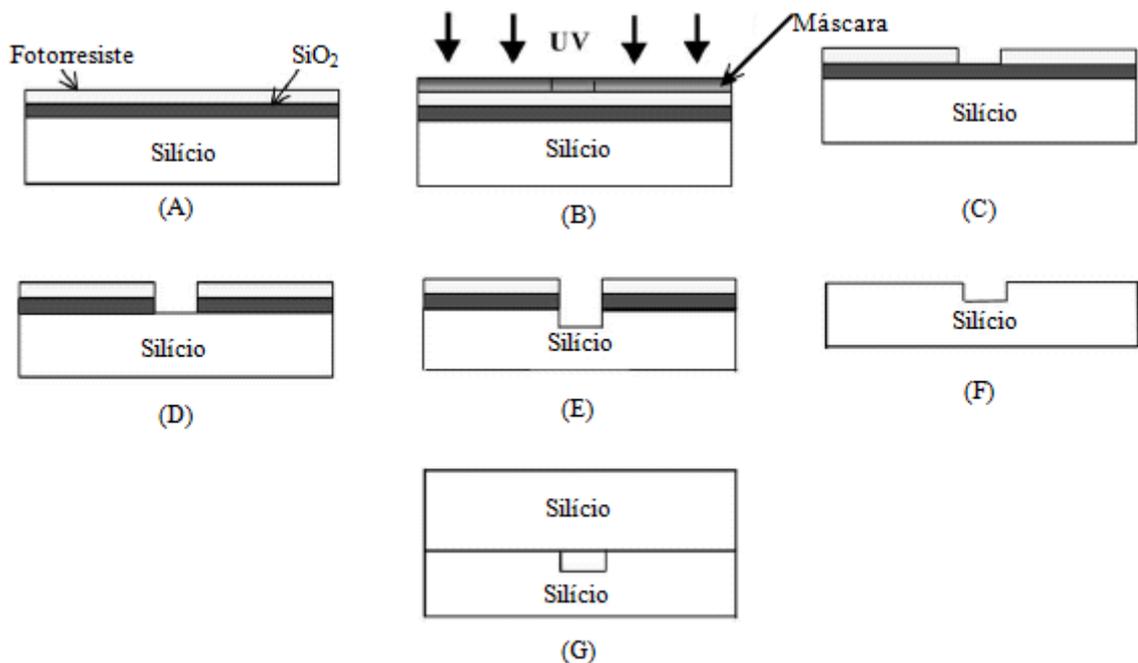
2.1.1.1. Fotolitografia

A fotolitografia é uma das técnicas mais antigas quando se trata de microfabricação. Inicia-se o processo quando é formada uma camada de SiO_2 sobre um disco de silício (substrato). Essa camada pode ser formada tanto por oxidação da superfície de silício, quanto pela deposição de uma camada de SiO_2 por deposição química a vapor. Posteriormente, cobre-se o disco com um polímero fotopolimerizável sendo a máscara (Figura 3A) e então se coloca, sobre o fotorresiste, um molde com o padrão a ser atacado quimicamente. Em seguida, o disco é exposto à irradiação ultravioleta (Figura 3B). Caso a máscara utilizada for um fotorresiste positivo, ocorrerá a dissolução do polímero nas áreas expostas quando colocado o

disco no revelador. Entretanto, se o fotorresiste for negativo, a exposição ultravioleta acarretará na formação de ligações cruzadas das cadeias do polímero, fazendo com que as áreas não expostas se dissolvam no revelador. Em ambos os casos, a parte que não foi revelada do fotorresiste irá proteger as áreas cobertas contra o ataque químico (Figura 3C e D) (SOUZA, 2007).

Remove-se o fotorresiste remanescente após as áreas de SiO_2 expostas terem sido atacadas quimicamente para formar os canais. Então, coloca-se o disco em uma fornalha que contém moléculas gasosas do dopante desejado, que se difunde para o silício exposto. O dopante se difunde até uma profundidade desejada no disco (Figura 3E) e então se remove o disco e o cobre com SiO_2 por deposição química a vapor. Essa série de passos de cobertura por máscara, ataque químico, deposição química a vapor e metalização, prosseguem até que o dispositivo almejado seja constituído (Figura 3 G) (FOGLER, 2009; SOUZA, 2007).

Figura 3 - Microfabricação fotolitográfica de canais em silício.



Fonte: (FLETCHER et al., 2002)

2.1.1.2. Deposição química a vapor

No método de deposição química a vapor um gás reage sobre uma superfície sólida formando um filme, podendo ser constituído por silício, nitrato de silício e vidro. Construção

de máscara, membranas e camadas catalisadoras são aplicações comuns para esta técnica (SOUZA, 2007).

2.1.1.3. Litografia branda

Também conhecida como *soft-litografia*, a litografia branda é um método comum onde se usa a litografia tradicional criando um padrão em uma camada de fotorresiste. Pode-se preencher o padrão com um polímero termo curável ou UV-curável. Desta forma é possível criar múltiplas réplicas do equipamento desejado. Um material utilizado na maioria das técnicas de litografia branda é o polímero polidimetilsiloxano (PDMS) que é um polímero UV-curável. Esta técnica é indicada para áreas biológicas e biotecnológicas, onde as operações acontecem comumente à temperatura e pressão ambientes e pH neutro (WEIGL; BARDELL; CABRERA, 2003).

2.1.1.4. Microusinagem a laser

A microusinagem a laser evapora o material de uma superfície utilizando a incidência de raio laser por pulsos curtos, provocando a formação de furos, até mesmo em materiais duros como diamante. O procedimento não se restringe a usinagem subtrativa. É possível a construção de estruturas de três dimensões por meio da exploração da superfície com feixe de raios laser em gás reativo (SOUZA, 2007).

2.1.1.5. Microusinagem por eletrodescarga

A técnica consiste em aplicar uma descarga elétrica que concentra o calor num ponto determinado da superfície que cria um ponto quente (*hot point*) (12000°C) que evapora o substrato. Mantem-se o eletrodo a uma distância aproximada de 25 micra do substrato, e ficam imersos em um meio dielétrico. Aplicando um potencial elétrico adequado a alta frequência, ocasiona a corrosão do substrato. A rugosidade da superfície é inversamente proporcional à frequência de aplicação deste potencial (SOUZA, 2007).

2.1.2. Aplicações

Os dispositivos microfluídicos possuem diversas aplicações em diversas áreas. Sua aplicação pode ser uma potencial ferramenta tanto para Sistemas Analíticos Miniaturizados quanto para Genômica e Proteômica. Tendo reprodução rápida e de alta sensibilidade, suas aplicações englobam desde impressões digitais de DNA, passando por análise combinatória, forense, expressão gênica e interações de fluidos com matrizes genéticas. Abrange aplicações em guerra biológica e química como medida preventiva na detecção de patógenos e toxinas. Dentre as possíveis aplicações, incluem-se as análises clínicas, permitindo análise rápida de fluidos corporais, ou mesmo ensaios enzimáticos e detecção eletroquímica de apuração de células. Dentre tantas áreas com potencial utilização de dispositivos microfluídicos como ferramenta, podemos ainda citar o rastreamento de alto rendimento (ensaios toxicológicos), testes ambientais (análise *in situ*), dispositivos biomédicos ou implantáveis (monitoração ou entrega *in vivo*), síntese orgânica em pequena escala, preparação de amostras, amplificação de ácidos nucleicos, dinâmica de fluidos (EOF e laminar em pequenos canais), reações químicas, sistemas biomiméticos ou ainda a detecção de moléculas individuais (MCDONALD et al., 2000). Alguns procedimentos biológicos que podem ser miniaturizados em redes de microfluidos incluem imunossaios, separação de proteína e DNA, seleção e manipulação de células, estudos de células em canais micro expostos a fluxos laminares, entre outros (SIA; WHITESIDES, 2003).

Dispositivos em forma de Y são utilizados para análises do comportamento da variação de concentração entre dois ou mais fluxos em seu interior. O fluxo é estritamente laminar ocorrendo o transporte de massa lado-a-lado por difusão sendo o número de Reynolds muito pequenos. BRODY; KAMHOLZ; YAGER, (1997) apresentaram exemplos desses dispositivos microfluídicos em processos biológicos. (KAMHOLZ et al., 1999) expuseram modelos de análise unidimensional descrevendo quantitativamente a difusão molecular no microcanal com sensor T. Continuamente, foi realizada uma análise teórica da lei de escala na ausência de difusão axial no sensor T baseada na difusão molecular por Kamholz and Yager (2001). A difusão molecular entre dois fluxos laminar de pressão dirigida em elevado número de Péclet foi quantificado experimentalmente e teoricamente por Ismagilov et al. (2000). Empregaram-se métodos de elemento e diferenças finitas para resolver às equações de Navier-Stokes acopladas a equação de difusão e convecção, descrevendo transporte de massa entre fluxos de líquidos similares (CHEN; LAM, 2003; MILOŽIČ et al., 2014; SAHU; GOLIA; SEN, 2012).

Alguns autores projetaram dispositivos em PDMS usando prototipagem rápida e *soft-litografia* (DERTINGER et al., 2001; JEON et al., 2000; ZHOU et al., 2009), mas também há

pesquisas realizadas com vidro (KOCH et al., 1998; MILOŽIČ et al., 2014), em polimetilmetacrilato (PMMA) (SAHU; GOLIA; SEN, 2012) e silício (KAMHOLZ et al., 1999; KOCH et al., 1998). Utilizaram bomba de seringa na entrada do dispositivo para inserir o fluido (DERTINGER et al., 2001; KAMHOLZ et al., 1999; MILOŽIČ et al., 2014) ou na saída para gerar um vácuo dentro do dispositivo, induzindo a saída do fluido (SAHU; GOLIA; SEN, 2012). Buscavam demonstrar por meio da rede de microcanais gradiente de concentração estáticos e dinâmicos.

A partir de microdispositivos de três entradas (JEON et al., 2000; ZHOU et al., 2009) obtiveram resultados condizentes com o calculado, utilizando três velocidades de entrada diferentes. Assim, concluiu-se que diferentes velocidades de entrada geram diferentes gradientes de concentração para uma mesma concentração de entrada (CHEN; LAM, 2003; JEON et al., 2000; SAHU; GOLIA; SEN, 2012). Observou-se que a mistura é altamente dependente do número de Reynolds (KOCH et al., 1998; VIRK; HOLDO, 2008), pois conforme se aumenta esse número, é necessário um maior comprimento de canal para obter o mesmo grau de mistura. Além disso, o comprimento de mistura necessário reduz linearmente com o aumento do coeficiente de difusão, o que está de acordo com a teoria do micromisturador (SAHU; GOLIA; SEN, 2012; VIRK; HOLDO, 2008).

Autores descobriram que os perfis de concentração gerados na saída da rede de microcanais poderiam ser descritos por polinômios de segunda ordem (por terem três canais de entrada), pois perfis de concentração de qualquer rede de microcanais de ordem n com qualquer fluxo de entrada é definido por um polinômio de ordem $n-1$. Obtiveram alta coerência entre os dados de concentração calculados e os aferidos experimentalmente pela rede de microfluidos (DERTINGER et al., 2001).

Estudos realizados em microcanais com junção em Y (SAHU; GOLIA; SEN, 2012; ZHOU et al., 2009), escoando em fluxo de Stoke (CHEN; LAM, 2003), apresentaram uma descrição teórica do processo de convecção-difusão em sistemas homogêneos permitindo a estimativa do coeficiente de difusão (MILOŽIČ et al., 2014). Para tal foi utilizado análises numéricas de diferenças finitas, ou seja, os métodos implícitos, explícitos e de Crank-Nicolson foram realizados e analisados no mesmo domínio para verificar os modelos propostos. Valores de concentração de saída foram obtidos por meio de espectrofotômetro (MILOŽIČ et al., 2014).

Além dos testes laboratoriais, MILOŽIČ et al., (2014) calcularam o coeficiente de difusividade a partir das correlações de Wilke-Chang, Scheibel e Siddiqi-Lucas. Os métodos

analisados apresentaram soluções estáveis com certa variação entre 5 até 20%, de acordo com as interações e com a malha pré-definida.

CHEN; LAM, (2003) compararam o perfil de concentração do analito na saída da seção com e sem difusão axial e dispersão de Taylor-Aris. Observou-se que a difusão na direção radial muda drasticamente com a consideração da dispersão de Taylor-Aris. Isso porque a difusividade efetiva pode ser maior em ordens de magnitude do que o fluxo convectivo puro, devido a distribuição não homogênea da velocidade na direção axial. De fato, na direção do fluxo no eixo principal a difusão molecular apresentou pouco efeito no fluxo convectivo puro.

Em testes realizados em microcanais com ranhuras assimétricas na parte inferior, introduzindo um componente transversal ao fluxo, há um aumento tanto na área de contato entre as duas correntes, quanto na taxa difusora. A inserção de microesferas nos microcanais, fazendo com que o fluido percorra os espaços entre elas, também resulta em maior mistura do fluido (SIA; WHITESIDES, 2003).

Foram utilizadas análises teóricas, experimentais e simulações computacionais em COMSOL Multiphysics 4.0 para comparação de resultados de dispositivos em Y, possuindo malha computacional triangular acoplado à um solver não linear em estado estacionário. Os autores validaram o modelo numérico comparando o resultado da simulação com o resultado reportado por VIRK; HOLDO, (2008) encontrando uma equivalência de cerca de 5% (SAHU; GOLIA; SEN, 2012).

Testes realizados em dispositivos em T de silício foram comparados a modelos analíticos e computacionais em Matlab® onde combinou dados experimentais com modelo analítico descrevendo quantitativamente interações moleculares em um microcanal. Os melhores ajustes apresentaram erros de 5%. O valor do coeficiente de difusividade encontrado é aproximadamente o dobro do dito na literatura. A explicação mais provável para esta discrepância é a presença de interações de parede por ambas as moléculas de HSA e AB580 utilizadas nos testes, alterando a difusividade local (KAMHOLZ et al., 1999).

O estudo de micromisturas de gases de diferentes viscosidades em dispositivos em T mostrou que o aumento da velocidade do fluxo ocasiona o aumento do comprimento de difusão, como acontece em líquidos. Além disso, o ângulo entre os canais de entrada não alterou significativamente o desempenho da mistura, porém o estrangulamento do canal reduz consideravelmente o comprimento de mistura. Ainda descobriram que os comprimentos de misturas para simulações em 2D são menores comparadas às simulações 3D, isso devido as

tensões de cisalhamento serem maiores no simulador 3D por apresentar quatro paredes (GOBBY; ANGELI; GAVRIILIDIS, 2001).

Em microcanais de difusão de moléculas de baixo peso molecular em solução aquosa com fluxo laminar e número de Péclet alto, os autores demonstraram experimentalmente que a extensão da mistura difusiva transversal através da interface entre os fluidos é proporcional a um terço da distância axial ao longo do canal, no estado estacionário próximo às paredes superior e inferior, e inversamente proporcional a um terço da velocidade máxima do fluxo. Além disso, no meio do canal onde a velocidade é praticamente uniforme, a extensão dessa mistura é proporcional a metade da velocidade média do fluxo (ISMAGILOV et al., 2000).

Algumas pesquisas buscaram o estudo de mistura parcial de fluidos em fluxo laminar para gerar gradientes de concentrações capazes de construir perfis complexos de concentração química combinando lateralmente os perfis constituintes em misturadores em forma de Y e ψ . Assim, apresentam estruturas de rede simples e confiabilidade de dispositivo aprimorada (ZHOU et al., 2009).

Dispositivos microfluídico ainda puderam ser utilizados para testar amostras de sangue não tratadas em ensaios químicos complexos. Os autores descreveram os efeitos microscópicos em um dispositivo projetado para extrair proteína de sangue por difusão e filtração seletivas. Os resultados foram obtidos por meio de microscopia de vídeo e imagens de fluorescência (BRODY; KAMHOLZ; YAGER, 1997).

Com base em diversos estudos de microdispositivos variados usando diferentes materiais para sua confecção, a utilização de novos tipos de materiais como polímeros tem aumentado intensamente. Além de ser mais barato que o vidro e o silício, os canais em polímeros podem ser moldados tanto por moldagem convencional quanto por estampagem selando termicamente ou por meio de adesivos. Contudo eles são mais suscetíveis a solventes orgânicos com baixo peso molar e incompatíveis com temperaturas altas. Por isso deve-se ter um cuidado maior no controle químico de superfície (MCDONALD et al., 2000; SIA; WHITESIDES, 2003).

Assim, estudos vêm sendo aprimorados de modo a descobrir novas técnicas e matérias para a fabricação de dispositivos microfluídicos para o devido emprego em áreas diferenciadas.

2.1.3. PDMS

Na fabricação de microcanais um excelente material para ser utilizado é o PDMS. Ele é adequado para soluções aquosas contendo amostras biológicas por apresentar diversas características vantajosas, tais como: capacidade de ser confeccionado em microescala com alta fidelidade por meio de moldagem em réplicas; ser opticamente transparente até 280 nm, podendo ser utilizado em UV/vis absorvância e fluorescência, compatível com diversos métodos ópticos de detecção; apresentar baixas temperaturas de selagem; não ser tóxico; poder ser implantado *in vivo*; ser deformado de modo reversível; ser reversivelmente vedado em si mesmo ou outros materiais por interações intermoleculares (van der Waals); realizar ligações irreversíveis por ligações covalentes através de exposição à oxidação plasmática; ter composição química controlável; ser elastomérico (possui propriedades elásticas); ser impermeável; abranda superfícies não planas; e desfazer-se de moldes delicados sem danificar a si mesmo nem ao molde (LIMA, 2010; MCDONALD et al., 2000; SIA; WHITESIDES, 2003).

Na estrutura do PDMS há repetidas unidades $-\text{OSi}(\text{CH}_3)_2-$ fazendo a superfície hidrofóbica devido aos grupos CH_3 , resultando em fraca molhabilidade com solventes aquosos, o que torna os microcanais sensíveis a retenção de bolhas de ar que deixam a superfície predisposta a absorção de proteínas e células não específicas (SIA; WHITESIDES, 2003).

Para fabricação de dispositivos microfluídicos em PDMS, aspectos como a velocidade de fabricação do modelo, parâmetros do projeto e disponibilidade dos componentes devem ser levadas em consideração.

2.2. Microdispositivos para Detecção de Marcadores de Câncer

Devido à existência de tantos tipos de câncer e a cada vez maior recorrência dessa doença na população de todo o planeta, se faz necessário o estudo de dispositivos de detecção da maioria dos tipos de câncer de modo precoce, para que assim seja tratado o mais cedo possível, aumentando significativamente as chances de cura dessa doença letal, na maioria dos casos. Assim, a otimização e miniaturização de dispositivos de detecção precoce de células cancerígenas é extremamente importante para o auxílio de cura dessa doença.

Marcadores tumorais são macromoléculas encontradas em tumores, no sangue ou presentes em líquidos biológicos, sendo seu aparecimento e/ou alterações de suas concentrações ligadas à origem e crescimento de células neoplásticas. Essas substâncias são utilizadas como indicadores da presença de câncer, podendo ser produzidas diretamente pelo

tumor ou como reação do organismo. Em sua maioria, os marcadores tumorais são proteínas inteiras ou pedaços, onde se podem incluir antígenos de superfície celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas e hormônios (ALMEIDA et al., 2007).

Dentre os principais marcadores tumorais estão: AFP (alfafetoproteína); MCA (antígeno mucóide associado ao carcinoma); Cromogranina A; BTA (antígeno tumoral da bexiga); Telomerase; NMP22 (proteína da matriz nuclear); Cyfra 21.1; PAP (Fosfatase Ácida Prostática); CA 72.4; β -HCG (gonadotrofina coriônica humana); CA 125; CA 15.3; CA 19.9; CA 27.29; CA 50; Calcitonina; Catepsina D; CEA (antígeno carcinoembrionário); C-erbB-2 (oncogene); LDH (desidrogenase láctica); K-ras; NSE (Enolase Neurônio- Específica); PSA (antígeno prostático específico); p53 e β 2-Microglobulina (ALMEIDA et al., 2007; LIMA, 2010). Na Tabela 1 está apresentada uma lista resumida contendo alguns dos marcadores de câncer já identificados e o tipo de câncer que pode ser detectado com por meio da sua dosagem.

Tabela 1 - Biomarcadores associados ao diagnóstico e prognóstico de câncer.

Tipo de Câncer	Biomarcador
Bexiga	FDP, BAT, NMP22, Ha-Hase, BLCA-4, CYFRA 21-1
Colo e Pâncreas	CEA, CA 19-9, CA24-2, p53, HNPCC, FAP
Leucemia	Anormalidades Cromossômicas
Mama	CEA, CA 125, CA 15-3, CEABRCA1, BRCA2, MUC-1, NY-BR-1, ING-1, BRCA ½, Receptores de Estrógeno e Progesterona
Pele	NY-ESO-1, Tirosinase
Próstata	PSA, PAP
Pulmão	CEA, CA 19-9, NY-ESO-1, SCC, CYFRA21-1, NSE CA
Ovário	CA 125, CEA, AFP, hCG, p53, BRCA ½

Fonte: (LIMA, 2010)

Os marcadores tumorais são utilizados para: triagem populacional; diagnóstico diferencial em pacientes sintomáticos; estadiamento clínico; estabelecimento do diagnóstico; monitorização da eficiência terapêutica; localização de metástases; tratamento (imunorradioterapia); e detecção precoce (ALMEIDA et al., 2007).

Os sistemas analíticos miniaturizados ocasionam uma maior performance analítica em aplicações clínicas. Também são essenciais no desenvolvimento de dispositivos *point-of-care*, que são sistemas integrados com a capacidade de processar amostras clínicas em campo,

como em ambulâncias, consultórios e nas próprias casas, podendo detectar diferentes tipos de biomarcadores (LIMA, 2010).

Os autores Kojima et al. (2003) desenvolveram um microdispositivo utilizando vidro como substrato e biossensor voltamétrico integrado para detectarem AFP em batelada. Esse dispositivo possuía dimensões de 17 mm × 17 mm e canais de ordem de 30 μm × 30 μm. Já Tsukagoshi, Jinno, and Nakajima (2005) projetaram um μTAS que integrava um imunossensor, EOF e transdução por quimiluminescência. Imobilizaram o biorreceptor em um dos reservatórios de injeção, fazendo com que as biomoléculas alvo complexadas e livres fossem separadas pelo EOF depois de incubarem a amostra por um tempo pré-determinado. O microdispositivo possuía dimensões de 12,5 mm × 35 mm contendo canais de 20 μm de profundidade e 50 μm de largura. Validou-se esse método por meio de aplicação em complexos HSA/ANTI-HSA (biorreceptor) e IAP/ANTI-IAP(biorreceptor). Posteriormente, um transistor tipo-p de efeito de campo aliando nanotubo de carbono (CNTFET) em combinação com anticorpo monoclonal específico ao biomarcador IGF1R foi projetado por Teker (2008). Os eletrodos foram integrados aos nanotubos separados por 1 a 4 μm, por técnica de automontagem eletroforética, sendo aplicados 4 μL de padrão/amostra nos experimentos sobre o CNTFET. Após, Choi and Chae (2009) expuseram um dispositivo microfluídico de vidro/PDMS fundamentado em SPR e reações proteicas concorrentes de adsorção/dessorção, ocorrendo durante as análises desconsiderando, assim, etapas de funcionalização de superfície. Com base nas diferentes forças de adsorção das proteínas imunoglobulina G, fibrinogênio e tiroglobulina (Tg) sobre Au (eletrodos depositados em vidro), houve a possibilidade de se determinar em fluxo de Tg; biomarcador do câncer diferenciado da tireoide (DTC). O dispositivo possuía canais confeccionados em PDMS tendo largura de 2,1 mm e sua vazão variou entre 5 e 10 μL/min (LIMA, 2010).

Deste modo, há a busca por dispositivos microfluídicos cada vez mais eficientes para a detecção de células cancerígenas em concentrações cada vez menores. Assim, será possível a detecção da presença de câncer cada vez mais precocemente. Esses microdispositivos podem ser rapidamente produzidos e replicados por meio de uma técnica de microfabricação denominada *soft-litografia*.

2.3. Microfabricação por *soft-litografia*

A *soft-litografia* é um conjunto de técnicas não-fotolitográficas de repetição de um modelo. O agente de transferência padrão é geralmente uma estrutura elastomérica com

padrões em baixo relevo. Além de possibilitar a reprodução de materiais curvos, esta técnica não exige grandes assepsias para reprodução da maioria das disposições microfluídicas (BEEBE; MENSING; WALKER, 2002; MCDONALD et al., 2000).

Esta técnica é realizada em moldes de prototipagem rápida e réplicas e são mais acessíveis a pesquisadores de bancada, tanto pelas dimensões, quanto por não necessitarem de ambientes extremamente limpos (MCDONALD et al., 2000).

2.3.1. Prototipagem rápida

A prototipagem rápida inicia-se com a criação do modelo virtual em um software CAD. O projeto é impresso em uma transparência em alta resolução que será utilizada como foto-máscara. Uma fina camada de material fotosensitivo, como epóxi fotocurável SU-8, é posto em cima de uma placa de silício em rotação para se espalhar em toda a placa. O material fotosensitivo é exposto a luz ultravioleta contendo a foto-máscara em sua superfície, então um agente revelador é utilizado para dissolver as regiões não expostas. As regiões não dissolvidas ficam em alto relevo. A partir desse relevo matriz serão produzidos dispositivos em PDMS. Matrizes fotoresistentes podem ser utilizadas indefinidamente, a não ser que o pesquisador quebre a placa ou o fotoresistente se desloque da placa. Pode-se prolongar sua vida útil replicando a matriz com poliuretano duro, por exemplo (MCDONALD et al., 2000; SIA; WHITESIDES, 2003).

Comparado a métodos que utilizam máscara de cromo na fase de fotolitografia, que levam até semanas e podem ser de 20 a 100 vezes mais dispendiosa, este método é conhecido principalmente pela redução de tempo e custo na realização de testes. Entretanto, a sua transparência apresenta uma resolução mais baixa ($> 20 \mu\text{m}$) que a máscara de cromo ($\sim 500 \text{ nm}$) (MCDONALD et al., 2000).

2.3.2. Replica de moldagem

A réplica de moldagem é simplesmente a introdução do pré-polímero, no caso o PDMS, na matriz gerando uma réplica negativa, ou seja, os canais em PDMS são gerados a partir dos relevos positivos da matriz. Quando o polímero é inserido no molde, é curado a 60°C por 1 hora. Após, é retirado cuidadosamente. Então é feita cavidades de entrada e saída no dispositivo usando um furador, para o fluido poder ser inserido (MCDONALD et al., 2000).

2.3.3. Vedação

A réplica de moldagem em PDMS apresenta canais abertos com três paredes sendo necessária uma quarta parede selando o dispositivo. A selagem pode ser feita com o mesmo material, sendo que todas as paredes dos canais seriam de PDMS, ou outro material, como o vidro. Esta selagem pode ocorrer de forma reversível, usando superfícies planas de seu próprio material ou outras através de ligações de van der Waals, ou de forma irreversível se as duas superfícies são materiais à base de Si e foram oxidados por plasma antes do contato (formando uma ligação covalente O – Si – O). Ao contrário do vidro e silício que necessitam de altas temperaturas para realizar a selagem, nesse sistema ela é impermeável e realizada em condições ambientes. A vedação reversível não suporta altas pressões nos capilares (> 5 psi) e a remoção da selagem gera praticamente nenhum resíduo ou degradação do material, possibilitando novas selagens. A partir de uma única placa mestre pode-se realizar diversas réplicas, sem a necessidade de uma sala com alta assepsia. Esse conjunto de procedimentos descritos para a confecção da rede de microcanais em PDMS pode ser realizada com outros elastômeros, como poliuretano e epóxi (MCDONALD et al., 2000; SIA; WHITESIDES, 2003).

2.4. Revisão para Modelagem

A confecção de um microsistema de diluição deve ser precedida de uma abordagem matemática. Essa abordagem auxilia na compreensão dos fenômenos de transporte envolvidos no processo em microescala e permite a realização do projeto da rede de microcanais sem a necessidade da confecção de uma grande quantidade de protótipos para que o resultado desejado seja alcançado.

Nesse sentido, a modelagem fenomenológica do processo, acompanhada de simulações diversas, torna-se imprescindível para que os objetivos sejam atingidos mais rapidamente.

2.4.1. Fenômenos de Transporte

Os estudos em fenômenos de transporte englobam três fenômenos: dinâmica dos fluidos, que implica no transporte de *quantidade de movimento*, transferência de calor, que

envolve o transporte de *energia*, e a transferência de *massa*. Os três fenômenos apresentam equações básicas intimamente relacionadas e similares, o que permite a resolução de diversos casos por analogia. Além disso, os fenômenos podem ser estudados em níveis macroscópicos, microscópicos e moleculares. Esses estudos se desenvolveram de modo independente dos outros ramos da física clássica e ganharam espaço em áreas da engenharia, além de aplicações em áreas como biotecnologia, nanotecnologia, ciência de polímeros e microeletrônica. Por um longo período os processos fenomenológicos foram considerados problemas matemáticos, entretanto ele é mais significativamente um problema físico. De modo fundamental, os fenômenos abrangem os princípios de conservação em combinação com expressões constitutivas que descrevem o fluxo. Em atividade os fenômenos ocorrem simultaneamente e, como tal, são estudados. Os estudos de fenômenos isolados descrevem uma exceção, e não uma regra (BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 2004).

Podem-se expressar matematicamente as leis de conservação e suas relações constitutivas na mecânica do contínuo por meio de equações diferenciais (FEYNMAN; LEIGHTON; SANDS, 1964). Para resolução dessas equações é incorporado ao estudo suas devidas condições de contorno e iniciais.

No presente trabalho é estudado apenas os fenômenos de transferência de massa e de momento, devido ao sistema não apresentar aquecimento, resfriamento ou geração de calor.

2.4.1.1. Interação entre os Fenômenos de Transporte

Os fenômenos de transporte raramente ocorrem sozinhos na natureza, sempre havendo o envolvimento de pelo menos dois deles. As movimentações moleculares de interação que ocorre em todas as substâncias são responsáveis pelos fenômenos de viscosidade, condutividade térmica e difusão.

Um gradiente de potencial é criado de forma que ocorram os fenômenos de transporte. Este gradiente pode ser a concentração, a tensão de cisalhamento ou a temperatura que estão relacionadas, respectivamente, com o transporte de massa, transporte de quantidade de movimento e transporte de energia.

As leis de conservação que governam os três diferentes transportes são análogas entre si e derivam de princípios simples. As equações de balanço dos três fenômenos podem ser relacionadas com suas respectivas equações constitutivas: as equações de fluxo.

Inicialmente é apresentado o conceito de fluxo, representado na forma de fluxo mássico na Equação (1).

$$\underline{j}_i = L_i \cdot \underline{f} \quad (1)$$

Onde o termo 1 representa o fluxo vetorial da espécie i , 2 representa o coeficiente cinético da espécie i (constante de proporcionalidade) e 3 representa a força motriz vetorial. O fluxo é uma grandeza vetorial que possui unidade de quantidade da grandeza transportada por área por tempo.

Os fenômenos de transporte possuem uma equação constitutiva associada a cada fenômeno. O transporte de massa está associado à *Lei de Fick*, o transporte de quantidade de movimento está associado à *Lei de Newton da viscosidade* e o transporte de calor está associado à *Lei de Fourier* da condução. Devemos tratar sempre o fluido como contínuo para que as equações de transporte e suas constituídas possam ser válidas. A Tabela 2 associa cada fenômeno à sua respectiva equação constitutiva.

Tabela 2 - Equações de balanço e constitutivas relacionadas com os respectivos transportes.

Fenômeno	Nome da Equação Constitutiva	Coefficiente Cinético	Nome da Equação de Balanço
Transporte de Calor	Lei de Fourier da condução de calor	Condutividade térmica	Primeira lei da termodinâmica
Transporte de Massa	Lei da difusão de Fick	Coefficiente de difusão	Equação da conservação da massa
Transporte de Quantidade de Movimento	Lei de Newton da viscosidade	Viscosidade dinâmica	Segunda lei de Newton

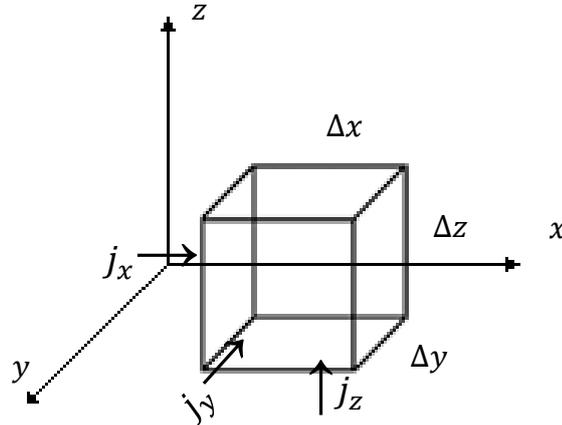
Fonte: (Autora, 2016)

As equações de balanço que representam os três fenômenos podem ser obtidas de forma genérica para um elemento de volume.

Os fenômenos de transporte são bastante semelhantes na forma de análise de seus volumes de controle. Temos como exemplo uma determinada quantidade ϕ que é conservada em um sistema. Para os três fenômenos é considerado um volume de controle de dimensões Δx , Δy e Δz , conforme indicados na no qual existe um fluxo dado por um vetor $j = (j_x, j_y, j_z)$. Esse vetor também pode ser utilizado em coordenadas cilíndricas (r, θ, z) e esféricas (r, θ, ϕ) de acordo com o sistema estudado.

No volume de controle da é aplicado um balanço de entrada e saída, podendo ser de quantidade de massa, quantidade de movimento ou energia. De forma genérica podemos representar essa quantidade por φ . Assim, o balanço é representado na forma da Equação (2).

Figura 4 - Volume de controle.



Fonte: Autora, 2016.

$$\begin{aligned} & \left[\begin{array}{l} \text{Taxa de } \varphi \text{ que} \\ \text{entra no volume} \\ \text{de controle} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Taxa de } \varphi \text{ que} \\ \text{sai do volume} \\ \text{de controle} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{l} \text{Taxa de geração ou} \\ \text{consumo de } \varphi \\ \text{no volume de controle} \end{array} \right] \\ & = \left[\begin{array}{l} \text{Acúmulo de } \varphi \\ \text{no volume} \\ \text{de controle} \end{array} \right] \end{aligned} \quad (2)$$

Que matematicamente, na direção x , torna-se:

$$\begin{aligned} & - \left(\Delta y \Delta z (j_{x,x+\Delta x} - j_{x,x}) + \Delta x \Delta z (j_{y,y+\Delta y} - j_{y,y}) + \Delta x \Delta y (j_{z,z+\Delta z} - j_{z,z}) \right) \\ & \pm \Delta x \Delta y \Delta z R_A = \Delta x \Delta y \Delta z \frac{\varphi_{t+\Delta t} - \varphi_t}{\Delta t} \end{aligned} \quad (3)$$

Sendo $j_{x,x}$ o representante do fluxo de direção x através de uma superfície perpendicular à direção x , e $j_{x,x+\Delta x}$ o mesmo fluxo com uma variação de Δx . Analogamente para os outros fluxos. R_A é a geração ou consumo de φ no sistema. O termo à direita na Equação (3) é o termo de acúmulo de φ após um determinado tempo t .

Podemos então dividir a Equação (3) pelo volume de controle $\Delta x \Delta y \Delta z$ e tomar o limite quando cada uma das variações tende a zero, obtendo assim:

$$- \left(\frac{\partial j_x}{\partial x} + \frac{\partial j_y}{\partial y} + \frac{\partial j_z}{\partial z} \right) + R_A = \frac{\partial \varphi}{\partial t} \quad (4)$$

Reescrevendo a Equação (4) em notação vetorial, utilizando o operador diferencial, obtemos a Equação (5).

$$\frac{\partial \varphi}{\partial t} + \nabla \cdot \mathbf{j} - R_A = 0 \quad (5)$$

Essa equação é válida apenas quando respeitada a hipótese do contínuo. A Equação (5), por ser uma equação diferencial parcial, é expressa como uma variação da variável dependente, de acordo com a variação de uma variável independente por vez (BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 2004).

A partir das soluções dos fenômenos em conjunto é possível estimar com uma margem considerável de veracidade os dados de pressão, velocidade e variação de concentração de todo um sistema a partir de dados de condições de contorno, condições iniciais e de geometria específica.

2.4.1.2. Transporte de massa

O transporte de massa de um ponto a outro no sistema é descrito como a transferência de massa que pode ocorrer em apenas uma fase ou entre fronteiras de fases em sistemas contendo uma ou mais fases. Seu estudo em um determinado sistema possibilita o cálculo do fluxo e distribuição de massa de diversas espécies ao longo de um determinado tempo e espaço. Os problemas de engenharia apresentam mais comumente transferência entre fases fluidas (líquida ou gasosa), porém a transferência de massa também pode ocorrer em fase sólida. Além disso, a transferência de massa pode ocorrer simultaneamente a reações químicas fazendo com que a espécie química possa ser produzida ou consumida durante o processo. Isso acarreta na não necessária conservação de volume do elemento. (BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 2004).

A equação da conservação de massa descreve o transporte de massa. Ela é também conhecida como a equação da continuidade. Para se deduzir a equação da continuidade aplica-se a metodologia apresentada na seção 2.4.1.1. Para tal, faz-se um balanço de massa em um elemento de volume fixo no espaço por onde escoar o fluxo (Figura 4).

A Equação (6) é a equação da conservação de massa na forma global em termos mássicos (equação da continuidade) e a Equação (7) está em termos molares para uma espécie química A.

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + (\nabla \cdot \rho \mathbf{v}) = 0 \quad (6)$$

$$\frac{\partial c_a}{\partial t} = -(\nabla \cdot J_A) + R_A \quad (7)$$

Sendo $\frac{\partial \rho}{\partial t}$ a taxa de aumento de massa por unidade de volume; $\nabla \cdot \rho \mathbf{v}$ o fluxo de massa; c_a a concentração molar da espécie A ; J_A o fluxo molar da espécie A ; e R_A a taxa de geração da espécie. As equações da continuidade apresentadas descrevem a taxa de variação de massa específica de fluido de forma temporal em uma determinada posição do espaço.

Quando o fluxo é incompressível a massa específica é constante. Assim, a equação da continuidade torna-se:

$$\nabla \cdot \mathbf{v} = 0 \quad (8)$$

2.4.1.2.1. Lei de Fick

A lei de Fick é utilizada para explicar a transferência de massa entre qualquer mistura binária sólida, líquida ou gasosa, desde que o fluxo seja definido como fluxo de massa relativo à velocidade da mistura. Ela apresenta o transporte molecular de uma substância relativo à outra, conhecido como difusão, e o transporte de massa por movimento macroscópico do fluido, conhecido como convecção. A Equação (9) é a equação da primeira lei de Fick na forma vetorial em unidades mássicas e a Equação (10) é a equação da primeira lei de Fick para difusão binária na forma de fluxo combinado em unidades molares.

$$\mathbf{j}_A = -\rho D_{AB} \nabla \omega_A \quad (9)$$

$$\underbrace{\mathbf{N}_{Az}}_{\text{fluxo combinado}} = \underbrace{-c D_{AB} \frac{\partial x_A}{\partial z}}_{\text{fluxo molecular}} + \underbrace{x_A (\mathbf{N}_{Az} + \mathbf{N}_{Bz})}_{\text{fluxo convectivo}} \quad (10)$$

Sendo \mathbf{j}_A o fluxo vetorial mássico da espécie A relativo à velocidade da mistura, ρ a massa específica do sistema, D_{AB} a difusividade de A em relação a B , $\nabla \omega_A$ é o gradiente da fração mássica de A , \mathbf{N}_{Az} e \mathbf{N}_{Bz} os fluxos mássicos dos compostos A e B na direção z , respectivamente, c é a concentração da espécie e x_A é a fração molar do composto A .

A difusão entre compostos desempenha um papel muito importante em muitas aplicações. Sistemas de microcanais podem realizar esse fenômeno de transporte de forma rápida e compacta que podem intensificar o processo. Havendo baixo número de Reynolds indica fluxo laminar onde ocorre um ambiente controlado de transferência de massa convectiva na direção do fluxo. Assim se faz necessária a análise quantitativa da rede de microcanais para otimização de sistemas difusivos microfluídicos (MILOŽIČ et al., 2014).

Em um fluxo laminar no estado estacionário, os campos de velocidade não se cruzam, simplificando o modelo, diferentemente para fluxo turbulento. Para fluxo laminar, a

convecção transporta massa somente tangencialmente à velocidade, ou seja, ao longo das linhas de velocidade, não podendo haver transferência de massa por convecção entre as camadas adjacentes do fluido. Em equilíbrio, o fluxo laminar apresenta transferência de massa apenas por difusão (COMSOL, 2014a).

2.4.1.2.2. Difusão

Para haver a difusão de dois compostos a uma distância l , uma partícula do composto a ser diluído necessita de um tempo t dado pela Equação (11).

$$l = \sqrt{2Dt} \quad (11)$$

na qual o coeficiente de difusão D é dado pela relação de Stokes-Einstein apresentada na Equação (12), quando considerada a condição de não deslizamento (BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 2004; BRODY; KAMHOLZ; YAGER, 1997).

$$D = \frac{kT}{6\pi\mu a} \quad (12)$$

Este coeficiente é função da viscosidade absoluta do solvente μ , da temperatura T , da constante de Boltzman k ($k = 1,38066 \cdot 10^{-23}$ J/K) (BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 2004; LOPES, 2011) e do tamanho da partícula a (raio da partícula). Assim, partículas maiores possuem coeficiente de difusão menor e necessitam de maior distância para se difundirem (BRODY; KAMHOLZ; YAGER, 1997; VIRK; HOLDO, 2008). Este coeficiente depende da viscosidade local, que, por sua vez, depende da concentração local de todo o analito (Kamholz et al. 1999). A difusividade de algumas partículas pode ser pequena devido ao seu grande tamanho ocasionando uma difusão lenta, assim, o número de Péclet, que quantifica a importância do termo convectivo de acordo com o difusivo, muitas vezes é grande para esses fluxos (KIRBY, 2010).

2.4.1.3. Transporte de quantidade de movimento

Aplica-se um balanço de quantidade de movimento em um elemento de volume definido (Figura 4), por onde escoar um fluido, de modo a se deduzir a equação do movimento. O modo como a equação é deduzida foi apresentado na seção 2.4.1.1.

A Equação (13) expressa a equação do movimento na forma vetorial.

$$\frac{\partial}{\partial t} \rho \mathbf{v} = -[\nabla \cdot \Phi] + \rho \mathbf{g} \quad (13)$$

O divergente do tensor fluxo combinado de momento ϕ é o termo $[\nabla \cdot \phi]$, que é a somatória dos fluxos molecular e convectivo de momento. A Equação (14) exemplifica esse termo de forma matemática.

$$\phi = \boldsymbol{\pi} + \rho \mathbf{v}\mathbf{v} = p\boldsymbol{\delta} + \boldsymbol{\tau} + \rho \mathbf{v}\mathbf{v} \quad (14)$$

Onde $\boldsymbol{\pi}$ é o tensor fluxo molecular de momento; $\rho \mathbf{v}\mathbf{v}$ é o tensor fluxo convectivo de momento; p é a pressão; $\boldsymbol{\delta}$ é o tensor unitário com componentes δ_{ij} ; e $\boldsymbol{\tau}$ é o tensor fluxo viscoso de momento.

Assim, pode-se reescrever a Equação (13) do movimento na forma da Equação (15).

$$\underbrace{\frac{\partial}{\partial t} \rho \mathbf{v}}_1 = \underbrace{-[\nabla \cdot \rho \mathbf{v}\mathbf{v}]}_2 \underbrace{-\nabla p - [\nabla \cdot \boldsymbol{\tau}]}_3 + \underbrace{\rho \mathbf{g}}_4 \quad (15)$$

Onde ∇p é o vetor gradiente de p , sendo p um escalar; $\nabla \cdot \boldsymbol{\tau}$ é o vetor chamado "divergência de $\boldsymbol{\tau}$ ", que é um tensor; e $\nabla \cdot \rho \mathbf{v}\mathbf{v}$ representa o vetor "divergente de $\rho \mathbf{v}\mathbf{v}$ ", que é um produto diádico (produto tensorial de dois vetores). Os termos na Equação (15) correspondem à taxa de aumento do momento por unidade de volume (1), taxa de adição de momento por convecção por unidade de volume (2), taxa de adição de momento via transporte molecular por unidade de volume (3) e força externa sobre o fluido por unidade de volume (4) (BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 2004).

2.4.1.3.1. Lei de Newton da Viscosidade

Como foi obtida de forma empírica, a Lei de Newton da Viscosidade não é considerada propriamente uma lei. Ela exemplifica como a tensão de cisalhamento se relaciona com a lei de velocidade. Uma vez supondo que ocorra escoamento de forma permanente e que a velocidade em x está em função apenas de y , podemos escrever sua forma simplificada como na Equação (16), que descreve apenas fluidos Newtonianos.

$$\tau_{yx} = -\mu \frac{dv_x}{dy} \quad (16)$$

Sendo τ_{yx} a tensão de cisalhamento ou fluxo de momento de direção x na direção positiva de y , μ a viscosidade característica de cada material e $\frac{dv_x}{dy}$ o gradiente de velocidade.

Para escoamentos mais complexos temos a Equação (17) a seguir, que é a equação generalizada para a lei de Newton da viscosidade.

$$\boldsymbol{\tau} = -\mu(\nabla \mathbf{v} + (\nabla \mathbf{v})^T) + \left(\frac{2}{3}\mu - \kappa\right)(\nabla \cdot \mathbf{v})\boldsymbol{\delta} \quad (17)$$

Onde $\boldsymbol{\tau}$ é o vetor tensão de cisalhamento, μ é a viscosidade do fluido, κ é a viscosidade dilatacional (coeficiente que caracteriza do fluido), $\boldsymbol{\delta}$ é o tensor unitário com componentes δ_{ij} , $\nabla\mathbf{v}$ é o tensor gradiente de velocidade com componentes $\left(\frac{\partial}{\partial x_i}\right)v_j$, $(\nabla\mathbf{v})^T$ é "transposto" do tensor gradiente de velocidade com componentes $\left(\frac{\partial}{\partial x_j}\right)v_i$ e $\nabla\cdot\mathbf{v}$ é o divergente do vetor velocidade.

Na maioria dos casos não é utilizada a viscosidade dilatacional devido a tal grandeza ser desprezada quando o fluido é um gás, considerado como gás ideal monoatômico (κ é identicamente nulo), ou quando o fluido é um líquido, comumente considerado incompressível $(\nabla\cdot\mathbf{v}) = \mathbf{0}$. A viscosidade dilatacional é significativa quando é trabalhada absorção de som em gases poliatômicos e em fluidos aquosos contendo bolhas de gás (BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 2004).

2.4.1.3.2. Equação de Navier-Stokes

Para representar o transporte e conservação de momento temos a equação de Navier-Stokes que pode ser solucionada em conjunto com a equação de conservação de massa (equação da continuidade).

As equações de Navier-Stokes são válidas para modelagem de sistemas microfluídicos apenas quando a escala de comprimento física representativa do sistema é muito maior do que o percurso livre médio das moléculas que compõem o fluido, sendo assim, o número de Knudsen sendo menor que 1. Nesse caso, a hipótese do contínuo é válida. A razão entre o caminho livre médio, λ , e a escala de comprimento representativo, L , é chamado o número de Knudsen ($K_n = \lambda/L$).

Quanto mais se aumenta o número de Knudsen, mais importantes tornam-se os efeitos de rarefação, não podendo mais ser preditos pelos modelos de transporte tradicionais baseados na hipótese do *continuum* a queda de pressão, tensão de cisalhamento, fluxo de calor e taxa de fluxo mássico. Entretanto, também não são apropriados modelos simples baseados nos conceitos da teoria cinética dos gases, com exceção do caso de $Kn \gg 1$, que corresponde a condições muito próximas do vácuo total. Os modelos de fluxo apropriados dependem da faixa do número de Knudsen: para $Kn \leq 10^{-3}$ pode se considerar o fluxo um *continuum*, para valores de Kn entre 10^{-3} e 10^{-1} o fluxo é classificado como escoamento com deslizamento, para $10^{-1} \leq Kn < 10$ o fluxo é chamado de escoamento de transição,

enquanto para $Kn \geq 10$ o fluxo é denominado fluxo molecular livre (BESKOK; KARNIADAKIS, 1999; PINAZZA; SPIGA, 2003). Os dados apresentados foram baseados em informações empíricas, sendo que os limites entre os distintos regimes de fluxos podem ser dependentes da geometria (SOUZA, 2007). Como o fluido trabalhado na pesquisa é líquido, considera-se todo o sistema como *continuum*.

Quando combinadas a resolução dessas equações em um conjunto particular de condições de contorno, pode-se presumir a velocidade do fluido, sua pressão e a variação de concentração para uma dada geometria. Para estas equações, só são possíveis soluções analíticas em geometrias simples, como em fluxos entre duas placas paralelas ou em tubos circulares. Em geometrias complexas, resolvem-se estas equações de forma numérica. A seguir a equação de Navier-Stokes para um fluido compressível:

$$\underbrace{\rho \left(\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + \mathbf{v} \cdot \nabla \mathbf{v} \right)}_1 = \underbrace{-\nabla p}_2 + \underbrace{\nabla \cdot \left(\mu (\nabla \mathbf{v} + (\nabla \mathbf{v})^T) - \frac{2}{3} \mu (\nabla \cdot \mathbf{v}) \mathbf{I} \right)}_3 + \underbrace{\mathbf{F}}_4 \quad (18)$$

Onde \mathbf{v} é a velocidade do fluido, p é a pressão do fluido, ρ é a densidade do fluido, e μ é a viscosidade dinâmica do fluido. Os termos das equações correspondem às forças de inércia (1), as forças de pressão (2), as forças viscosas (3), e as forças externas aplicadas ao fluido (4).

2.4.1.3.3. Creeping Flow

Creeping Flow é o fluxo dominado pela viscosidade, também chamado de fluxo de Stokes. É mais comum em fluidos com grande viscosidade que escoam com dificuldade, como óleos e mel, mas também ocorre em fluidos não viscosos (LAUTRUP, 2004).

O fluxo em *Creeping Flow* é caracterizado por possuir o número de Reynolds muito pequeno, $Re < 1$. Assim, esse tipo de fluxo pode ocorrer para qualquer fluido, desde que a velocidade de escoamento e a dimensão geométrica de onde o fluido escoar acarretem em um número de Reynolds menor que 1 (um) (LAUTRUP, 2004).

Esse fluxo é matematicamente e numericamente mais simples de ser trabalhado devido à ausência de termos não lineares, como quando há turbulência. Outra vantagem é que a linearidade das equações possibilita expressar soluções para problemas de fluxo complicados como sobreposições lineares de soluções simples (LAUTRUP, 2004).

2.4.1.4. Hipótese do Contínuo

Como os fluidos são constituídos de moléculas, o enfoque molecular em seu estudo consiste em estudar suas propriedades a partir de seu comportamento molecular. Nesta perspectiva, a matéria é descontínua, ou seja, existem espaços vazios entre as moléculas. Com este enfoque molecular, o estudo de um fluido torna-se de difícil resolução matemática, pois a derivada de uma função só pode ser calculada em um ponto que apresenta uma função contínua. Devido a isto, trata-se o fluido como um meio contínuo. A hipótese do contínuo compreende na abstração da composição molecular e sua consequente descontinuidade. Considera-se que a dimensão de amostra analisada não influenciará na propriedade local medida e se despreza o comportamento individual das moléculas (BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 2004)

Em um elemento de volume a hipótese do contínuo atribui duas proposições: a primeira é que o fluido possui composição de partículas pequenas o suficiente para que suas propriedades sejam consideradas uniformes; e a segunda é que há um número suficiente de partículas para que se considere o sistema sem espaços vazios (BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 2004).

Assim, de acordo com esse modelo, as propriedades do fluido têm valor definido em cada ponto do espaço, podendo representá-las por funções contínuas no espaço e no tempo (BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 2004).

2.4.1.5. Caracterização do Fluxo

O número de Reynolds indica se o fluxo é laminar ou turbulento por meio da equação $Re = vd\rho/\mu$, sendo v a velocidade do fluido (m/s), d o diâmetro do tubo (m), ρ a densidade do fluido (kg/m^3) e μ a viscosidade do fluido ($\text{kg}/\text{m}\cdot\text{s}$). Os fluxos são classificados em laminar ou turbulento a partir de três faixas de valores de número de Reynolds: em $Re < 20$ tem-se fluxo laminar com ondulações mínimas; em $20 < Re < 1500$ tem-se escoamento laminar com ondulações pronunciadas; e em $Re > 1500$ tem-se escoamento turbulento. Em canais microfluídicos Re é geralmente baixo ($Re < 1$) indicando fluxo laminar (BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 2004; BRODY; KAMHOLZ; YAGER, 1997).

Em fluxos de dois fluidos miscíveis com propriedades semelhantes propôs-se a dispersão de Taylor por ser um dos fenômenos associados. Taylor demonstrou que, mesmo com difusão axial pequena, o efeito combinado de convecção axial e difusão radial possibilita

uma equação de difusão axial que rege a seção transversal média de concentração. Os resultados de Taylor foram depois apurados e propostos por Aris (1956) e Barton (1983) utilizando o método dos momentos, e por Brenner and Edwards (1994) usando expansão de múltiplos polos (CHEN; LAM, 2003).

Nos dispositivos microfluídicos a interação de convecção e difusão é crucial. Quando apenas a difusão molecular é considerada em um fluxo conduzido pela pressão, a propagação de um analito injetado em fluxo de Poiseuille ocorre mais rapidamente. A dispersão de Taylor ocorre porque a difusão molecular possibilita partículas suspensas em linhas de correntes com velocidades diferentes (CHEN; LAM, 2003).

O fluxo induzido por pressão é mais indicado para a maioria dos casos por possibilitar uma relativa flexibilidade e facilidade na implementação, além de proporcionar insensibilização à contaminação superficial, força iônica e pH. Esse fluxo gera um gradiente de velocidade parabólico que pode acarretar na complexidade de distribuição de analitos e indicadores. As moléculas, mesmo adicionadas em batelada ou continuamente, possuem uma distribuição dependente do tempo de residência e da posição. A difusividade controla a largura da distribuição das moléculas por meio do gradiente de velocidade (KAMHOLZ; YAGER, 2001). Quando o número de Péclet é grande negligencia-se o transporte difusivo na direção do fluxo (ISMAGILOV et al., 2000).

Novas tecnologias podem ser construídas com a capacidade de manter o fluxo laminar, onde existem correntes paralelas que se misturam apenas por difusão. Hatch et al., 2001 e Weigl & Yager, 1999 utilizaram esse processo como a base em imunoenaios. Sia & Whitesides, 2003 demonstraram difusão lenta usando membranas eletroquímicas como barreira, e microfabricação usando padrão de fluxo laminar multifásico no contorno. Em outra técnica utilizam o método de separação repetida, mistura e recombinação de correntes paralelas, onde ocorre uma mistura difusiva controlada de fluxo laminar para gerar gradientes moleculares estáveis perpendiculares a direção do fluxo. Os gradientes formados, temporal e espacialmente estáveis, podem ser produzidos em solução e em superfície, podendo ter formas complexas com a utilização de combinações de redes de microfluidos.

Assim, um canal longo e estreito apresenta uma resistência elevada à um canal com maior largura, mesmo que com comprimentos iguais. Esse tipo de fluxo exige uma bomba externa ou fonte de vácuo, e pode ser usado para uma vasta gama de composição de solventes e materiais que constituem os canais. Uma desvantagem do método é na utilização em ensaios que requerem separação de alta resolução, pois o perfil de velocidade em uma seção transversal é parabólico, fazendo com que as amostras em tampões sofram dispersão axial e

expansão dos picos. Além disso, altas quedas de pressão são necessárias para direcionar o fluxo devido a relação de a resistência ser inversamente proporcional ao raio ou altura do tubo (SIA; WHITESIDES, 2003)

A concentração em função da posição ao longo da direção do fluxo pode ser resolvida usando técnicas de diferenciação finitas comuns quando discretizada a malha bidimensional. A conservação de momento resolve a velocidade em cada nó, quando a viscosidade é assumida constante, empregando não deslizamento nas paredes. Não há modelagem da difusão na superfície da parede, que acarreta um pequeno erro, que pode ser recompensado usando uma malha mais refinada (KAMHOLZ; YAGER, 2001).

O comprimento de entrada necessário para o desenvolvimento completo de um fluxo em um tubo circular pode ser dado por meio da Equação (19) (KAMHOLZ et al., 1999).

$$L_e = 2d_h(0,379e^{-0,148Re} + 0,0550Re + 0,260) \quad (19)$$

sendo L_e o comprimento para desenvolver 99% do fluxo, d_h o diâmetro (diâmetro hidráulico) e Re o número de Reynolds. O diâmetro hidráulico é calculado por $4 * (A/P)$, sendo A a área e P o perímetro da seção transversal do canal (KAMHOLZ et al., 1999). Diâmetro hidráulico é utilizado quando se refere a escoamentos em tubos e canais não circulares.

A relação de proporção ou relação de aspecto (altura/largura) caracteriza uma das especificações técnicas para a fabricação de microcanais. O comportamento da mistura age diferentemente em diferentes relações de aspecto, ocasionando variações do comprimento de mistura necessário (VIRK; HOLDO, 2008). A relação de aspecto β é dada pela Equação (20). Com essa relação podemos encontrar um comprimento de mistura por meio da Equação (21).

$$\beta = \frac{h}{w} \quad (20)$$

$$Comp. de mistura = \frac{whv}{8\beta D} \quad (21)$$

2.4.2. COMSOL Multiphysics®

O COMSOL Multiphysics® é um software que utiliza métodos numéricos para resolução de problemas físicos diversos por meio de equações diferenciais parciais (EDP). O programa permite modelar e simular um determinado processo considerando apenas um fenômeno ou envolvendo acoplamento de fenômenos físicos.

O software permite o acesso ao sistema de equacionamento interno permitindo adicionar ou modificar equações e expressões ao modelo estudado. Ele efetua a compilação

das equações inseridas e inclui automaticamente os acoplamentos gerados pelas expressões definidas pelo usuário nos sistemas de equações a serem resolvidas no programa. Em seguida a geração das soluções, o programa fornece uma aba de ferramentas que permite trabalhar os resultados obtidos de acordo com a necessidade de cada usuário, podendo criar tabelas, gráficos, fazendo análises paramétricas e outras funcionalidades.

O COMSOL tem uma interface que permite importar modelos de outros softwares como CAD, Excel®, Matlab®, entre outros, para facilitar o entendimento da geometria do processo e a resolução do problema. O programa possui uma série de módulos específicos à física do problema que se deseja estudar. Em sua interface o programa pode apresentar de forma visual os fenômenos físicos selecionados no modelo estudado nas três dimensões, o que promove um maior entendimento do sistema como um todo.

2.4.2.1. Módulo CFD – Fluidodinâmica Computacional

A fluidodinâmica computacional (CFD – *Computational fluid dynamics*) faz parte de um crescente número de processos de desenvolvimento, sendo um espaço bem situado dentro de diversas especialidades de engenharia, como química, aeronáutica, mecânica, civil, e também em setores mais especializados como engenharia biomédica. Este módulo permite modelar todos os processos físicos e/ou físico-químicos que apresentam escoamento (COMSOL, 2014b).

Por integrar muitos processos e aplicações diferentes, os escoamentos devem ser entendidos e otimizados, visto que em muitos casos afetam outros processos. Em alguns casos o estudo é focado na forma como o fluxo afeta outros parâmetros do processo, ao invés de se estudar o próprio fluxo. Um exemplo seria o estudo do transporte de espécies através das diferentes partes de um reator químico. Existem casos também onde o fluxo adiciona parâmetros necessários na operação que afetam o próprio fluxo, como em um reator químico que gera pressão que perturba o fluxo. Além disso, no módulo é possível trabalhar com diversas descrições de escoamento compressível, não isotérmico, não newtoniano, bifásico e em meios porosos. Os regimes de escoamentos podem ser laminar ou turbulento (COMSOL, 2014b).

A pouco tempo apenas grandes empresas poderiam ter uma ferramenta de modelagem tão sofisticada. Atualmente engenheiros usam ferramentas de modelagem de software criando modelos realistas em seus próprios computadores. O COMSOL *Multiphysics*® se encaixa nessa área melhorando a capacidade de modelagem (COMSOL, 2014b).

2.4.2.2. Módulo Microfluídico

O módulo microfluídico é utilizado por engenheiros e cientistas para entender, prever e projetar sistemas microfluídicos. De modo a melhorar a compreensão, o uso de ferramentas de simulação no ciclo de *design* está se tornando mais difundido. O módulo microfluídico permite que os usuários modelem de forma rápida e precisa fluxos monofásicos, multifásicos, através de meios porosos, eletrocinéticos e de gás ligeiramente rarefeitos (COMSOL, 2014c).

Este módulo tem a capacidade de resolver fluxos estacionários e dependentes do tempo em espaços bidimensionais e tridimensionais. As interfaces físicas são pré-definidas e configuradas com formulações adequadas para diferentes tipos de fluxos. Para definir um problema de fluxo de fluido, as interfaces físicas usam parâmetros de entrada, tais como pressão e vazão, e propriedades físicas, tais como viscosidade e densidade. Diferentes interfaces físicas estão disponíveis para cobrir uma gama de fluxos microfluídicos. Como exemplo, temos: fluxo laminar, Creeping Flow, fluxo bifásico (campo de fase, conjunto de níveis e malha móvel), fluxo em meio poroso (Lei de Darcy, equações de Brinkman ou fluxo em meio livre ou poroso - que combina as equações de Brinkman com fluxo laminar) e deslizamento. O transporte de várias espécies também pode ser tratado com a interface Transporte de Espécies Diluídas (COMSOL, 2014c).

Em cada interface física microfluídica, os princípios físicos contidos são expressos na forma de equações diferenciais parciais, simultaneamente a condições iniciais e de contorno correspondentes (COMSOL, 2014c). Os projetos no COMSOL dão ênfase à física ofertando aos usuários equações que são resolvidas por cada mecanismo, oferecendo acesso total ao sistema de equações contidas, além de haver a flexibilidade de adicionar equações e expressões pelo usuário. Assim, as equações são resolvidas por meio do método dos elementos finitos. Alcançada as soluções, diversas ferramentas de pós-processamento ficam disponíveis para trabalhar os dados, onde são gerados gráficos pré-definidos automaticamente (COMSOL, 2014c).

Para modelar dispositivos microfluídicos, inicialmente define-se uma geometria, posteriormente selecionam-se os materiais e as interfaces físicas apropriadas. Configuram-se as condições iniciais e de contorno na interface física. Posteriormente, define-se a malha. Seleciona-se um *solver* de acordo com os padrões da interface física e resolve-se o problema. Assim, os resultados podem ser visualizados (COMSOL, 2014c).

Em escalas de comprimento menores que fluxos macroscópicos é quando ocorrem fluxos microfluídicos. Existem algumas vantagens na manipulação de fluidos em microescala como operação mais rápida e exigência de menos quantidade de fluido. Outra vantagem é o fácil controle das entradas e saídas devido à razão de volume superfície-área ser maior do que em um sistema macroscópico (COMSOL, 2014c). A Tabela 3 exemplifica fenômenos e dispositivos que o módulo microfluídico pode modelar.

Tabela 3 - Exemplos de fenômenos acoplados e dispositivos que se pode modelar usando o módulo microfluídico.

Microfluidos	
Fenômeno / Acoplamento	Fluxo de Pressão
	Reações Químicas em Fluxo Bifásico
	Dieletroforese
	Fluxo Eletrosmótico
	Eletroforese
	Fluxo Eletrotérmico
	Magnetoforese
	Transporte de massa usando difusão, migração e convecção
	Slip Flow (Deslizamento)
	Dispositivos
Canais microfluídicos	
Microreatores	
Micromisturadores	
Trocadores de calor MEMS	
Válvulas e bombas não-mecânicas	

Fonte: (COMSOL, 2014a)

De modo geral, à medida que a escala de comprimento de fluxo (L) reduz, propriedades que são escalonadas pela área da superfície dos sistemas tornam-se mais importantes quando comparadas àquelas que são escalonadas pelo volume do fluxo, como mostra a Tabela 4. Este fator é mais aparente em fluxo de fluido onde as forças viscosas, geradas por cisalhamento na superfície (com escala L_2) dominam as forças inerciais (com escalas volumétricas L_3). O número de Reynolds caracteriza a razão dessas forças e é

tipicamente baixo, apresentando fluxo laminar. Em alguns casos é aplicado o fluxo de Stokes ($Re < 1$).

Tabela 4 - Escala de vários fenômenos físicos com comprimento (L) e consequências para dispositivos microfluídicos.

Propriedade	Escala de comprimento	Consequência
Volume	L^3	As propriedades relacionadas à superfície são mais importantes em relação às propriedades volumétricas, as relações superfície / volume são altas.
Área	L^2	
Forças Inerciais	L^3	A viscosidade domina em relação a inércia, fluxo é laminar ou de Stokes. A ausência de convecção torna a mistura difícil.
Forças Viscosas	L^2	
Pressão de Laplace	L^{-1}	Os efeitos de tensão superficial tornam-se dominantes em fluxos de duas fases.
Força Capilar	L^{-1}	
Permeabilidade dos Meios Porosos	L^2	Geralmente se aplica a Lei de Darcy.
Escala de Tempo Difusivo	L^2	Possível mistura difusiva (embora ainda muito mais lenta que a convecção).
Campo elétrico (em tensão constante aplicada)	L^{-1}	Possibilidade de utilizar uma gama de efeitos electrocinéticos para impulsionar o fluxo.
Número de Knudsen	L^{-1}	Os fluxos de gás em micro são normalmente rarefeitos.

Fonte: (COMSOL, 2014a)

2.4.2.2.1. Números adimensionais importantes para estabilização do solver

A física dominante em um problema microfluídico traz informações contidas em muitos dos números adimensionais usados na caracterização do fluido. Estes números podem trazer informação importante sobre a estabilidade numérica do problema ao utilizar o método de elementos finitos (COMSOL, 2014a).

Quando se resolve problemas microfluídicos numericamente, o número de Reynolds (Re) e o número de Péclet (Pe) são números críticos adimensionais consideráveis na estabilização do solver. Ambos os números estão associados à importância relativa aos termos convectivos na equação diferencial parcial correspondente. Em microcanais de fluxo reduzido e pequeno número de Reynolds, podemos aumentar o grau de mistura de algumas formas: estreitando o canal para haver maior troca difusiva; tendo um coeficiente de difusão maior, o que aumenta o fluxo difusivo; obtendo um canal mais longo ou fluxo mais lento, havendo maior tempo para o fluido percorrer o canal e havendo mais tempo para difusão. O número de Péclet, adimensional, nos permite quantificar esses efeitos (COMSOL MULTIPHYSICS, 2016). Ele relaciona a importância do termo convectivo (Lv) de acordo com o difusivo (D) (para transferência de calor e de massa), e o número de Reynolds relaciona a importância do termo de inércia convectivo (ρvd) de acordo com a viscosidade (μ) nas equações de Navier-Stokes (COMSOL, 2014a).

$$Re = \frac{\rho vd}{\mu} \quad (22)$$

$$Pe = \frac{Lv}{D} \quad (23)$$

sendo ρ a massa específica do fluido, v a velocidade do fluido, d o diâmetro do tubo, μ a viscosidade do fluido, L o comprimento característico do fluxo e D o coeficiente de difusão. (KIRBY, 2010).

O modo com que esses números são definidos no COMSOL *Multiphysics*[®] podem gerar instabilidades numéricas quando algum deles é maior que um. Essas instabilidades são geralmente manifestadas como oscilações falsas na solução. Teoricamente, podem-se refinar esses valores tornando-os menores que um, mas na prática não é possível para muitos problemas (COMSOL, 2014a).

Há várias técnicas de estabilização incluídas que permite a resolução de problemas com números de Reynolds e de Péclet maiores que um. De modo mais simples, adiciona-se uma difusão numérica ao problema para melhorar sua estabilidade. Consegue-se isto selecionando o termo *Isotropic Diffusion* em *Inconsistent Stabilization* para qualquer física utilizada. Esse método não é necessariamente uma solução para problemas contendo difusão (COMSOL, 2014a).

No programa há também opções de estabilizações consistentes. Uma técnica consistente de estabilização reduz a difusão numérica adicionada ao problema à medida que a solução se aproxima da solução exata. Tanto a *streamline diffusion* (difusão simplificada)

quanto a *crosswind diffusion* (difusão vento-cruzado) estão disponíveis. A *streamline diffusion* acrescenta difusão numérica ao longo da direção do fluxo (difusão paralela às linhas de corrente). Já a *crosswind diffusion* acrescenta difusão ortogonal à velocidade (COMSOL, 2014a).

Regularmente é mais indicado utilizar a estabilização consistente sempre que possível. Caso ainda haja problemas de convergência, a estabilização inconsistente pode ser usada como um solucionador paramétrico ou dependente do tempo, eliminando lentamente esse termo (COMSOL, 2014a).

2.4.2.3. Teoria Geral de Fluxo de Fase Única

As interfaces físicas do fluxo de fluido de fase única são baseadas nas equações de Navier-Stokes, que em sua forma mais geral é dada por:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{u}) = 0 \quad (24)$$

$$\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \rho (\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} = \nabla \cdot [-p \mathbf{I} + \boldsymbol{\tau}] + \mathbf{F} \quad (25)$$

$$\rho C_p \left(\frac{\partial T}{\partial t} + (\mathbf{u} \cdot \nabla) T \right) = -(\nabla \cdot \mathbf{q}) + \boldsymbol{\tau} : \mathbf{S} - \frac{T}{\rho} \frac{\partial \rho}{\partial T} \bigg|_p \left(\frac{\partial p}{\partial t} + (\mathbf{u} \cdot \nabla) p \right) + \mathbf{Q} \quad (26)$$

Onde: ρ é a densidade (massa específica); \mathbf{u} é o vetor velocidade; p é a pressão; \mathbf{I} é a matriz identidade; $\boldsymbol{\tau}$ é o tensor de tensão viscoso; \mathbf{F} é o vetor de força de volume; C_p é a capacidade calorífica específica à pressão constante; T é a temperatura absoluta; \mathbf{q} é o vetor fluxo de calor; \mathbf{Q} contém as fontes de calor; e \mathbf{S} é o tensor taxa de deformação: $\mathbf{S} = \frac{1}{2} (\nabla \mathbf{u} + (\nabla \mathbf{u})^T)$ (COMSOL, 2014a; SAHU; GOLIA; SEN, 2012).

A operação “:” denota contração entre tensores definidos por $\mathbf{a} : \mathbf{b} = \sum_n \sum_m a_{nm} b_{nm}$. Este é por vezes referido como um duplo produto de ponto (COMSOL, 2014a).

A Equação (24) é a equação da continuidade e representa a conservação de massa. A Equação (25) é uma equação vetorial que representa a conservação de quantidade de movimento. A Equação (26) descreve a conservação de energia formulada em termos de temperatura, que é uma formulação intuitiva que facilita especificações de condições de contorno. Como no sistema estudado não há transferência de calor, não será especificado termos e utilização desta equação (COMSOL, 2014a).

Para completar as Equações (24) a (26) são necessárias relações constitutivas. Para fluidos Newtonianos que possuem relação linear entre tensão e distensão, Stokes deduziu a Equação (27).

$$\boldsymbol{\tau} = 2\mu\boldsymbol{S} - \frac{2}{3}\mu(\nabla \cdot \boldsymbol{u})\mathbf{I} \quad (27)$$

Em um fluido newtoniano, a viscosidade dinâmica μ depende de seu estado termodinâmico, mas não de seu campo de velocidade (COMSOL, 2014a).

2.4.2.3.1. *Creeping Flow* (Fluxo de Stokes)

A interface *Creeping Flow* utiliza equações de Navier-Stokes com o termo de inércia negligenciado. Muitas vezes referido como fluxo de Stokes, essa interface é adequada para pequenos números de Reynolds em canais muito pequenos e microfluidos. O fluxo de Stokes ocorre em sistemas com alta viscosidade ou pequenas escalas geométricas de comprimento, como microcanais ou dispositivos MEMS (Sistemas Microeletromecânicos). O fluxo, ainda, pode ser compressível ou incompressível (COMSOL, 2014b).

Além de poder modelar fluidos Newtonianos e não-Newtonianos, essa interface inclui modelos da lei de potência de Carreau, mas sem turbulência. Nessa interface é resolvida a equação de Stokes para conservação de quantidade de movimento e equação da continuidade para conservação de massa, podendo ser resolvidas de forma estacionárias ou dependentes do tempo (COMSOL, 2014b).

2.4.2.3.1.1. Fluxo Incompressível

As equações de Navier-Stokes resolvidos por padrão em todas as interfaces de fluxo de fase única aplicam-se a formulação compressível da equação de continuidade (Equação (24)) e a equação de quantidade de movimento (Equação (18)). Estas equações são aplicáveis para o fluxo incompressível assim como compressível com variações de densidade.

Quando as variações de temperatura no fluxo são pequenas, um fluido de fase única pode ser assumido como incompressível, isto é, ρ é constante ou quase constante. Este é o caso para todos os líquidos em condições normais e também para os gases a baixas velocidades. Para ρ constante, a Equação (24) reduz-se a Equação (8) e a Equação (18) torna-se

$$\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \rho(\mathbf{u} \cdot \nabla)\mathbf{u} = \nabla \cdot [-p\mathbf{I} + \mu(\nabla\mathbf{u} + (\nabla\mathbf{u})^T)] + \mathbf{F} \quad (28)$$

2.4.2.3.1.2. Estabilização Numérica – Técnicas de Estabilização para Fluxo de Fluidos

As equações de quantidade de movimento (Equações (8) e (28)) são equações de convecção-difusão não lineares. Elas podem tornar-se facilmente instáveis quando discretizadas pelo método de elementos finitos de Galerkin. Estes métodos de elementos finitos são geralmente necessários na obtenção de soluções físicas (COMSOL, 2014a).

Existem três tipos de métodos de estabilização para as equações de Navier-Stokes: *Streamline diffusion* (Difusão dinâmica), *Crosswind diffusion* (Difusão de vento cruzado) e *Isotropic diffusion* (Difusão isotrópica). Os dois primeiros são métodos de estabilização consistentes e o terceiro é um método de estabilização inconsistente.

Streamline Diffusion

Em sistemas que possuem equações fortemente acopladas, aplica-se o método de *Streamline Diffusion* (difusão dinâmica) a todo o sistema, e não separadamente à cada equação. Quem primeiro explorou esse tipo de método foi Hughes and Mallet (1986) que foram estendidas posteriormente aos mínimos quadrados de Galerkin (GLS) aplicados em Navier-Stokes (HAUKE; HUGHES, 1994). O tensor escala de tempo é um tensor diagonal (COMSOL, 2014a).

De modo padrão, a difusão dinâmica já vem ativada no programa por sua necessidade quando a convecção domina o fluxo (COMSOL, 2014a).

Quando o fluxo que governa o sistema é incompressível, suas equações estão sujeitas à condição de Babuska-Brezzi. Esta condição afirma que as funções base para a pressão devem possuir ordem inferior que as funções para velocidade. Caso as equações de Navier-Stokes incompressíveis possuam estabilização *Streamline diffusion*, é possível a utilização de interpolação de ordem igual. Portanto, *Streamline diffusion* é necessária quando se utilizam elementos de primeira ordem para velocidade e pressão. Isto é aplicável também quando se usa geometria *multgrid* e ao menos um nível de *multgrid* utiliza elementos lineares de Lagrange (COMSOL, 2014a).

Crosswind Diffusion

O *Crosswind diffusion*, além de ser formulada também em sistemas de equações, quando aplicada as equações de Navier-Stokes se torna um operador de captura de choque (COMSOL, 2014a).

Mesmo que os fluxos incompressíveis não apresentem ondas de choque, a *Crosswind diffusion* ainda é útil introduzindo difusão extra em camadas limites finas e camadas de cisalhamento que exigiriam malhas muito finas para resolver de outro modo (COMSOL, 2014a).

Como padrão, *Crosswind diffusion* está ativo no programa por tornar mais fácil a obtenção de uma solução, mesmo quando o problema é totalmente resolvido pela malha (COMSOL, 2014a).

Isotropic Diffusion

A difusão isotrópica adiciona difusão às equações de Navier-Stokes. Ela reduz de modo significativo a precisão da solução, porém faz um bom trabalho na redução de oscilações. Não melhora a estabilidade da equação da continuidade.

2.4.2.4. Transporte de Espécies Químicas

O comportamento das reações químicas em ambientes reais muitas vezes não é devidamente descrito pelos pressupostos de ambientes perfeitamente mistos ou controlados. O que significa que é necessário considerar o transporte de material através do espaço tempo. As interfaces físicas em transporte de espécies químicas acomodam todo tipo de transporte de material que podem ocorrer por difusão e convecção (tanto sozinhos como em combinações). Este ramo da física inclui interfaces de resolução de equações para misturas diluídas bem como concentradas, onde a propagação da espécie pode ocorrer em sólidos, fluidos livres ou meios porosos.

A interface de transporte de espécie diluída é aplicada em soluções em que a espécie transportada tem concentrações de, pelo menos, uma ordem de grandeza menor que o solvente. Nessa interface física devem ser escolhidas definições para simular transporte de espécies químicas através de difusão (Lei de Fick) e convecção (quando acoplado ao fluxo de fluido) (COMSOL, 2014a).

2.4.2.4.1. Interface e Teoria do Transporte de Espécies Diluídas

A interface de Transporte de espécies Diluídas é encontrada no ramo Transporte de Espécies Químicas. Quando utilizada, fornece um ambiente pré-definido de modelagem e estudo de espécies químicas transportadas por difusão e convecção e calcula o campo de concentração de um soluto diluído em um solvente. Nesta ramificação pode-se calcular o transporte e as reações de espécies dissolvidas em gás, líquido ou sólido. As forças motrizes para o transporte podem ser difusão pela lei de Fick, convecção, quando acoplado ao fluxo de fluido, e migração, quando acoplado a um campo elétrico (COMSOL, 2014a).

A interface física sustenta simulações de transporte de convecção e difusão em até três dimensões. A concentração molar c é a variável dependente. Além de resolver a concentração molar de cada espécie presente no sistema sendo possível modelar o transporte de espécies múltiplas, a interface assume automaticamente que a concentração de todas as espécies presentes no sistema é baixa, ou seja, todas as espécies são diluídas. As propriedades da mistura, como densidade e viscosidade, são assumidas como sendo as do solvente, devido a diluição. A diluição dos solutos, misturas e soluções diluídas é regulada pela Lei de Fick (COMSOL, 2014a).

2.4.2.4.1.1. Mecanismo de Transporte

Nesta interface a difusão é sempre incluída. Como padrão, a opção de convecção está selecionada como mecanismo de transporte adicional (COMSOL, 2014a).

2.4.2.4.1.2. Propriedades de Transporte

Este nó no programa é dependente das caixas de verificação selecionadas no âmbito de Mecanismos de Transporte na janela configurações para a interface de Transporte de Espécies Diluídas. Nele inclui apenas as seções demandadas pelos mecanismos de transporte ativados. Ali contém todas as equações que definem transporte de espécies diluídas, bem como entradas para as propriedades do material.

Quando a caixa de seleção de convecção está acionada, o subnó de mistura turbulenta fica disponível no menu de contexto, bem como a partir da barra de ferramenta Físicas, em atributos do menu (COMSOL, 2014a).

2.4.2.4.1.3. Entradas de Modelo

A velocidade de entrada do solvente deve ser especificada como uma entrada do modelo quando o transporte por convecção está ativo. Deve-se escolher um campo de velocidade solucionado por uma interface física de escoamento já adicionado ao modelo.

2.4.2.4.1.4. Equação do Balanço de Massa

Quando consideramos o transporte de massa de espécies diluídas ou componentes de misturas gasosas, temos difusão que resulta em gradientes de concentração. A convecção também contribui no fluxo das espécies químicas quando não há grandes quantidades de movimento do fluido. Assim, muitas vezes é interessante observar a combinação de convecção e difusão na solução de um sistema. Atribui-se ao modelo de transporte de espécies químicas a equação do balanço de massa por difusão e convecção.

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla c = \nabla \cdot (D\nabla c) + R \quad (29)$$

sendo c a concentração da espécie (mol/m^3), D o coeficiente de difusão (m^2/s), R é uma expressão da taxa de reação da espécie ($\text{mol}/\text{m}^3\text{s}$) e \mathbf{u} é o vetor velocidade (m/s).

O primeiro termo da Equação (29), da esquerda para a direita, representa o acúmulo ou consumo da espécie. O segundo termo representa o transporte convectivo de acordo com a velocidade. Do lado direito da equação, o primeiro termo representa o transporte de massa por difusão representando a interação entre a espécie diluída e o solvente. A interface possui a opção de considerar as propriedades de difusão anisotrópicas. O último termo representa uma taxa de reação entre as espécies estudadas. Se houver reação, outra etapa ao transporte de espécies diluídas deve ser adicionada de modo a descrever esse termo e a reação existente.

2.4.2.4.1.5. Formulação do Termo Convectivo

Como padrão ao transporte de espécies diluídas, é assumido que há transferência de massa por difusão e convecção para o cálculo do balanço de massa. Dessa maneira, há duas formas de apresentar o balanço de massa, sendo o termo convectivo não conservativo (Equação (29)) ou conservativo (Equação (30)).

$$\text{conservativo: } \frac{\partial c}{\partial t} + \nabla \cdot (c\mathbf{u}) = \nabla \cdot (D\nabla c) + R \quad (30)$$

Sendo cada equação tratada de forma ligeiramente diferente em suas soluções. Quando D é um tensor o processo de difusão pode ser anisotrópico.

Caso se expanda a formulação conservativa por meio da regra da cadeia, um dos termos de convecção é igual à zero para fluido incompressível, resultando na equação não conservativa. Esta é a formulação padrão (COMSOL, 2014a).

Quando há apenas difusão dominando o fluxo, não se utiliza o termo convectivo na equação de balanço de massa. A equação torna-se

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \nabla \cdot (D \nabla c) + R \quad (31)$$

2.4.2.4.1.6. Difusão

Utilizada apenas quando é definido um material com o coeficiente de difusão conhecido. Assim, define-se um coeficiente de difusão podendo ser escalar (para difusão isotrópica) ou um tensor (para difusão anisotrópica). Caso o material escolhido a partir da lista de materiais já venha com seu valor de coeficiente de difusão na lista de suas propriedades, não é necessário definir esse valor (COMSOL, 2014a).

2.4.2.4.1.7. Estabilização Consistente

As aplicações do transporte de espécies diluídas podem resultar em um modelo com alto número de Péclet, ou seja, sistemas em que a convecção domina a difusão. Dinamizar a transferência de massa por difusão ou por difusão *crosswind* é de extrema importância na obtenção de resultados razoáveis fisicamente. É oferecido duas opções de difusão *crosswind* que utilizam formulações diferentes na interface de transporte de espécies diluídas. A difusão *crosswind* torna o sistema de equações não linear, mesmo que ele seja linear.

Quando a caixa de seleção de difusão *crosswind* está selecionada, é adicionado um termo fraco à equação de transporte que reduz as oscilações espúrias, resultando num sistema não linear. As duas opções para o tipo de difusão *crosswind* são (COMSOL, 2014a):

Do Carmo e Galeão

Esta formulação é descrita em estabilização numérica e é a opção padrão do sistema. Este método, mesmo em malhas anisotrópicas, reduz o subdimensionamento ou superdimensionamento para um mínimo, mas pode, raramente, gerar sistemas de equações difíceis de convergir. Casos em que o sistema de equações não linear apresenta dificuldade para convergir pode ocorrer quando o número de Péclet é muito alto e o modelo pode conter camadas finas tais como descontinuidade de contato. Assim, é apresentada três opções.

- Refinar a malha, especialmente em regiões de finas camadas;
- Usar um solucionador não linear com fator de amortecimento constante e inferior a um;
- Modificar para a difusão *crosswind* Codina.

Codina

Esta formulação acrescenta difusão estritamente na direção ortogonal à direção alongada. Comparando com a formulação Do Carmo e Galeão, esta formulação acrescenta menos difusão, mas apresenta menos eficiência na redução de excessos e defeitos. Além disso, não é tão eficiente em malhas anisotrópicas. Uma vantagem é que o sistema não linear converge mais facilmente e os gradientes sub-resolvidos são menos dispersos. Esta opção pode resultar em mais subdimensionamentos e superdimensionamentos

É selecionada uma equação residual para ambos os métodos de estabilização consistente. A aproximação residual é o padrão e significa que os derivados dos componentes do tensor de difusão são negligenciados. Geralmente, essa configuração é suficientemente precisa e computacionalmente mais rápida. Caso necessário, em vez disso selecionar, *Full residual* (residual completo) (COMSOL, 2014a).

2.4.2.4.1.8. Estabilização Inconsistente

Definida pela *Isotropic diffusion*. Como padrão, difusão isotrópica não está selecionada para as equações de Navier-Stokes. Deve ser ativada, caso necessário (COMSOL, 2014a).

2.4.2.4.1.9. Discretização

A caixa de seleção de cálculo dos fluxos limite é selecionada como padrão do programa, que calcula variáveis de limite de fluxo preciso pré-definido. Os cálculos das seguintes variáveis de contorno de fluxo alteram de modo que (COMSOL, 2014a):

- `ndflux_c` (onde *c* é variável dependente da concentração) é o fluxo difusivo normal e corresponde ao fluxo de limites precisos quando a difusão é a única contribuição para o fluxo do termo. `ndflux_c` é calculada diretamente a partir da variável dependente quando o transporte num campo elétrico é incluído ou quando a forma conservativa da equação é utilizada.

- $ntflux_c$ (onde c é variável dependente da concentração) é o fluxo total normal e corresponde ao fluxo de limites precisos mais termos adicionais de transporte, como o fluxo convectivo quando se utiliza a forma não conservativa.

Se a caixa de seleção de cálculo dos fluxos limite não é selecionada, o programa, ao invés, calcula as variáveis de fluxo a partir das variáveis dependentes por extrapolação.

CAPÍTULO III

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os dispositivos foram projetados em 3D no software AutoCAD 2016 para então serem importados para o programa COMSOL *Multiphysics*[®] 5.0 para serem simulados. Os dispositivos foram então refeitos em CorelDRAW X8 para a impressão do fotolito e posteriormente a microfabricação dos dispositivos em laboratório.

Para a construção dos dispositivos foi utilizado o elastômero polidimetilsiloxano (PDMS) proveniente de Sylgard[®] juntamente com um agente de cura também proveniente de Sylgard[®] na proporção de 1:10, sendo que os moldes com os canais em alto-relevo foram fabricados com a utilização do polímero fotopolimerizável Fotoresiste Su-8 50, fornecido pela empresa Micro-Chem, juntamente com o revelador Su-8.

Para o estudo da sequência de diluição na rede de microcanais foi utilizada a proteína Albumina de Soro Bovino (BSA) proveniente de Sigma-Aldrich, 98%, diluída em solução tampão fosfato-salino PBS de pH 7,4 ($NaCl$ 0,137 mol/L (Sigma-Aldrich, 99,5%); KCl $2,80 \times 10^{-3}$ mol/L (Sigma-Aldrich, 99,0%); Na_2HPO_4 $8,10 \times 10^{-3}$ mol/L (Sigma-Aldrich, 99,0%); NaH_2PO_4 $1,50 \times 10^{-3}$ mol/L (Sigma, 98,0%)), sendo essa solução também utilizada como diluente no sistema de microcanais de modo a obter o gradiente de concentração. Essa mistura foi utilizada de modo a simular o comportamento de uma amostra biológica de plasma sanguíneo.

Para leitura das concentrações de saída das amostras por meio do espectrofotômetro UV-vis foi necessário pigmentar as amostras com o reagente de *Bradford* (azul de coomassie, 100 mg; etanol (Sigma-Aldrich), 50 mL; ácido fosfórico (Sigma-Aldrich), 100 mL; água ultrapura (Milli-Q), 850 mL), em uma proporção de 1:10 de amostra para reagente de *Bradford*.

O fotorresiste na lâmina de vidro possui uma espessura de aproximadamente 50 μm , fazendo com que os canais dos microdispositivos possuam essa mesma espessura.

De acordo com Sigma-aldrich.com (2000), o valor do coeficiente de difusão D do BSA é de $5,9 \times 10^{-7}$ cm^2/s . Utilizando a Equação (12) com o valor de raio da partícula fornecido em Sigma-aldrich.com (2000), encontramos um valor de $6,2 \times 10^{-7}$ cm^2/s .

A Tabela 5 mostra alguns parâmetros do fluido e do microdispositivo que foram utilizados para os cálculos de caracterização. São utilizados dados característicos da água, como viscosidade e densidade, devido ao fato do fluido ser muito diluído em tampão aquoso.

Tabela 5 - Dados iniciais e de entrada do fluxo.

Parâmetro	Símbolo	Valor	No Sistema Internacional de Unidades
Raio da partícula	a	3,48 nm	$3,48 \times 10^{-9}$ m
Área do canal	A	$7500 \mu\text{m}^2$	$7,5 \times 10^{-9}$ m ²
Concentração molar inicial do soluto	c_A	$1,51 \times 10^{-5}$ mol/L	$1,51 \times 10^{-5}$ mol/L
Diâmetro hidráulico	d_h	75 μm	$7,5 \times 10^{-5}$ m
Coefficiente de difusividade para testes iniciais	D	$5,9 \times 10^{-7}$ cm ² /s	$5,9 \times 10^{-11}$ m ² /s
Altura do canal	h	50 μm	5×10^{-5} m
Constante de Boltzman	k	$1,38066 \times 10^{-23}$ J/K	$1,38066 \times 10^{-23}$ Kg. m ² /s ² . K
Perímetro do canal	P	400 μm	4×10^{-4} m
Vazão de entrada	Q_0	0,125 mL/h	$3,472 \times 10^{-11}$ m ³ /s
Temperatura ambiente	T	25°C	298,15 K
Velocidade do fluido	v	4629,63 $\mu\text{m}/\text{s}$	$4,629 \times 10^{-3}$ m/s
Largura do canal	w	150 μm	$1,5 \times 10^{-4}$ m
Viscosidade do fluido	μ	$1,003 \times 10^{-3}$ Pa · s	$1,003 \times 10^{-3}$ Kg/m.s
Densidade do fluido	ρ	1 g/cm ³	1000 kg/m ³

Fonte: Autora (2016)

3.1. Construção do Dispositivo Microfluídico e Método de Análise de Amostra

Inicialmente os desenhos dos dispositivos em 2D foram feitos em CorelDRAW X8 para impressão em fotolito, que foi utilizado para confecção dos primeiros protótipos em laboratório.

Os modelos foram confeccionados no laboratório seguindo o método de *soft-litografia*. A metodologia utilizada foi uma adaptação da metodologia desenvolvida por Whitesides e colaboradores (BEEBE; MENSING; WALKER, 2002; MCDONALD et al.,

2000). A técnica constitui na preparação de uma máscara que é utilizada como molde para a construção do dispositivo.

Inicialmente é cortado um substrato de vidro nas dimensões de 25 mm x 25 mm, limpos com solução piranha (3:1; H₂SO₄: H₂O₂) para que elimine completamente os resíduos gordurosos sobre sua superfície. A seguir prepara-se um filme homogêneo de um polímero fotopolimerizável com auxílio de um *spin coating*. Uma gota do polímero (Fotoresiste Su-8 50) é depositada sobre a lâmina de vidro. Essa lâmina é inserida no equipamento *spin coating* para rotação. Ela é iniciada levando 5 segundos para atingir a velocidade de 500 rpm permanecendo por 8 segundos, em seguida leva mais 5 segundos para atingir a velocidade de 2000 rpm, permanecendo nessa velocidade por 25 segundos. Desse modo, o polímero é espalhado de forma homogênea no substrato.

Após essa etapa, a lâmina é colocada em aquecimento por 6 min a 36°C e depois por 25 min a 65°C. Assim, é alocado o fotolito, desenhado em CorelDRAW X8 e impresso, com os desenhos dos microcanais em cima da lâmina, e expostos a uma lâmpada UV de alta potência por 18 s em câmara de radiação. Apenas nas regiões por onde a radiação é transmitida haverá a fotopolimerização completa, no caso, nos canais que estão transparentes no fotolito. A seguir retira-se o fotolito da superfície da lâmina e a recoloca em aquecimento a 36°C por 1 min, e em seguida a 66°C por 5 min.

Posteriormente a lâmina é mergulhada em um revelador Su-8, capaz de solubilizar o polímero não fotopolimerizado, restando em alto relevo apenas o desenho ilustrado no fotolito. Então, a lâmina com os canais em alto relevo é alocada em placa de petri.

Na sequência, foi preparada uma mistura de PDMS juntamente com o agente de cura. Em um béquer misturou-se o PDMS ao agente de cura em uma proporção de 10% de agente de cura. Efetuou-se uma mistura manual por 10 minutos para mistura completa. A mistura foi desareada por 30 minutos sob vácuo e então despejada sobre a lâmina de vidro aguardando-se o seu tempo de cura de cerca de duas horas a 65 °C. Após a cura, o PDMS é retirado da lâmina, restando os microcanais em baixo relevo no PDMS.

O dispositivo em PDMS é selado com uma lâmina de vidro, formando a quarta parede dos microcanais do dispositivo. O vidro se adere ao material PDMS realizando a selagem natural. Assim, são perfuradas entradas e saídas no PDMS por onde são inseridos os capilares para alimentar os fluidos a serem analisados. Esses capilares são ligados a seringas que estão alocadas em uma bomba seringa (Harvard Apparatus 11 plus) que pressiona os êmbolos de forma uniforme, obtendo uma vazão controlada e constante de ambas as seringas.

Inicialmente se insere água em todo o dispositivo preenchendo todos os canais de modo a evitar caminhos preferenciais do fluido. Só então é inserida a solução de BSA em uma entrada e solução tampão em outra, para se iniciar o processo de mistura em etapas nos dispositivos.

Após a passagem dos fluidos pelos microcanais, amostras do líquido são coletadas através dos capilares de saída, no período em que o sistema está estável. As amostras são pigmentadas utilizando o reagente de *Breadfor* que torna a solução azul proporcionalmente a concentração de BSA presente na alíquota.

Uma curva de calibração foi construída variando a concentração de 100 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, quantificando a absorção por meio do espectrofotômetro UV-vis. Uma amostra de 50 μL dos canais de saída é diluída com 450 μL de água ultrapura, adicionado 500 μL do reagente de *Bradford* e correlacionado às concentrações de entrada e saída.

Por meio da curva de calibração é possível realizar a leitura de uma amostra em estudo, pigmentando-a da mesma forma que se pigmentou as concentrações de saída para construção da curva. Assim, pode-se verificar em que ponto a amostra se encontra na curva de calibração definindo seu valor de concentração.

CAPÍTULO IV

4. DESENVOLVIMENTO

4.1. Modelagem matemática

Para definir o tipo de escoamento do fluido é calculado o número de Reynolds por meio da Equação (22). Como o canal que estamos estudando é do formato retangular se usa o diâmetro hidráulico do canal ao invés do diâmetro (KAMHOLZ et al., 1999). Assim, temos o número de Reynolds no valor de $Re = 0,346$. Seu baixo valor indica um fluxo laminar e, sendo menor que 1, o escoamento pode ser considerado como fluxo de Stokes (*Creeping Flow*) (LAUTRUP, 2004).

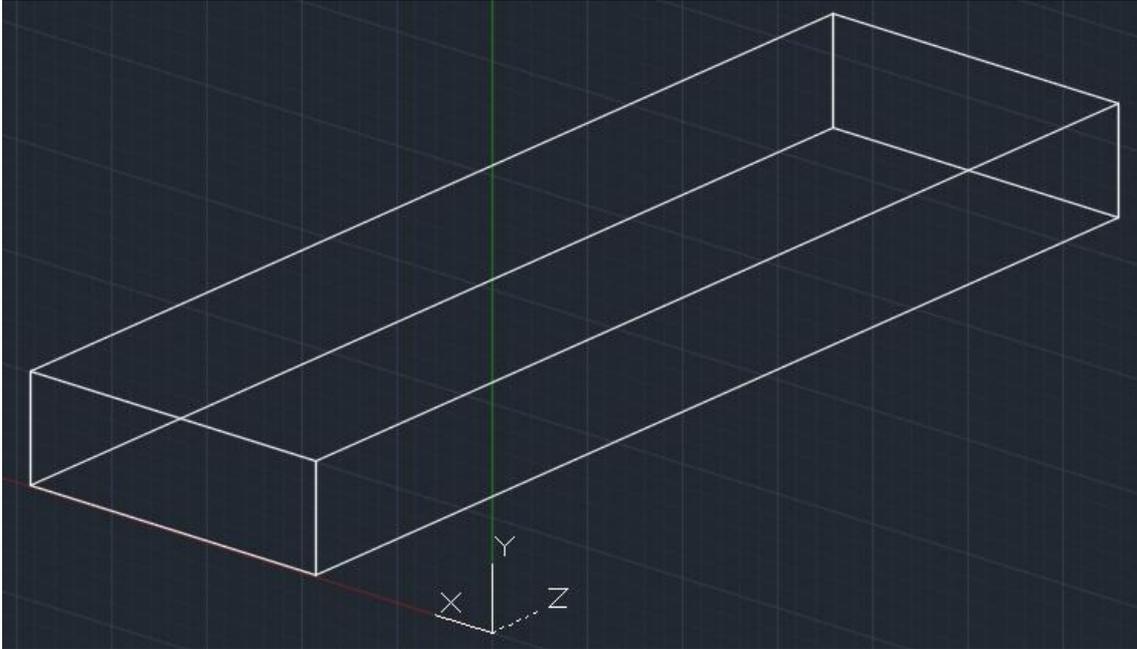
O número de Péclet também é calculado de modo a definir o quanto a difusividade é influente na direção do fluxo. Para tal cálculo utilizamos a Equação (23). O comprimento característico é definido como o diâmetro hidráulico e o valor do coeficiente de difusão da BSA em água utilizado foi $D = 5,9 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. Assim, o valor do número de Péclet é $Pe = 5884,32$.

Com alto número de Péclet e baixo número de Reynolds, pode-se utilizar, na modelagem, o regime de fluxo laminar e a equação da difusão para o deslocamento das espécies químicas, sendo que várias soluções podem ser postas em contato sem que haja a mistura de seus componentes. Dados de taxa de fluxo de cada solução definem a área de ocupação de cada componente em fluxo no canal microfluídico, o que é comum para fluxos em microescala. Quando temos um canal com a largura maior que a altura, teremos um número de Reynolds baixo e um número de transferência de massa de Péclet alto. Assim, podemos controlar a distribuição de uma espécie no canal controlando a vazão de cada espécie (KIRBY, 2010).

O aumento do coeficiente de difusão acarreta em uma redução do número de Péclet tornando a mistura dominada pela difusão ao invés da convecção. Essa diferença não é ocasionada por uma mudança real na natureza da difusão, mas uma consequência da distribuição hidrodinâmica no fluxo no canal (VIRK; HOLDO, 2008).

Na etapa de modelagem se faz necessário a definição das coordenadas do fluxo no interior dos microcanais, as quais estão demonstradas na Figura 5, sendo a direção z a direção do escoamento.

Figura 5 – Coordenadas do microcanal.



Fonte: Autora (2016)

A equação da continuidade em um sistema de coordenadas retangulares, para uma espécie A , em termos de concentração, com ρ e D_{AB} constantes, é exposta na Equação (32).

$$\frac{\partial c_A}{\partial t} + v_x \frac{\partial c_A}{\partial x} + v_y \frac{\partial c_A}{\partial y} + v_z \frac{\partial c_A}{\partial z} = D_{AB} \left[\frac{\partial^2 c_A}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c_A}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c_A}{\partial z^2} \right] + R_A \quad (32)$$

Considerando que: o escoamento está em estado estacionário, ignorando potenciais efeitos de entrada; devido ao fluxo ser laminar com pequeno número de Reynolds, a velocidade do fluxo ocorre apenas na direção z ; que a difusão ocorre apenas nas direções x e y , negligenciando a difusão na direção z ; além de não haver reação no sistema. A Equação (32) é simplificada para a Equação (33).

$$v_z \frac{\partial C_A}{\partial z} = D_{AB} \left[\frac{\partial^2 C_A}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C_A}{\partial y^2} \right] \quad (33)$$

Posteriormente é tomada a equação de conservação de quantidade de movimento para um fluido Newtoniano com ρ e μ constantes (Equação de Navier-Stokes). Essa equação é escrita para cada direção do plano cartesiano, como exemplificado nas Equações (34), (35) e (36).

$$\begin{aligned} x: \rho \left(\frac{\partial v_x}{\partial t} + v_x \frac{\partial v_x}{\partial x} + v_y \frac{\partial v_x}{\partial y} + v_z \frac{\partial v_x}{\partial z} \right) \\ = -\frac{\partial p}{\partial x} + \mu \left[\frac{\partial^2 v_x}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_x}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_x}{\partial z^2} \right] + \rho g_x \end{aligned} \quad (34)$$

$$\begin{aligned}
y: \rho \left(\frac{\partial v_y}{\partial t} + v_x \frac{\partial v_y}{\partial x} + v_y \frac{\partial v_y}{\partial y} + v_z \frac{\partial v_y}{\partial z} \right) \\
= -\frac{\partial p}{\partial y} + \mu \left[\frac{\partial^2 v_y}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_y}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_y}{\partial z^2} \right] + \rho g_y
\end{aligned} \tag{35}$$

$$\begin{aligned}
z: \rho \left(\frac{\partial v_z}{\partial t} + v_x \frac{\partial v_z}{\partial x} + v_y \frac{\partial v_z}{\partial y} + v_z \frac{\partial v_z}{\partial z} \right) \\
= -\frac{\partial p}{\partial z} + \mu \left[\frac{\partial^2 v_z}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_z}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_z}{\partial z^2} \right] + \rho g_z
\end{aligned} \tag{36}$$

Para simplificar as equações são considerados: o estado estacionário do sistema; que há velocidade apenas na direção z e que essa velocidade varia nas direções x e y ; que a pressão varia apenas na direção z ; e que os efeitos da gravidade são desprezados. Assim, resta apenas a Equação (37) correspondente à Equação (36) da direção z .

$$-\frac{\partial p}{\partial z} + \mu \left[\frac{\partial^2 v_z}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_z}{\partial y^2} \right] = 0 \tag{37}$$

A variação entre o valor de concentração obtido por meio dos testes laboratoriais em relação ao valor obtido por meio da simulação, levando em consideração a concentração obtida com o coeficiente de difusividade da literatura, é calculada pela função erro dada na Equação (38).

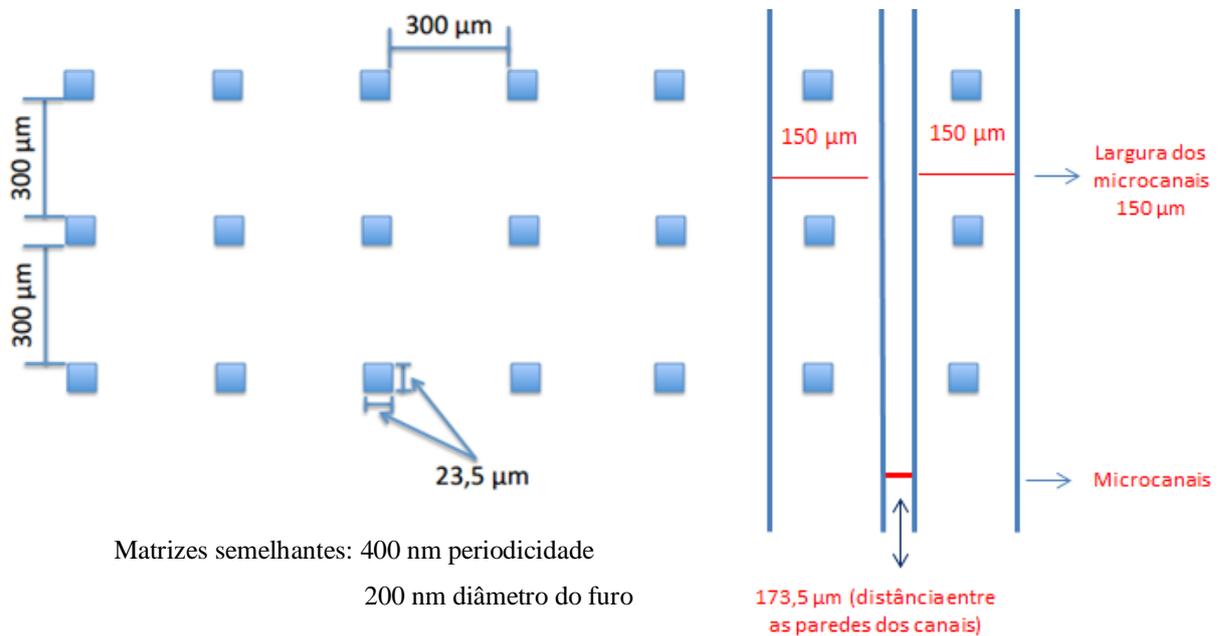
$$\%erro = \frac{|valor\ simulado\ esperado - valor\ encontrado|}{valor\ simulado\ esperado} \times 100\% \tag{38}$$

sendo o valor simulado esperado referente a concentração obtida com a simulação do coeficiente de difusão encontrado na literatura ($D = 5,9 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$), e o valor encontrado refere-se ao resultado de concentração obtido laboratorialmente.

4.2. Desenvolvimento dos dispositivos microfluídicos

Os canais dos dispositivos microfluídicos foram construídos tendo 150 μm de largura. Quando construído o dispositivo final, os canais de saída devem ter essa dimensão com uma distância pré-determinada devido à disposição dos microarranjos (quadrados azuis na Figura 6) onde terão nanoburacos que serão posteriormente inseridos. Os microarranjos devem estar no centro do microdispositivo, por onde passará um laser monocromático e realizará a leitura de concentração com auxílio de um computador. A Figura 6 exemplifica a disposição dos microarranjos. Este feixe de laser deve estar alinhado colinearmente aos microarranjos para realização das leituras de concentrações finais.

Figura 6 - Dimensões requeridas dos microcanais devido à disposição dos nanoburacos para leitura de concentração por Laser.



A altura dos microcanais é de 50 µm, pois quando uma gota do fotorresiste é pingada na lâmina de vidro e posta em rotação, ao se espalhar pela lâmina possui aproximadamente essa espessura. Mas, devido à necessidade de observar o comportamento no interior dos canais, os dispositivos foram construídos em AutoCAD tendo metade dessa espessura. Assim, quando importados para o software COMSOL *Multiphysics*[®] considera-se a superfície superior como sendo a simetria do dispositivo. Desse modo, teremos a simulação de apenas metade do dispositivo, mas virtualmente o programa faz seus cálculos para o dispositivo completo. Além disso, o comprimento dos canais varia de acordo com os testes a serem realizados e o dispositivo utilizado.

Inicialmente desejava-se verificar se a transferência de massa simulada no interior dos microcanais utilizando o coeficiente de difusividade da literatura forneceria o mesmo resultado que o obtido experimentalmente no dispositivo microfluídico. Então, projetaram-se três dispositivos semelhantes, tendo duas entradas de fluidos em microcanais distintos que se unem em escoamentos paralelos (sem haver choque frontal) e depois de percorrer certa distância em contato os fluidos são separados em duas saídas. As distâncias utilizadas foram de 1000, 4500 e 6000 µm

Em um dos microcanais da entrada foi alimentada uma solução tampão sem a presença da proteína BSA e no outro, a mesma solução tampão contendo uma concentração conhecida de BSA. Cada dispositivo possuía comprimentos de contato diferentes entre os dois fluidos.

Dessa forma foi possível testar se esses comprimentos seriam longos o suficiente para que os fluidos estudados apresentassem mistura completa. A Figura 7 expõe os dispositivos descritos.

Além de validar o modelo fenomenológico desenvolvido, os dispositivos projetados e combinados com o modelo, podem ser utilizados para estimar a difusividade mássica de espécies marcadoras de câncer, cuja difusividade ainda não esteja disponível na literatura.

Figura 7 - Microdispositivos desenhados em AutoCAD com comprimento de canal de mistura de (A) 6000 μm , (B) 4500 μm e (C) 1000 μm .

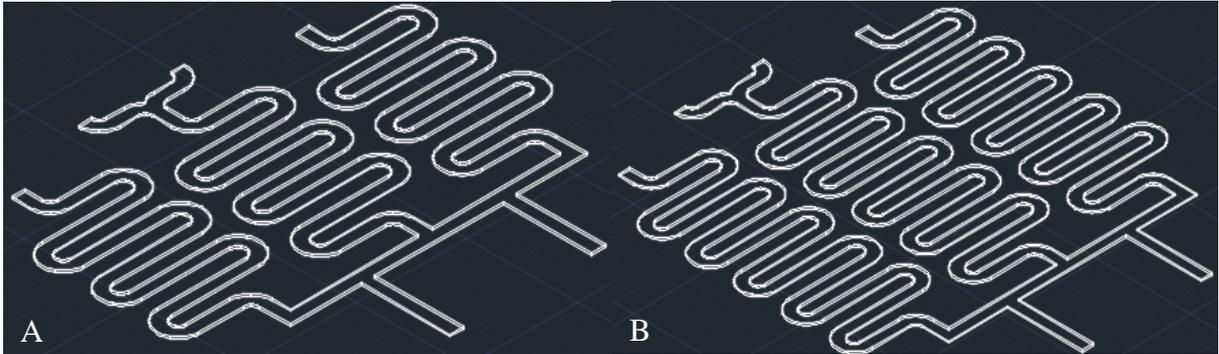


Fonte: Autora (2016)

Após, foi projetado dois dispositivos contendo duas entradas e três saídas com os canais tendo comprimentos de mistura de 9962 μm e 16000 μm , respectivamente, sendo o canal central bifurcado de modo a quantificar a concentração de saída nas bifurcações e verificar se houve a mistura completa, ou seja, verificar se o comprimento de canal utilizado é suficiente para haver a difusão total dos fluidos. Os dispositivos possibilitaram, também, observar o comportamento dos fluidos para se iniciar a obtenção de um gradiente de

concentração a partir das saídas dos canais. A Figura 8 exemplifica estes dispositivos projetados em AutoCAD 3D.

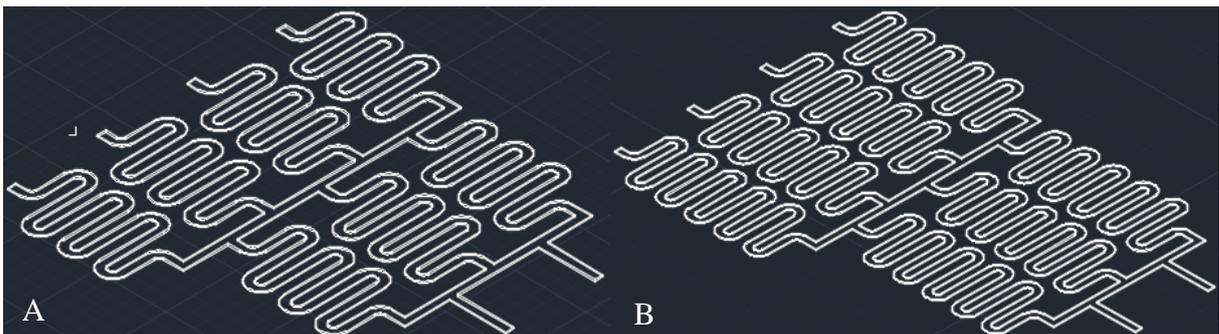
Figura 8 - Microdispositivos com duas entradas e três saídas, com canal central bifurcado, tendo comprimento de mistura de (A) 9960 μm e (B) 16000 μm .



Fonte: Autora (2016).

Ainda, no intuito de observar o comportamento dos fluidos e da mistura nos canais, foram projetados dois dispositivos com os comprimentos de mistura de 9960 μm e 16000 μm cada, porém, com duas entradas e quatro saídas, passando por dois estágios de mistura. A Figura 9 apresenta os dois dispositivos.

Figura 9 - Microdispositivos com duas entradas e quatro saídas tendo comprimento de mistura de (A) 9960 μm e (B) 16000 μm .

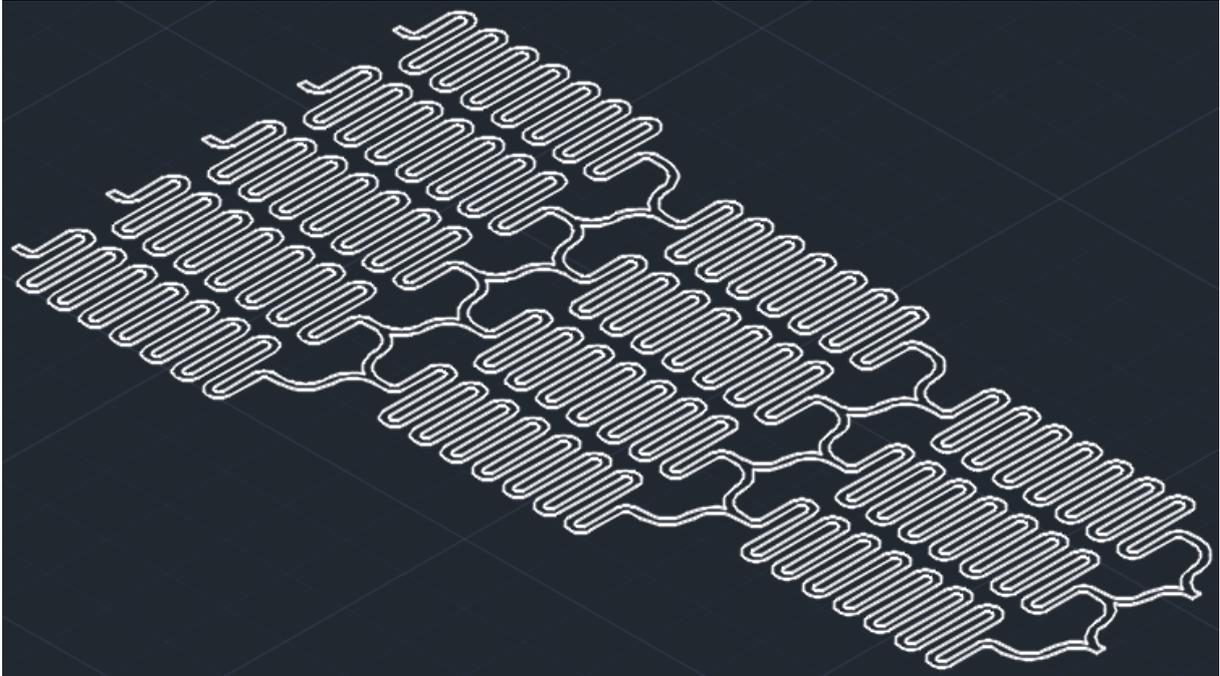


Fonte: Autora (2016)

Posteriormente, visando obter a separação das correntes com mais precisão, foi feita uma modificação no *design* do dispositivo, na etapa onde os fluxos se encontram. A modificação deu-se em utiliza uma bifurcação em **Y** ao invés de **T** como estava sendo utilizada até o momento. Assim, foi projetado um dispositivo tendo duas entradas e cinco saídas, de modo a observar o comportamento dos fluidos e verificar a variação de

concentração de saída de cada canal de mistura. A Figura 10 expõe esse dispositivo contendo comprimento de canais de mistura de 25000 μm .

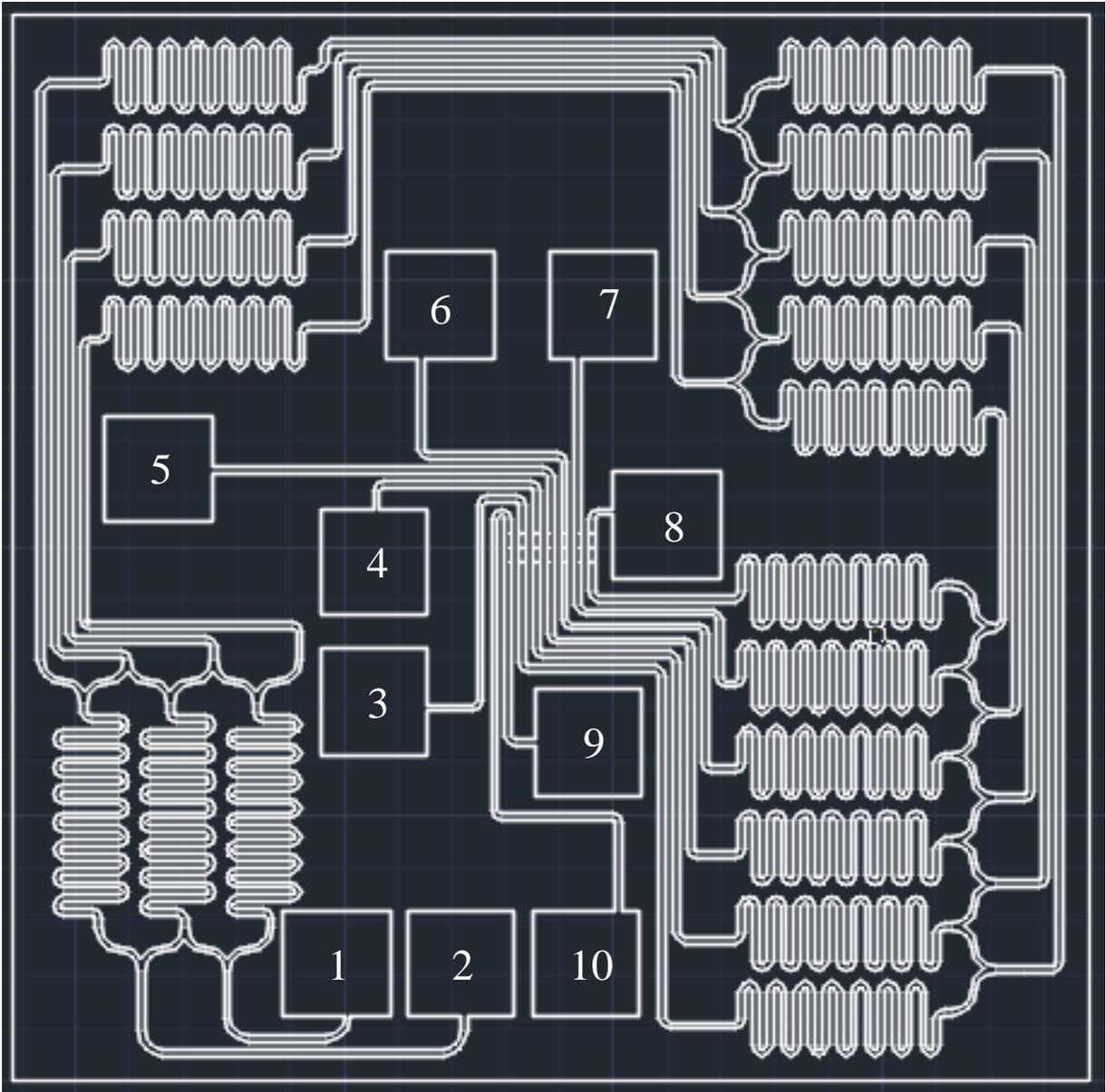
Figura 10 - Microdispositivo com duas entradas e cinco saídas com canais de mistura de 25000 μm de comprimento e junção dos microcanais no formato de Y.



Fonte: Autora (2016)

Por fim, foi projetado o dispositivo com duas entradas e seis saídas, de modo a se obter um gradiente de concentração, sendo que os microcanais de saída mais externos devem possuir concentrações idênticas as das duas correntes de entrada, e os demais microcanais da saída, quatro concentrações intermediárias. Este dispositivo foi projetado fazendo com que os canais de saída passassem bem no centro do microdispositivo, pois é a posição por onde o laser monocromático de leitura de concentração deve passar e onde se localiza os microarranjos com nanoburacos. Por meio da Figura 11 podemos observar o modo com que as etapas de diluição são dispostas ao redor do centro, deixando esse espaço para os canais de saída. Além dos fluidos BSA e solução tampão para diluição, também há uma entrada e uma saída para fluir uma amostra a ser comparada simultaneamente com o gradiente de concentração. Todos os canais de saída passam pelo laser, de modo que haja a leitura simultânea das concentrações.

Figura 11 - Microdispositivo para construção do gradiente de concentração final e dosagem simultânea de amostra, tendo comprimento de mistura de 25000 μm e junção dos microcanais em formato de Y.

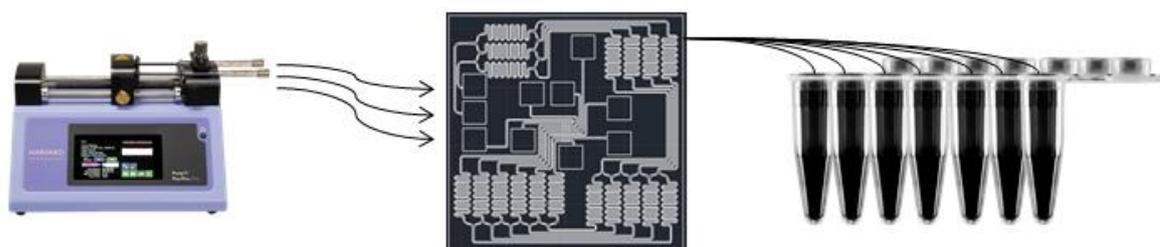


Legenda: O fluido concentrado (BSA diluído em tampão) é inserido na entrada 1 e a solução tampão é inserida na entrada 2. Após passagem por todas as etapas de diluição os fluidos são coletados nas saídas de 3 a 8, sendo a saída 3 a mais diluída e a 8 a mais concentrada. Na entrada 9 é inserida a amostra desconhecida a ser estudada para comparação simultânea ao gradiente de concentração formado nas saídas de 3 a 8. Na saída 10 recolhe-se a amostra desconhecida sem passar por nenhuma alteração. Fonte: Autora (2016).

Todos os microdispositivos foram posteriormente desenhados também em CorelDRAW 2D por exigência da gráfica para a impressão do fotolito. Em todos os projetos em CorelDRAW há quadrados nas extremidades dos canais. Esses quadrados são os locais

onde são feitos furos no dispositivo em PDMS para inserção dos tubos capilares. Por esses tubos ocorrerá a entrada e saída dos fluidos. Os tubos de entrada são ligados a seringas alocadas em uma bomba-seringa que impulsiona simultaneamente os êmbolos de duas seringas, bombeando os fluidos para dentro do dispositivo.

Figura 12 - Esquema de impulsão dos fluidos nos dispositivos microfluídico e coleta posterior passagem.



Fonte: Autora (2017).

4.3. Simulação em COMSOL *Multiphysics*[®]

Inicialmente foi confeccionado o dispositivo no software AutoCAD 2016. Tanto os modelos de testes quanto o modelo final foram construídos e testados seguindo os mesmos procedimentos.

Os canais dos dispositivos foram confeccionados tendo 150 μm de largura, 25 μm de altura e comprimento variando de acordo com o dispositivo testado. Os canais quando confeccionados no laboratório possuem 50 μm de altura, mas foram desenhados tendo metade deste valor, para, na simulação, ser considerada a simetria do canal a face superior, reduzindo assim o esforço computacional para a resolução do modelo matemático por meio do programa COMSOL (Figura 7 a Figura 10).

Ao iniciar o software COMSOL *Multiphysics*[®], os fenômenos físicos de interesse são selecionados, no caso *Creeping Flow* e *Transport of Diluted Species*, além do regime do processo em estudo, no caso, estado estacionário.

Foi definida a unidade de comprimento sendo μm , e a geometria do dispositivo foi então importada do software AutoCAD. A seguir, inseriu-se os dados de entrada, como: a constante de difusividade $D = 5,9 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$; a concentração de entrada do composto estudado (BSA), $c_0 = 1,51 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$; e a taxa de vazão $Q_0 = 0,125 \text{ mL/h}$.

Definiu-se, então, o material contido dentro dos microcanais, não levando em consideração o material que constitui o dispositivo, ou seja, a rugosidade das paredes não é

considerada. Considera-se que, inicialmente, todo o dispositivo contém água, devido ao material diluente estudado (solução tampão) possuir propriedades muito próximas a da água.

Primeiro, o modelo de escoamento *Creeping Flow* foi configurado e definiu-se que o fluido era incompressível. De acordo com o tópico 2.4.2.3.1.2 são determinadas a estabilização consistente com *Streamline diffusion* e *Crosswind diffusion*, e a estabilização inconsistente sem *Isotropic diffusion*, pois é considerada a difusão apenas nas direções x e y . O programa considera automaticamente a condição de contorno de não deslizamento nas paredes que pode ser modificada de acordo com a necessidade.

Definem-se duas faces de entrada dos fluidos em duas abas separadas, sendo que em uma entrada flui solução tampão e na outra entrada o BSA. Na seção de condições de contorno escolhe *Laminar inflow* e como condição de entrada em *Laminar inflow* define-se *Flow rate*. As condições de entrada são: $Q_0/2$, devido ao dispositivo ser estudado com metade de sua geometria real; e o dobro de L_e , calculado por meio da Equação (19), para se ter uma margem de segurança. Considerando a tubulação do microcanal a ser estudado temos um valor de $L_e = 95,8 \mu\text{m}$. Definem-se, então, todas as faces de saída em uma mesma aba, sendo a condição de contorno a pressão atmosférica. Por fim, insere a aba de simetria selecionando a superfície superior do dispositivo.

Em seguida, o modelo *Transport of Diluted Species* para a transferência de massa é configurada. Como o número de Péclet é alto, seleciona a opção de convecção na seção *Transport Mechanism*. Do mesmo modo que na interface *Creeping flow*, utiliza-se as estabilizações consistentes *Streamline diffusion* e *Crosswind diffusion*, sendo que o tipo de *Crosswind diffusion* é definido como *Do Carmo e Galeão* como explicado no tópico 2.4.2.4.1.7. Em estabilização inconsistente, da mesma forma que em *Creeping flow*, não é selecionada a difusão isotrópica. Na aba *Transport Properties 1*, em *Model Inputs*, é definida *Velocity fields* na lista de campo de velocidade, além de especificar que o valor do coeficiente de difusão D irá variar de acordo com os valores que usuário inserir, na seção *Diffusion*, na caixa de texto de D_c . Então se define duas faces de entrada adicionando duas abas *concentration*. Em ambas se seleciona a opção *Species c* na seção *concentration*. Porém, em uma é definido $c_{0,c} = c_0$, sendo a concentração de entrada do BSA, e em outra aba se define $c_{0,c} = 0$, sendo a entrada de solução tampão. Por fim, definem-se todas as saídas em uma mesma aba *outflow*.

Após, é definida a malha para discretização da geometria. A malha de todos os dispositivos foi definida por teste. Primeiro se testa a malha *Sweep* e posteriormente outras

malhas com mais definições. Na aba *Size* define-se o *Calibrate for* como *Fluid dynamics* e define-se a espessura da malha em *Predefined*. A escolha dessa espessura é feita por teste, refinando a malha e comparando os resultados com o da malha anterior até que seja atingida uma maior eficiência do programa em executar a simulação. Há malhas que não convergem dependendo da geometria, pois, como ela apresenta muitas curvas, a malha encontra dificuldade de se adaptar tendo um refinamento que não demande um extremo esforço computacional. Assim, há a necessidade da modificação da malha e/ou de sua espessura. Desse modo, não há uma padronização de malha para todos os dispositivos em consequência das suas geometrias variadas.

Por fim, são classificados os passos de estudo para cálculo da simulação. Na aba *Study 1* desmarca-se a área *x*, uma vez que o COMSOL gera automaticamente um grande número de gráficos padrão, eles são desativados. No primeiro passo (*Step 1*) mantém-se o cálculo apenas de *Creeping flow*, desmarcando o *Transport of Diluted Species*. Em seguida adiciona-se outro passo estacionário onde desmarca os cálculos de *Creeping flow* mantendo apenas os cálculos para *Transport of Diluted Species*. Assim, o programa calcula cada passo separadamente, apresentando um resultado de forma mais rápida e concisa. Então, na seção *Values of dependent variables*, em *Transport of Diluted Species*, é definido que os cálculos dessa seção não interferem os resultados da seção anterior. Assim, marca a opção *Values of variables not solve for*, na lista *Method* escolhe a opção *Solution* e na lista *Study* escolhe a opção *Study 1, Stationary*. Na seção *Study Extensions* marca-se a opção *Auxiliary sweep* onde é inserido valores de difusão para serem simulados. Assim, teremos os resultados da variação de concentração de soluto no fluxo para diferentes coeficientes de difusão. É variado os valores de difusão em $5,9 \times 10^{-3}$, $5,9 \times 10^{-4}$, $5,9 \times 10^{-5}$, $5,9 \times 10^{-6}$, $5,9 \times 10^{-7}$, $5,9 \times 10^{-8}$, $5,9 \times 10^{-9}$ e $5,9 \times 10^{-10}$ cm^2/s para quase todos os dispositivos testados. É definida a variação dos valores do coeficiente de difusão para comparação com os resultados laboratoriais. Assim, compara-se os valores de concentrações de saída simulados com os valores obtidos laboratorialmente, determinando qual o coeficiente de difusão apresenta concentrações de saída simuladas mais próximas das laboratoriais.

Depois de configurado todo o sistema, a resolução do modelo é processada no software.

CAPÍTULO V

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Análise I – Teste de difusividade

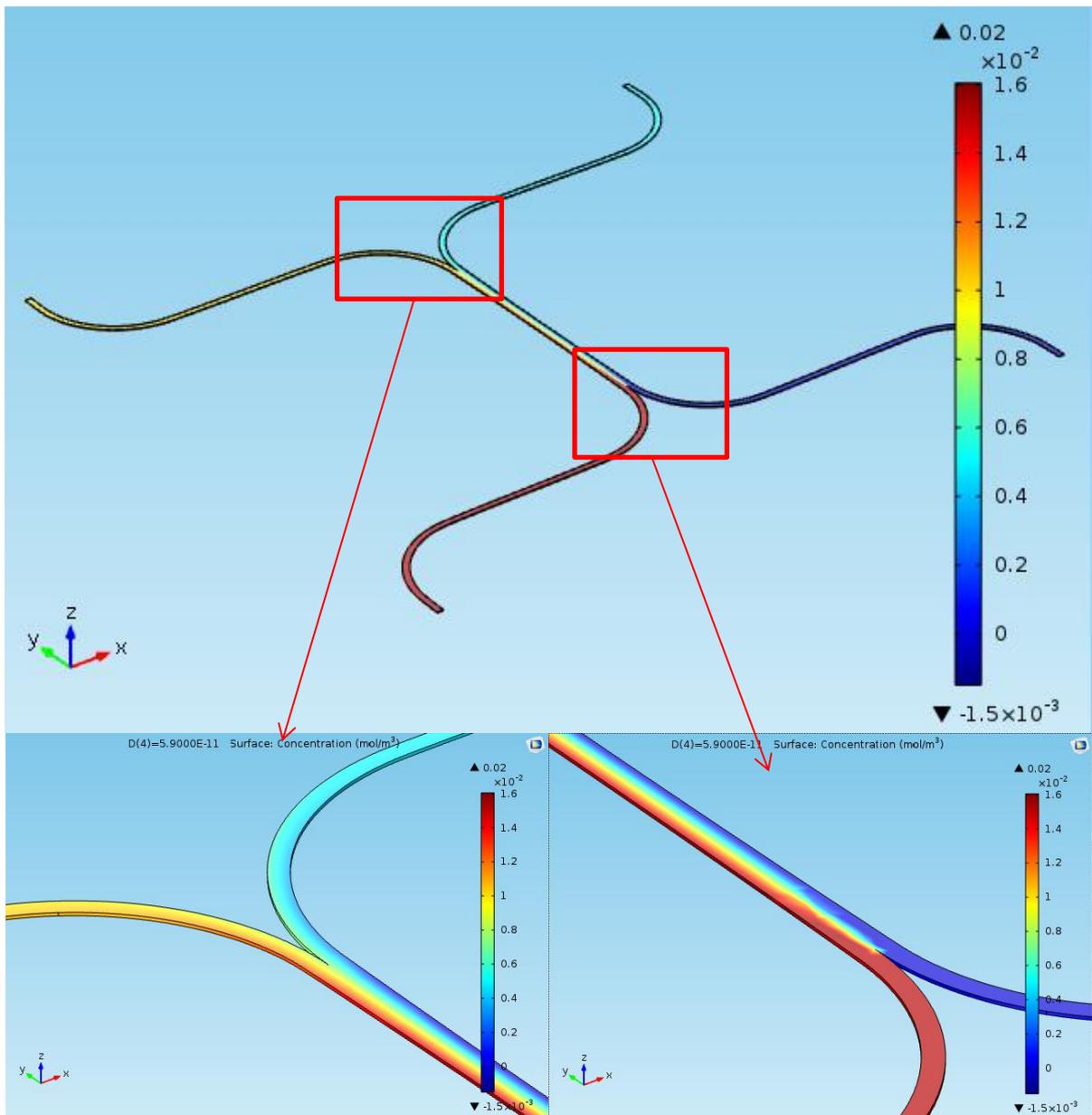
Inicialmente foram realizados testes para encontrar o comprimento de canal necessário para que houvesse a mistura completa entre os fluidos, sendo eles solução de BSA e solução tampão, e analisar o valor do coeficiente de difusão entre os fluidos. Os primeiros modelos projetados em AutoCAD para testes encontram-se na Figura 7.

As Figura 13, Figura 14 e Figura 15 expõem a variação da concentração nos canais com valor de coeficiente de difusividade $D = 5,9 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, taxa de fluxo de entrada $Q_0 = 1,0 \text{ mL/h}$ e concentração de entrada de solução de BSA $c_0 = 1,51 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

Após a simulação, foi realizado o projeto dos dispositivos em CorelDRAW para impressão do fotolito e confecção dos dispositivos em laboratório. A Figura 16 exemplifica esses modelos.

Na Tabela 6 temos os valores de concentração de saída variando seus coeficientes de difusividade entre $5,9 \times 10^{-4}$ e $5,9 \times 10^{-9}$, para os três comprimentos de canais testados. Em destaque temos os valores de concentração para do coeficiente indicado na literatura, $5,9 \times 10^{-7}$. Cada dispositivo apresenta duas saídas, sendo *Con.>* a saída que apresenta a maior concentração (observando as Figura 13, Figura 14 e Figura 15, seria a saída do lado esquerdo, correspondente a entrada do mesmo lado, em vermelho), e *Con.<* a saída que apresenta a menor concentração (saída do lado direito). Além disso, temos os valores de concentração obtidos com os testes laboratoriais para cada comprimento de canal e o cálculo da função erro comparando os resultados laboratoriais com os resultados obtidos na simulação a partir do coeficiente de difusividade da literatura.

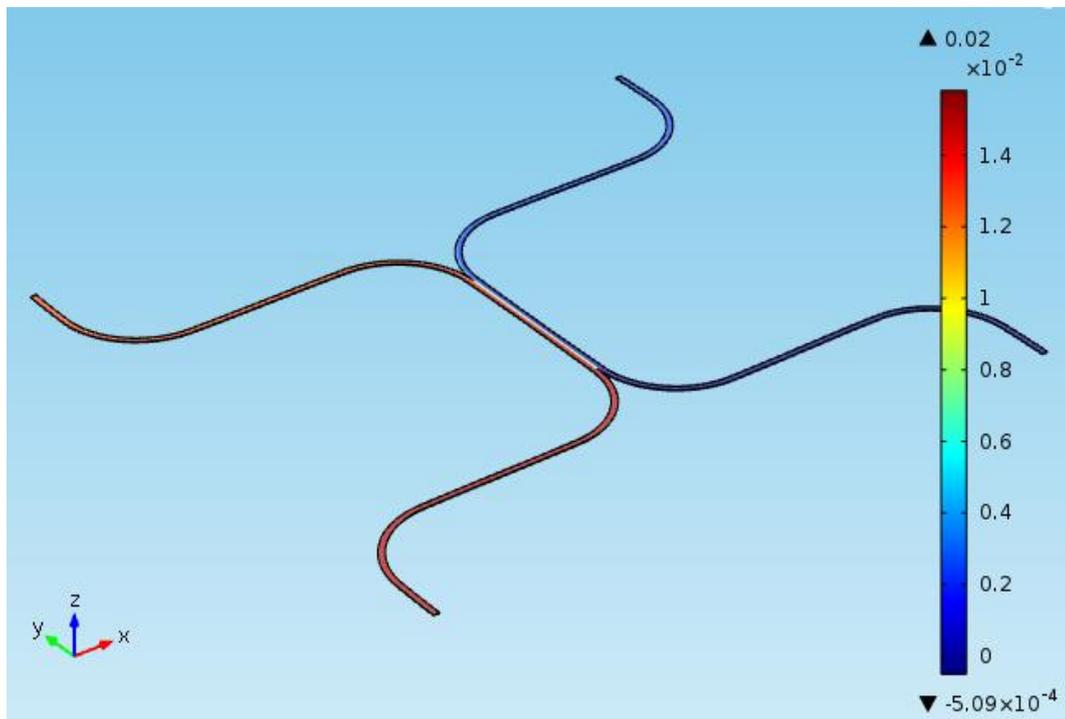
Figura 13 – Variação de concentração no dispositivo microfluídico de 6000 μm de comprimento de contato e difusividade constante de $5,9 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$.



Fonte: Autora (2016)

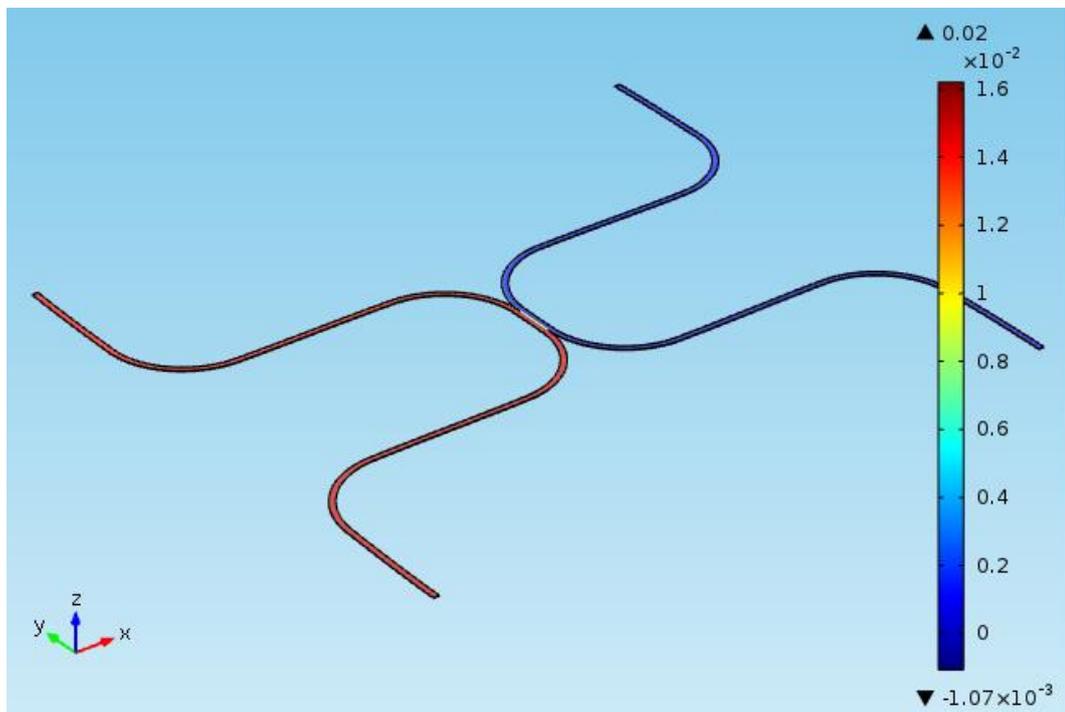
Observando a Figura 13 nota-se que, utilizando o coeficiente de difusão a partir da literatura, esse comprimento de canal não seria o suficiente para que houvesse a mistura completa dos fluidos. Conseqüentemente, os canais com comprimento de contato menor (de 4500 μm e 1000 μm) também não obteriam uma mistura completa, como podemos observar nas Figura 14 e Figura 15.

Figura 14 - Variação de concentração no dispositivo microfluídico de 4500 μm de comprimento de contato e difusividade constante de $5,9 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$.



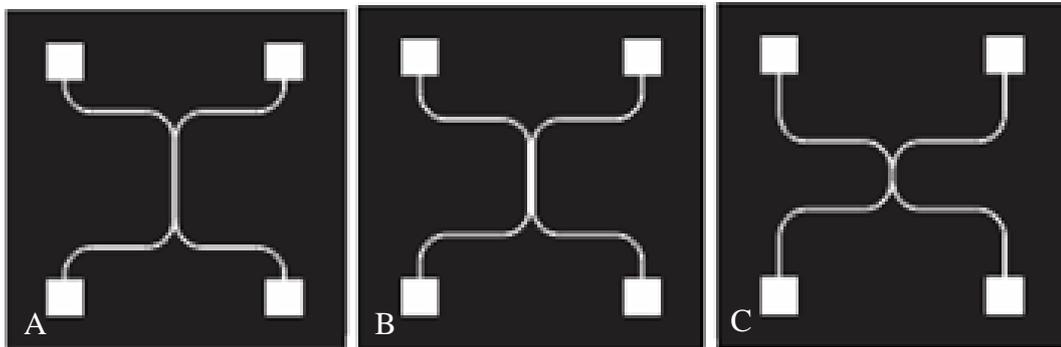
Fonte: Autora (2016)

Figura 15 - Variação de concentração no dispositivo microfluídico de 1000 μm de comprimento de contato e difusividade constante de $5,9 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$.



Fonte: Autora (2016)

Figura 16 - Microdispositivos projetados em CorelDRAW com duas entradas e duas saídas, com comprimentos de mistura de (A) 6000 μm , (B) 4500 μm e (C) 1000 μm .



Fonte: Autora (2016)

Tabela 6 - Concentrações de saídas dos microcanais com comprimentos de contato de 6000 μm , 4500 μm e 1000 μm e variação do coeficiente de difusividade em comparação com as concentrações encontradas nos testes laboratoriais.

	Simulação 6000 μm		Simulação 4500 μm		Simulação 1000 μm	
Dif. (cm^2/s)	Con. > (mol/L)	Con. < (mol/L)	Con. > (mol/L)	Con. < (mol/L)	Con. > (mol/L)	Con. < (mol/L)
5,90E-04	7,55E-06	7,54E-06	9,14E-06	5,97E-06	9,14E-06	5,97E-06
5,90E-05	8,75E-06	6,35E-06	1,21E-05	3,01E-06	1,21E-05	3,01E-06
5,90E-06	1,00E-05	5,07E-06	1,26E-05	2,54E-06	1,26E-05	2,54E-06
5,90E-07	1,02E-05	4,96E-06	1,26E-05	2,50E-06	1,26E-05	2,50E-06
5,90E-08	1,02E-05	4,95E-06	1,26E-05	2,50E-06	1,26E-05	2,50E-06
5,90E-09	1,02E-05	4,95E-06	1,26E-05	2,50E-06	1,26E-05	2,50E-06
	Teste laboratorial		Teste laboratorial		Teste laboratorial	
	1,04E-05	1,05E-06	1,08E-05	3,02E-06	1,16E-05	2,42E-06
Erro	2,38%	78,91%	14,68%	20,92%	8,33%	3,10%

Legenda: Con.> indica coluna que apresenta resultados de concentração de saída mais concentrada e Con.< indica coluna que apresenta resultados de concentração de saída menos concentrada. Erro calculado por meio da Equação (38). Fonte: Autora (2016).

Comparando os resultados obtidos por meio da simulação com aqueles obtidos em testes laboratoriais, podemos perceber que houve certa divergência. Os testes para os comprimentos de 6000 e 4500 μm apresentaram grandes divergências em relação aos valores

esperados, como podemos observar a partir dos cálculos de erro. Comparando valores absolutos, o teste laboratorial indica que teríamos um valor do coeficiente de difusão da ordem de $10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$, aproximadamente. Assim, foram realizados mais testes, não só para se encontrar os valores do comprimento necessário para difusão completa, mas também para observar o comportamento do fluido no interior do dispositivo.

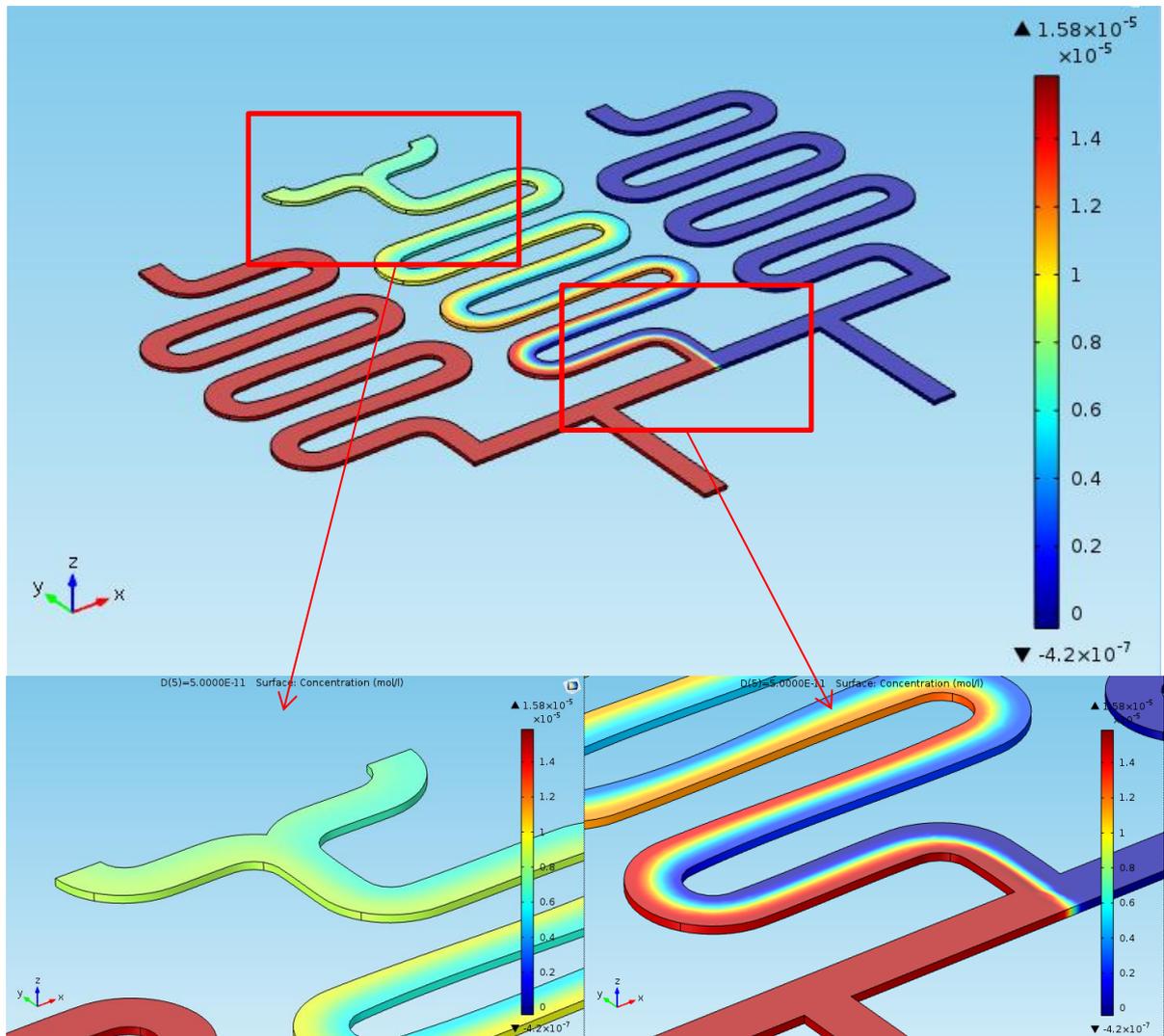
Além disso, modificou-se a vazão de entrada do fluido para $Q_0 = 0,125 \text{ mL/h}$, devido ao fluxo anterior não garantir as especificações usadas na modelagem matemática da microfluídica, o que pode ter levado o sistema operar em condições nas quais a suposição de *creeping flow* não se aplique.

5.2. Análise II – Teste de comportamento microfluídico

As Figura 17 e Figura 18 mostram dispositivos com duas entradas e três saídas, sendo o canal central bifurcado de modo a poder medir suas concentrações de saída e, caso forem iguais, indica mistura completa nesse comprimento de canal. Foram projetados dois comprimentos para testes, sendo um de $9962 \mu\text{m}$ e outro de $16000 \mu\text{m}$. Os comprimentos foram estendidos devido aos valores de concentrações de saída nos testes laboratoriais anteriores estar bastante divergentes, indicando uma necessidade de maior comprimento para mistura completa. Os dados de entrada nesse teste foram: coeficiente de difusão $D = 5,9 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, vazão de entrada $Q_0 = 0,125 \text{ mL/h}$ e concentração de entrada de solução de BSA $c_0 = 1,51 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

Do mesmo modo que o teste anterior, também foram projetados modelos em CorelDRAW para impressão dos fotolitos, a fim de proceder a construção dos dispositivos laboratorialmente e poder realizar a comparação dos resultados. Na Figura 19 são apresentados os dispositivos projetados. As Tabela 7 e Tabela 8 apresentam os resultados de variação de concentrações para os testes citados variando o coeficiente de difusividade, do mesmo modo que na Tabela 6.

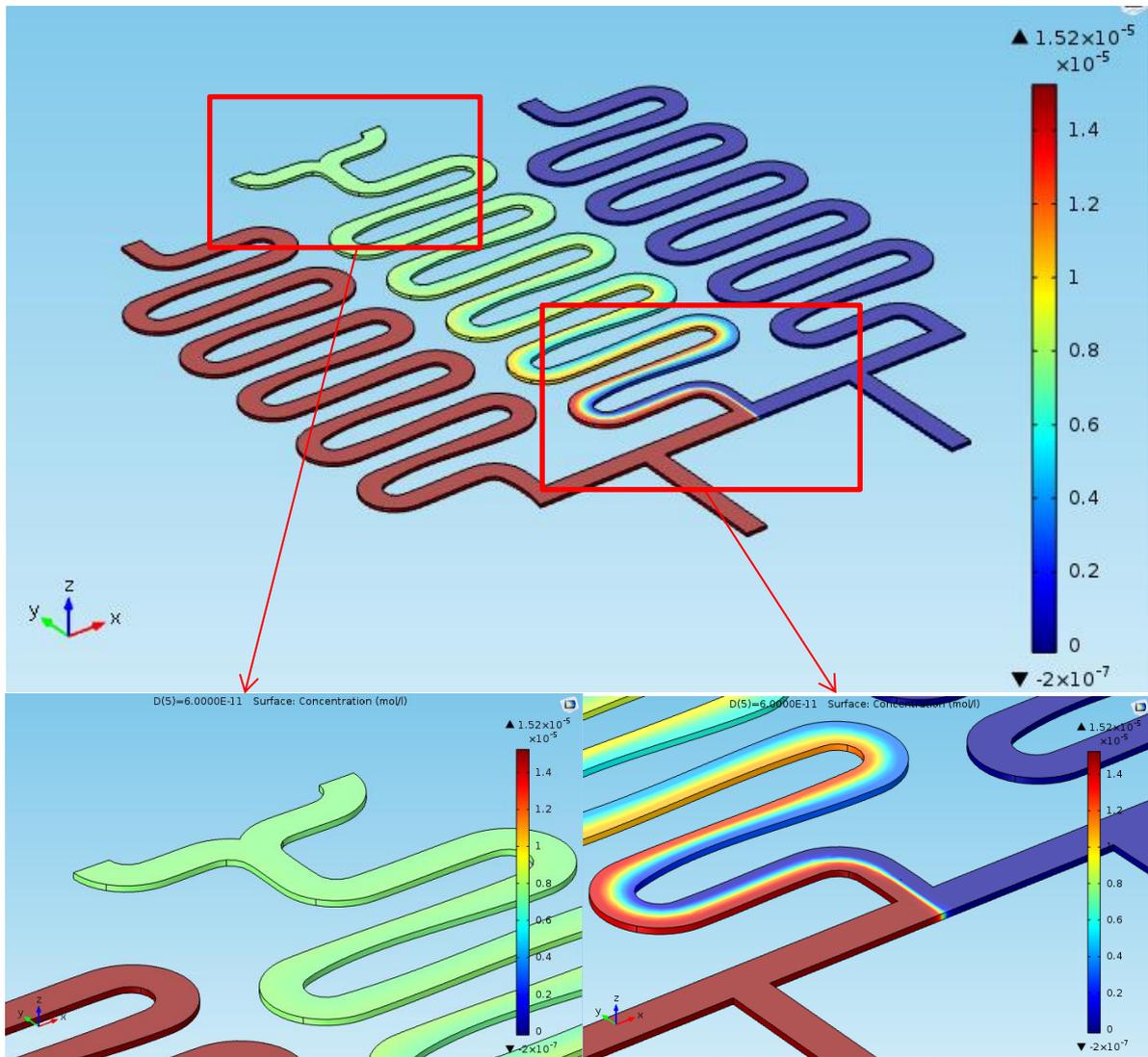
Figura 17 – Sistema de microcanais de comprimento 9962 μm com duas entradas e três saídas com canal central bifurcado.



Fonte: Autora (2016).

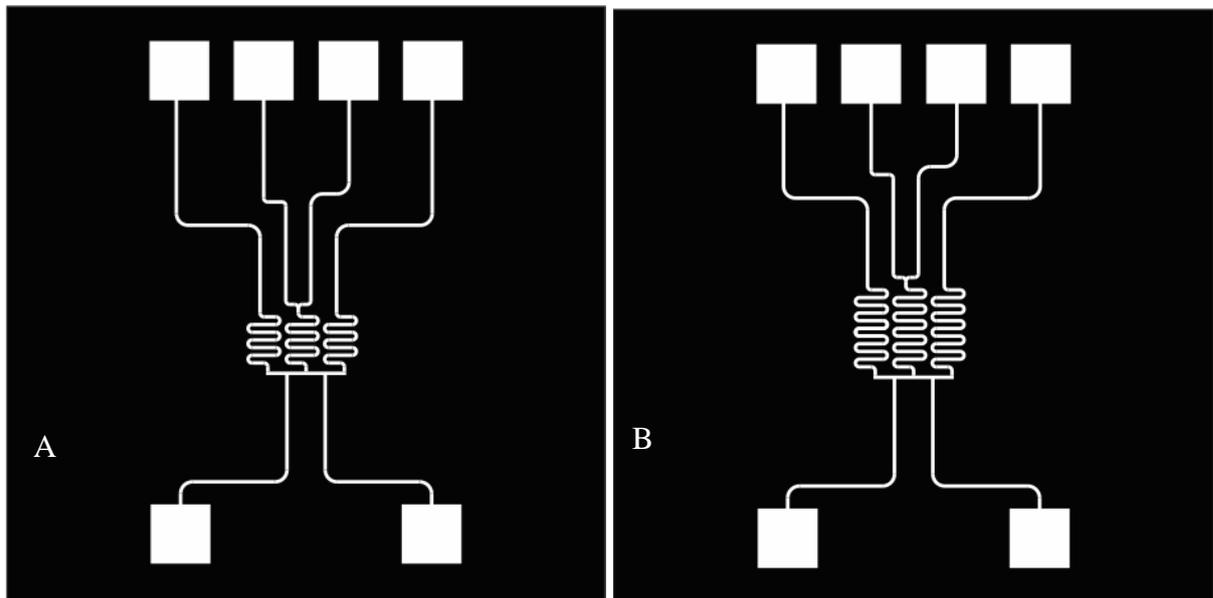
Observando a Figura 17 pode-se perceber que o comprimento de 9962 μm ainda não foi suficiente para que houvesse a mistura completa dos fluidos no microcanal. Já a Figura 18 mostra que, simulando, esse comprimento de canal já seria o suficiente.

Figura 18 - Sistema de microcanais de comprimento 16000 μm com duas entradas e três saídas com canal central bifurcado.



Fonte: Autora (2016).

Figura 19 - Microdispositivos projetados em CorelDRAW com duas entradas e três saídas, com canal central bifurcado, tendo comprimento de mistura de (A) 9962 μm e (B) 16000 μm .



Fonte: Autora (2016)

Tabela 7 - Concentrações de saída do sistema de microcanais de duas entradas e três saídas com comprimentos de contato de 9962 μm em comparação com as concentrações encontradas nos testes laboratoriais.

Simulação 9962 μm				
Dif.	Con. 100% (mol/l) [1,51 $\times 10^{-5}$]	Con. 50% (mol/l) [7,55 $\times 10^{-6}$]	Con. 50% (mol/l) [7,55 $\times 10^{-6}$]	Con. 0% (mol/l)
5,90E-03	1,49E-05	7,55E-06	7,55E-06	2,47E-07
5,90E-04	1,51E-05	7,55E-06	7,55E-06	7,91E-16
5,90E-05	1,51E-05	7,55E-06	7,55E-06	0,00E+00
5,90E-06	1,51E-05	7,79E-06	7,31E-06	0,00E+00
5,90E-07	1,51E-05	8,18E-06	6,93E-06	0,00E+00
5,90E-08	1,51E-05	8,24E-06	6,87E-06	0,00E+00
5,90E-09	1,51E-05	8,24E-06	6,86E-06	0,00E+00
5,90E-10	1,51E-05	8,24E-06	6,86E-06	0,00E+00
Teste laboratorial				
Conc.(mol/l)	1,21E-05	1,06E-05	2,05E-06	0,0
Conc. (%)	80,13%	70,20%	13,58%	0,0%
Erro	19,87%	29,63%	70,41%	0,0%

Legenda: Erro calculado utilizando a Equação (38); Fonte: Autora (2016)

Observando a Tabela 7, havendo a difusão completa e adequada, era esperada concentração igual à de entrada na coluna *Con. 100%*, ou seja, $1,51 \times 10^{-5}$ mol/L, a metade da concentração nas colunas centrais (*Con. 50%*, ou seja, $7,55 \times 10^{-6}$ mol/L) e concentração zero na coluna à direita. Observa-se que para o coeficiente de difusão encontrado na literatura, $D = 5,9 \times 10^{-7}$ cm²/s, segundo os resultados da simulação, esse comprimento de canal ainda não seria o suficiente, pois podemos observar que os valores de concentração nas saídas centrais (bifurcação) são diferentes, e deveriam ser iguais caso a mistura fosse completa, pois provêm de um mesmo canal de difusão. Ou seja, os resultados mostram que ao fim do canal central o fluido ainda não está homogêneo, tendo cada borda do canal (esquerda e direita) uma concentração diferente. Isso não ocorreria se a mistura fosse completa. Além disso, os valores obtidos com os testes laboratoriais apresentaram divergência dos valores esperados. Isso ocorreu, provavelmente, devido à existência de caminhos preferências provenientes de alguma falha no processo de microfabricação, fazendo com que o fluido não percorra os caminhos esperados necessariamente.

Tabela 8 - Concentrações de saída do sistema de microcanais de duas entradas e três saídas com comprimentos de contato de 16000 μm em comparação com as concentrações encontradas nos testes laboratoriais.

Simulação 16000 μm				
Dif.	Con. 100% (mol/l) [$1,51 \times 10^{-5}$]	Con. 50% (mol/l) [$7,55 \times 10^{-6}$]	Con. 50% (mol/l) [$7,55 \times 10^{-6}$]	Con. 0% (mol/l)
5,90E-03	1,47E-05	7,56E-06	7,56E-06	0,00E+00
5,90E-04	1,51E-05	7,56E-06	7,56E-06	0,00E+00
5,90E-05	1,51E-05	7,56E-06	7,56E-06	0,00E+00
5,90E-06	1,51E-05	7,57E-06	7,55E-06	0,00E+00
5,90E-07	1,51E-05	7,60E-06	7,52E-06	0,00E+00
5,90E-08	1,51E-05	7,61E-06	7,51E-06	0,00E+00
5,90E-09	1,51E-05	7,61E-06	7,51E-06	0,00E+00
5,90E-10	1,51E-05	7,61E-06	7,51E-06	0,00E+00
Teste laboratorial				
Conc.(mol/l)	9,92E-06	6,83E-06	0,00E+00	0,00E+00
Conc. (%)	65,70%	45,23%	0,0%	0,0%
Variação	34,30%	10,19%	100%	0,0%

Legenda: Erro calculado utilizando a Equação (38); Fonte: Autora (2016).

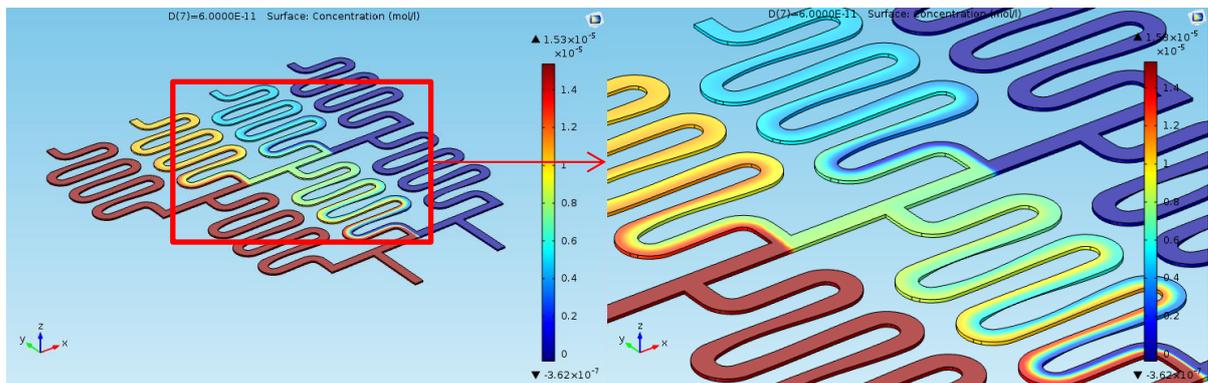
Analisando a Tabela 8, do mesmo modo que nos resultados da Tabela 7, as concentrações das colunas de *Con. 100%*, *50%* e *0%* também eram esperadas nas concentrações descritas anteriormente, para o teste com os canais de comprimento 16000 μm , havendo a difusão completa e adequada. Neste comprimento, com o coeficiente de difusão encontrado na literatura, a simulação indica que haveria a mistura praticamente completa. Porém, também foi obtida divergências em comparação com os resultados obtidos laboratorialmente, indicando não apenas a necessidade de um comprimento ainda maior para a mistura completa dos fluidos, como uma grande ocorrência de caminhos preferenciais.

Quando a análise é iniciada no laboratório insere-se água em todo o dispositivo, pelos dois canais de entrada, de modo a evitar a ocorrência de caminhos preferencias do fluido. Após o dispositivo estar completamente preenchido é inserido o fluido a ser diluído e o diluente. A partir da simulação era esperado que o fluido BSA tomasse o caminho mostrado nas Figura 17 e Figura 18, ou seja, que cada fluido completasse metade do dispositivo. Porém, os ensaios laboratoriais apresentados nas Tabela 7 e Tabela 8 indicam que o diluente está

aplicando pressão no fluido a ser diluído (corrente de fluido contendo a solução de BSA), fazendo com que esse fluido sofra diluição no canal em que deveria se manter a concentração constante (o canal mais externo em vermelho), além de não ocorrer a diluição esperada no canal central.

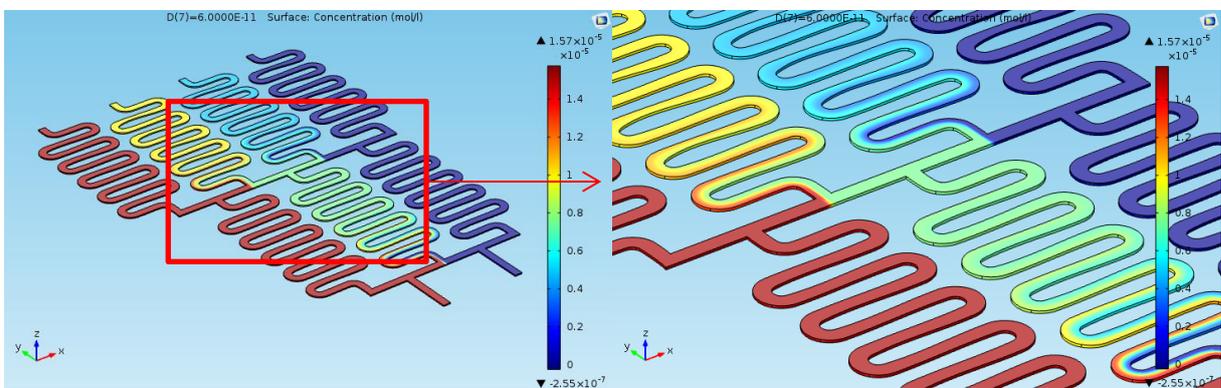
Também foram realizados testes de microdispositivos com duas entradas e quatro saídas passando por duas etapas de diluição. Do mesmo modo, esses dispositivos foram confeccionados com microcanais possuindo os comprimentos de contato de 9962 μm e 16000 μm , os quais foram utilizados para observar como o fluido se comportava dentro dos canais (Figura 20 e Figura 21).

Figura 20 - Sistema de microcanais de comprimento 9962 μm com duas entradas e quatro saídas.



Fonte: Autora (2016).

Figura 21 - Sistema de microcanais de comprimento 16000 μm com duas entradas e quatro saídas.

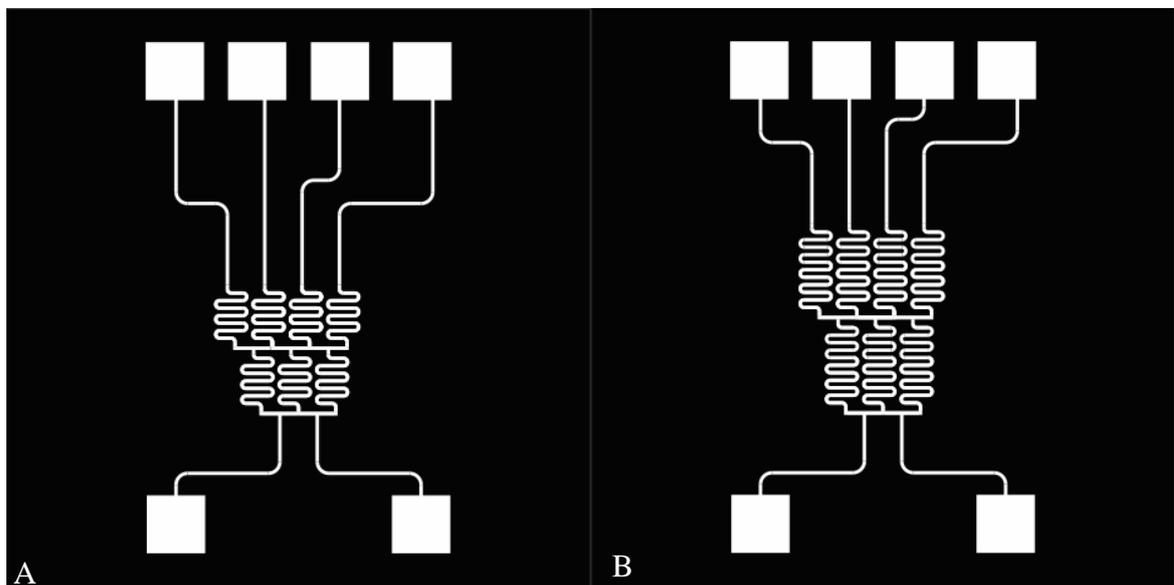


Fonte: Autora (2016).

A Figura 22 expõe os projetos refeitos em CorelDRAW para a impressão do fotolito e as Tabela 9 e Tabela 10 apresentam as concentrações obtidas nas simulações e nos ensaios laboratoriais.

Como foi observado nas Tabela 7 e Tabela 8, não há variações significativas de concentração com a variação do coeficiente de difusividade. Portanto, nas tabelas seguintes serão expostos resultados de um número reduzido de valores de coeficiente de difusividade.

Figura 22 - Microdispositivos projetados em CorelDRAW com duas entradas e quatro saídas tendo comprimento de mistura de (A) 9960 μm e (B) 16000 μm .



Fonte: Autora (2016)

Tabela 9 - Concentrações de saída do sistema de microcanais de duas entradas e quatro saídas com comprimentos de contato de 9962 μm em comparação com as concentrações encontradas nos testes laboratoriais.

Simulação 9962 μm				
Dif.	Con. 100% (mol/l) [1,51 $\times 10^{-5}$]	Con. 75% (mol/l) [1,13 $\times 10^{-5}$]	Con. 25% (mol/l) [3,78 $\times 10^{-6}$]	Con. 0% (mol/l)
5,90E-05	1,51E-05	1,01E-05	4,99E-06	2,68E-20
5,90E-06	1,51E-05	1,02E-05	4,95E-06	0,00E+00
5,90E-07	1,51E-05	1,03E-05	4,83E-06	0,00E+00
5,90E-08	1,51E-05	1,03E-005	4,82E-06	0,00E+00
5,90E-09	1,51E-05	1,03E-05	4,81E-06	0,00E+00
Teste laboratorial				
Conc.(mol/l)	1,09E-05	7,92E-06	1,67E-06	0,00E+00
Conc. (%)	72,19%	52,45%	11,06%	0,0%
Erro	27,81%	22,87%	65,46%	0,0%

Legenda: Erro calculado utilizando a Equação (38); Fonte: Autora (2016).

Tabela 10 - Concentrações de saída do sistema de microcanais de duas entradas e quatro saídas com comprimentos de contato de 16000 μm em comparação com as concentrações encontradas nos testes laboratoriais.

Simulação 16000 μm				
Dif.	Con. 100% (mol/l) [1,51 $\times 10^{-5}$]	Con. 75% (mol/l) [1,13 $\times 10^{-5}$]	Con. 25% (mol/l) [3,78 $\times 10^{-6}$]	Con. 0% (mol/l)
5,90E-05	1,51E-05	9,84E-06	4,88E-06	0,00E+00
5,90E-06	1,51E-05	9,84E-06	4,87E-06	0,00E+00
5,90E-07	1,51E-05	9,87E-06	4,84E-06	0,00E+00
5,90E-08	1,51E-05	9,87E-06	4,86E-06	0,00E+00
5,90E-09	1,51E-05	9,87E-06	4,84E-06	0,00E+00
Teste laboratorial				
Conc.(mol/l)	9,62E-06	8,92E-06	0,00E+00	00,00E+00
Conc. (%)	63,71%	59,07%	0,0%	0,0%
Erro	36,29%	9,60%	100,0%	0,0%

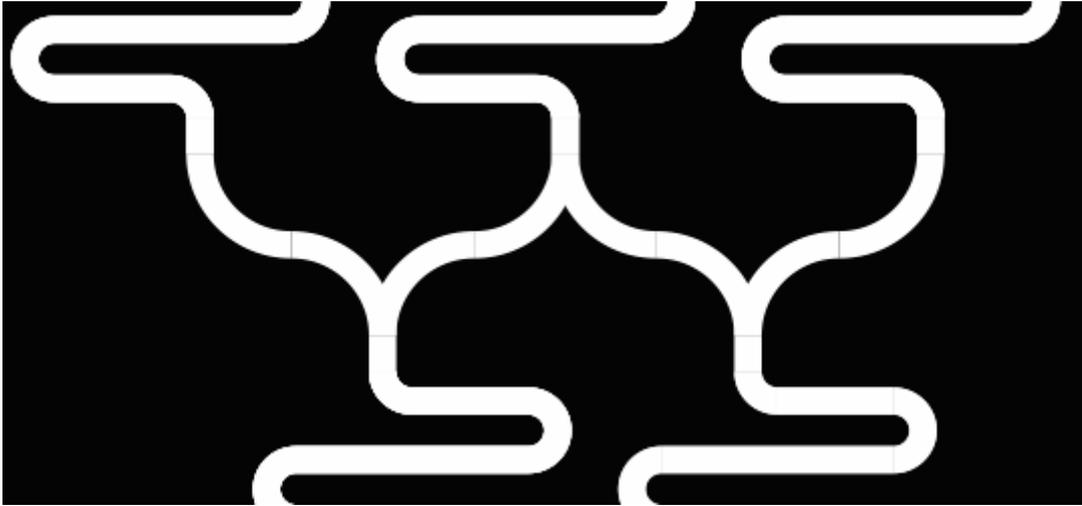
Legenda: Erro calculado utilizando a Equação (38); Fonte: Autora (2016).

Nestes dois ensaios apresentados nas Tabela 9 e Tabela 10 eram esperadas concentrações de saída de $1,51 \times 10^{-5}$ mol/L para a coluna de *Con. 100%*, ou seja, a mesma concentração de solução de BSA de entrada, $1,13 \times 10^{-5}$ mol/L para a coluna de *Con. 75%*, $3,78 \times 10^{-6}$ mol/L para a coluna de *Con. 25%* e concentração zero para a coluna de *Con. 0%*, ou seja, o diluente puro. Nos ensaios laboratoriais observamos novamente a divergência dos resultados. Assim, como nos ensaios realizados com duas entradas e três saídas, essas divergências devem ter ocorrido devido à pressão aplicada do diluente sobre o fluido a ser diluído, fazendo essa variação se propagar na segunda etapa de diluição ocasionando numa maior variação das concentrações de saída dos quatro canais. Outro fator que podem ter colaborado nessa variação são possíveis erros experimentais, seja na leitura das concentrações e/ou na dosagem dos compostos. Além das variações encontradas nos ensaios laboratoriais, as simulações também apresentaram variação entre as concentrações de saída com o coeficiente de difusão da literatura e os valores de concentrações esperados, como pode ser observado comparando o valor de concentração obtido na simulação, em negrito, e o valor de concentração esperado indicado em cada porcentagem de cada coluna. Isso indica que o comprimento de mistura ainda não é longo o suficiente para haver a mistura completa e/ou que há um problema de design do dispositivo, fazendo com que os fluidos não percorram o caminho exatamente como necessitado.

5.3. Análise III – Mudança no *Design*

De modo a tentar melhorar o sistema de diluição e evitar que os fluidos percorram caminhos preferenciais, o que leva a formação de gradiente de concentração diferente do esperado, foi modificado o *design* das etapas de diluição dos microcanais como mostrado na Figura 23. Nela pode-se observar que foi substituído o canal retangular, onde os fluidos se uniam, por junções de canais em forma de Y. Deste modo objetiva-se que os fluidos se misturem de modo mais preciso, evitando a mistura dos canais das extremidades e o possível retorno de fluidos por caminhos não desejados.

Figura 23 - Remodelagem dos *designs* da etapa de encontro dos microfluidos.



Fonte: Autora (2016).

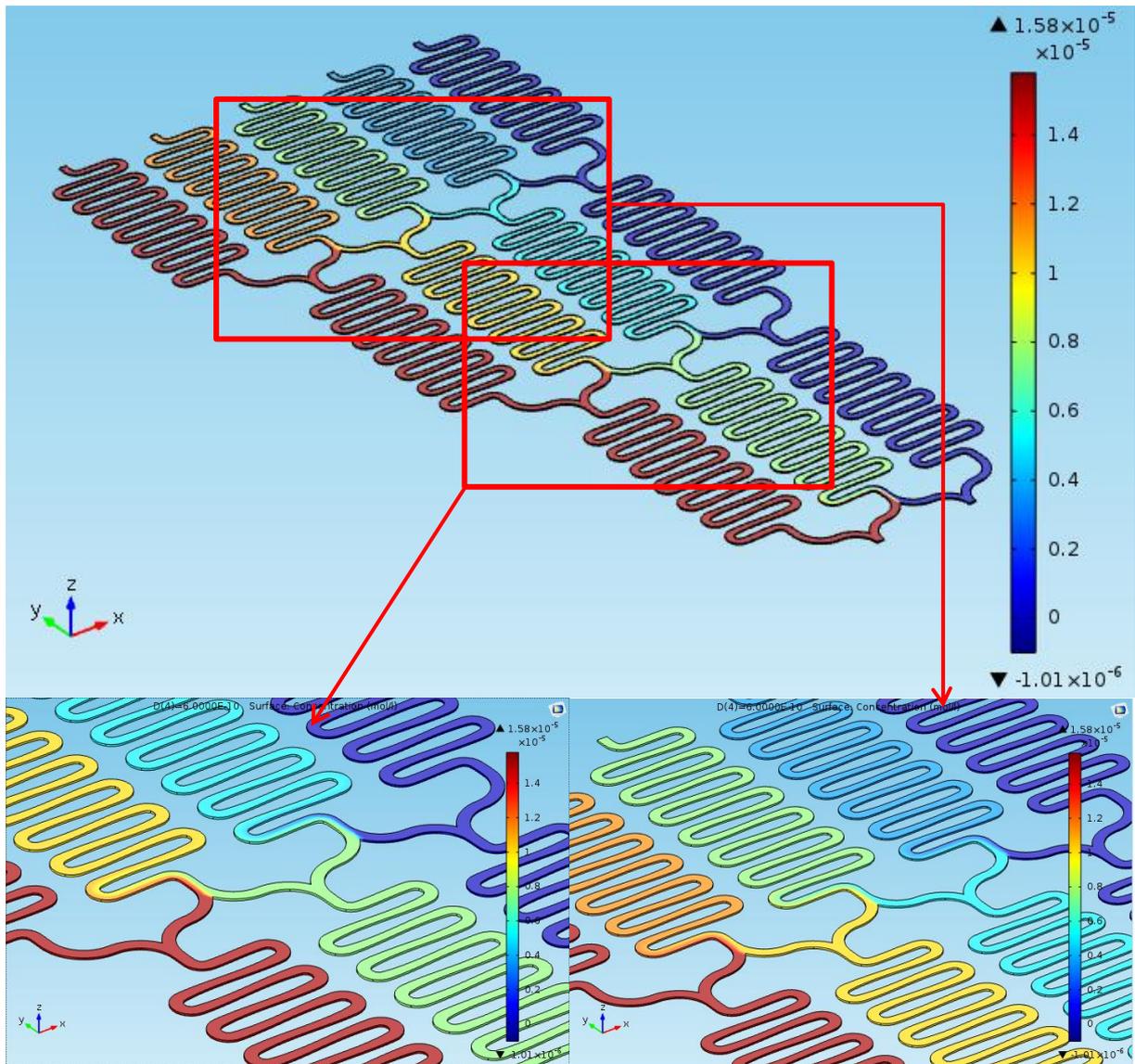
Também é notado, por meio dos testes laboratoriais e simulados dos microdispositivos das Figura 17, Figura 18, Figura 20 e Figura 21 que os canais ainda não possuem o comprimento suficiente para a mistura completa, de acordo com os resultados laboratoriais. Deste modo é utilizada a extrapolação do comprimento com o auxílio de equações obtidas a partir de Virk and Holdo (2008), Equações (20) e (21).

No caso em estudo, a relação de aspecto, β , é igual à 0,333. Considerando um valor de coeficiente de difusão de $5,9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ temos um comprimento de mistura de cerca de 22000 μm . Foi escolhido esse valor de coeficiente de difusividade devido ao valor de coeficiente da ordem de 10^{-7} apresentar um comprimento de canal dez vezes maior a esse encontrado, sendo um comprimento absurdo e/ou inviável para os testes laboratoriais devido ao espaço disponível para a construção dos microcanais.

Para se obter uma margem de segurança, extrapolou-se o valor do comprimento de canal para cerca de 25000 μm . Este comprimento é extrapolado devido, também, a molécula de teste BSA possuir um tamanho menor comparada à molécula da substância que será utilizada nas análises reais, com plasma sanguíneo. Como a molécula de plasma sanguíneo é maior, irá necessitar de mais comprimento de canal para realizar a mistura completa.

Deste modo, foi projetado um dispositivo com duas entradas e cinco saídas, o qual é mostrado na Figura 24 já com o resultado da simulação, sendo possível notar a variação da concentração ao longo do dispositivo.

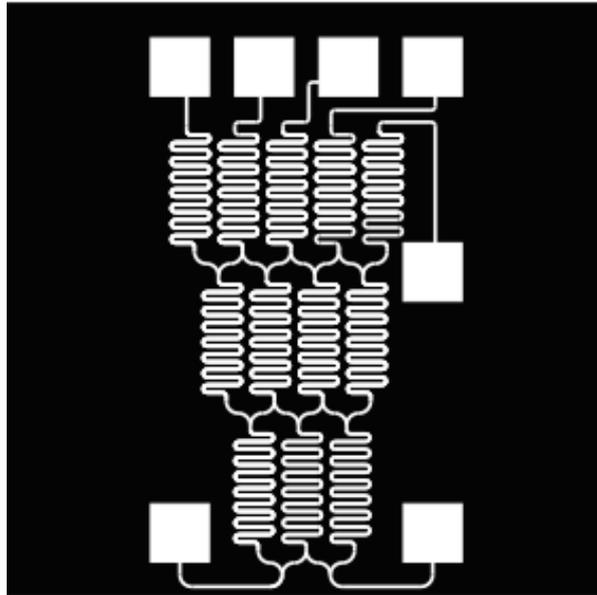
Figura 24 - Sistema de microcanais de comprimento 25000 μm com duas entradas e cinco saídas.



Fonte: A autora (2016).

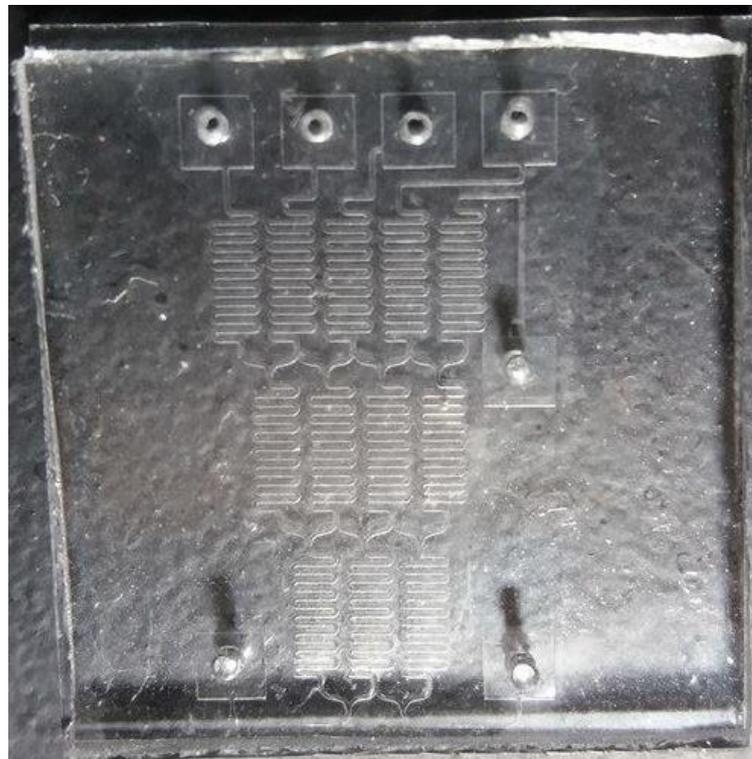
A Figura 25 mostra esse modelo redesenhado em CorelDRAW para impressão do fotolito. A Figura 26 contém a imagem fotográfica desse dispositivo já construído em PDMS.

Figura 25 – Microdispositivo projetado em CorelDRAW com comprimento de mistura de 25000 μm tendo duas entradas e cinco saídas.



Fonte: Autora (2017).

Figura 26 - Microdispositivo em PDMS com comprimento de mistura de 25000 μm tendo duas entradas e cinco saídas.



Fonte: Autora (2017).

A Tabela 11 mostra os valores de concentração de saída das simulações para alguns valores de coeficiente de difusão, comparando-os aos resultados obtidos experimentalmente.

Tabela 11 - Concentrações de saída do sistema de microcanais de duas entradas e cinco saídas com comprimentos de contato de 25000 μm em comparação com as concentrações encontradas nos testes laboratoriais.

Simulação 25000 μm					
Dif.	Con. 100% (mol/l) [1,51 $\times 10^{-5}$]	Con. 87,5% (mol/l) [1,32 $\times 10^{-5}$]	Con. 50% (mol/l) [7,55 $\times 10^{-6}$]	Con. 12,5% (mol/l) [1,89 $\times 10^{-6}$]	Con. 0% (mol/l)
5,90E-05	1,51E-05	1,14E-05	7,56E-06	3,72E-06	-3,68E-18
5,90E-06	1,51E-05	1,14E-05	7,56E-06	3,72E-06	5,49E-21
5,90E-07	1,51E-05	1,14E-05	7,56E-06	3,72E-06	3,21E-16
5,90E-08	1,51E-05	1,14E-05	7,56E-06	3,72E-06	-2,11E-13
5,90E-09	1,51E-05	1,14E-05	7,56E-06	3,72E-06	-5,88E-12
Teste laboratorial					
Conc.(mol/l)	1,50E-05	1,27E-05	1,05E-05	2,77E-06	0
Conc. (%)	99,34%	84,11%	69,54%	18,34%	0,00%
Varição	0,66%	11,65%	38,94%	25,63%	...

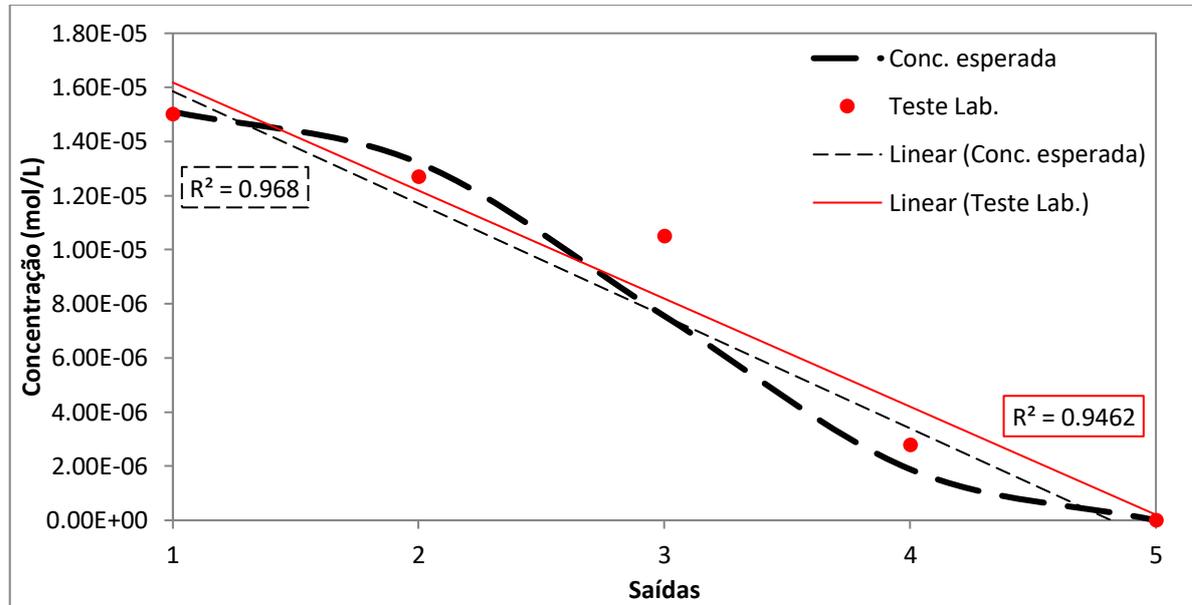
Legenda: Erro calculado utilizando a Equação (38). Fonte: Autora (2017)

Com o teste da rede de microcanais com duas entradas e cinco saídas tendo as câmaras de encontro de fluxos modificadas, observamos uma grande melhora na variação de concentração dos canais de saída. O que indica que a modificação do *design* trouxe melhorias significativas em relação ao *design* anterior, montando um gradiente de concentração mais bem definido, embora ainda apresente divergências em relação às concentrações esperadas.

A Figura 27 mostra um gráfico comparativo entre as concentrações de saída esperadas e as concentrações reais de saída obtidas no ensaio laboratorial, sendo o eixo x referente aos valores de concentração e o eixo y referente a cada saída do dispositivo. A curva tracejada grossa corresponde aos valores de concentração esperados e a reta tracejada em preto corresponde a linearização desses valores de concentração esperados, fornecendo um valor de $R^2 = 0,968$. Os pontos vermelhos correspondem aos valores obtidos no ensaio laboratorial e a reta em vermelho corresponde a linearização desses valores de concentração obtidos no ensaio fornecendo um valor de $R^2 = 0,9462$.

As regressões lineares de ambos os dados indicam uma boa aproximação entre os dados experimentais e os dados esperados.

Figura 27 - Gráfico de comparação entre concentrações de saída esperadas e reais a partir do teste laboratorial.



Fonte: Autora (2017)

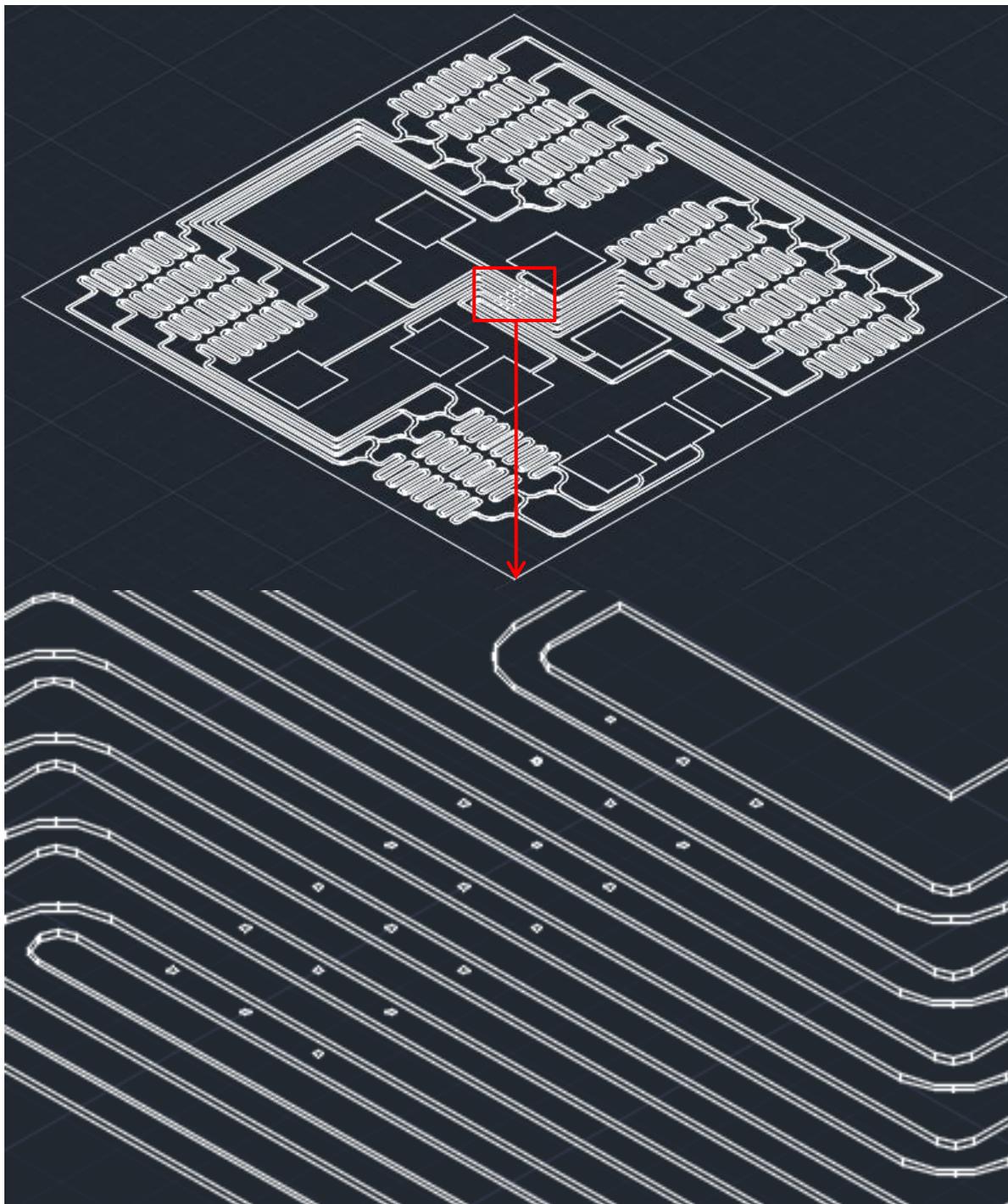
Nota-se divergências em relação à concentração esperada e a concentração obtida nas análises laboratoriais. Isso sugere que, possivelmente, esse comprimento de canal ainda não é o suficiente para ocorrer a mistura completa dos fluidos. Assim, como o fluido não se dilui completamente na primeira etapa de mistura, esse erro se propaga ao longo das etapas ocasionando uma variação nas concentrações das saídas dos canais. Além disso, ainda está ocorrendo caminhos preferenciais, como se pode observar pelo resultado de concentração da saída onde deveria haver concentração máxima da solução de BSA, porém, ainda está havendo uma pequena diluição. Isso pode estar ocorrendo devido a falhas na microfabricação do dispositivo.

Observando os resultados da Tabela 11, comparando os valores de concentração de saída obtidos na simulação, a partir do coeficiente de difusividade da literatura (em negrito), com os valores de concentração esperados (indicados juntamente com a porcentagem de concentração que deve sair de cada canal), observa-se que também há divergências. Essa variação reforça a ideia de que o comprimento do microcanal ainda não é longo o suficiente

para haver a mistura completa. Assim, se os fluidos não se misturam devidamente na primeira etapa, este erro se propaga nas etapas seguintes havendo a variação nas concentrações finais.

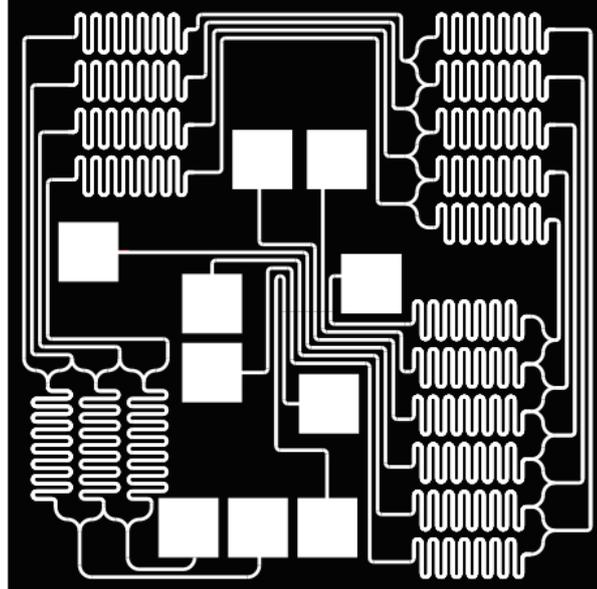
Também foi projetado um dispositivo com duas entradas e seis saídas, de forma a montar um gradiente de concentração contendo seis pontos, indo do mais diluído ao mais concentrado, para ser testado futuramente. Esse dispositivo foi projetado para ser acoplado em uma plataforma sensorial baseadas em arranjos de nanoburacos, os quais são construídos no centro do substrato, por onde passará um laser para leitura da concentração eletronicamente. Dessa forma, os microcanais são dispostos nas bordas deixando o centro para os canais de saída passar exatamente por onde o laser é emitido. A Figura 11 exemplificou esse dispositivo, a Figura 28 o mostra em modo 3D e a Figura 29 expõe esse dispositivos projetado em CorelDRAW.

Figura 28 – Microdispositivo em 3D para construção do gradiente de concentração final e leitura simultânea de amostra tendo comprimento de mistura de 25000 μm e aproximação dos nanoburacos para leitura a laser.



Fonte: Autora (2017)

Figura 29 - Microdispositivo projetado em CorelDRAW com comprimento de mistura de 25000 μm tendo duas entradas e seis saídas, entrada e saída para amostra de análise, mais espaço determinado para leitura de concentrações a laser.



Fonte: Autora (2017)

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSÕES

O estudo realizado possibilitou a conclusão de que é possível construir o dispositivo com uma rede complexa de microcanais em PDMS para obter o perfil de concentração desejado. Como as concentrações trabalhadas foram extremamente baixas, indica que há a possibilidade de leitura de amostras de marcadores de câncer em concentrações também baixas.

Foi visto que o software COMSOL *Multiphysics*[®], com o auxílio de um software CAD, é uma excelente ferramenta para a simulação de dispositivos microfluídicos, auxiliando no projeto de microdispositivos.

Para que o modelo simulado possa ser construído em PDMS com distribuição de concentração homogênea entre os canais, foi observado que a modificação das etapas de mistura para a forma em Y é muito vantajosa, possibilitando uma maior aproximação entre os resultados experimentais e teóricos. A separação dos canais em forma de Y assegura uma melhor divisão dos fluidos entre as etapas de diluição.

O dispositivo final, futuramente, terá o intuito de: realizar a diluição do composto para formação do gradiente de concentração; coleta das amostras e leitura das concentrações em espectrofotômetro; e leitura por meio do laser das concentrações que formam o gradiente de concentração simultaneamente à leitura da amostra real, de modo que haja a comparação simultânea dessa amostra ao gradiente de concentração formado, obtendo, assim, a concentração da amostra analisada.

Assim, podemos concluir que há a possibilidade da construção de biossensores portáteis para a dosagem de marcadores de câncer utilizando a rede de microdiluição.

CAPITULO VII

7. SUGESTÕES DE PROXIMOS TRABALHOS

A partir do estudo realizado, pode-se sugerir que, como sequência, haja a confecção do dispositivo com seis saídas a fim de construir o gradiente de concentração completo e bem definido, além da comparação simultânea da amostra a ser estudada. Esse dispositivo possibilitará a leitura a laser simultânea de todas as concentrações resultantes.

Outra sugestão é realização do projeto e construção de um dispositivo com canais mais longos para garantir melhor mistura dos fluidos. Além disso, projetar esse dispositivo com apenas uma saída, contendo a junção dos canais após leitura nos nanoburacos, de modo que a leitura das concentrações seja realizada apenas pelo laser, além de disponibilizar mais espaço para que caiba o comprimento dos canais necessários.

Sugere-se também a utilização de métodos de leitura em espectrofotômetro mais simples que o método utilizando a pigmentação por reagente de Bradford. É sugerido testar o sistema apenas com uma substância cuja absorção obedeça a lei de Beer, desde a condição mais concentrada até a máxima diluição, ou seja, que não precise de pigmentação para leitura em espectrofotômetro. Assim, verificar-se-ia as diluições obtidas sem a influência de um método como o de Bradford.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA ESTADO. Em cinco anos, gasto com tratamento contra câncer cresceu 66% no Brasil. **Estadão**, p. 6–9, 2016. Disponível em: <<http://www.uai.com.br/app/noticia/saude/2016/08/15/noticias-saude,189797/em-cinco-anos-gasto-com-tratamento-contracancer-cresceu-66-no-brasi.shtml>>. Acesso em 06/01/2017.

AJMERA, S. K.; DELATTRE, C.; SCHMIDT, M. A.; JENSEN, K. F. Microfabricated cross-flow chemical reactor for catalyst testing. **Sensors and Actuators B**, v. 82, p. 297–306, 2002.

ALMEIDA, J. R. C. DE; PEDROSA, N. DE L.; LEITE, J. B.; FLEMING, T. R. DO P.; CARVALHO, V. H. DE; CARDOSO, A. DE A. A. Marcadores Tumoriais: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 305–316, 2007.

ARIS, R. On the Dispersion of a Solute in a Fluid Flowing through a Tube. **The Royal Society**, v. 235, p. 67–77, 1956.

BARTON, N. G. On the method of moments for solute dispersion. **J. Fluid Mech.**, v. 126, p. 205–218, 1983.

BEEBE, D. J.; MENSING, G. A.; WALKER, G. M.. Physics and Applications of Microfluidics in Biology. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 4, p. 261–286, 2002.

BERGAMIN, H.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G.. A New Device for Improving Sensitivity and Stabilization in Flow-Injection Analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 97, p. 427–431, 1978.

BESKOK, A.; KARNIADAKIS, G. E.. A Model for Flows in Channels, Pipes, and Ducts at Micro and Nano Scales. **Microscale Thermophysical Engineering**, v. 3, n. June 2012, p. 43–77, 1999.

BIRD, R. B.; STEWART, W. E.; LIGHTFOOT, E. N. **Fenômenos de Transporte**. 2^a ed. 2014.

BRENNER, H.; EDWARDS, D. A. Macrotransport Processes. **Pergamon**. v. 20, p.

217-218, 1994.

BRODY, J. P.; KAMHOLZ, A. E.; YAGER, P. Prominent Microscopic Effects in Microfabricated Fluidic Analysis Systems. **Mech. Systems Biomed. Environ.**, v. 2978, p. 103–110, 1997.

CHEN, X.; LAM, Y. C. An Analytical Solution on Convective and Diffusive Transport of Analyte in Laminar Flow of Microfluidic Slit. 2003.

CHOI, S.; CHAE, J. Biosensors and Bioelectronics A microfluidic biosensor based on competitive protein adsorption for thyroglobulin detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 118–123, 2009.

COMSOL. **Microfluidics Module - User's Guide**. COMSOL 5.0, October, 2014a.

COMSOL. **CFD Module User's Guide**. COMSOL 5.0, October, 2014b.

COMSOL. **Microfluidics Module Introduction to the Microfluidics Module**. COMSOL 5.0, October, 2014c.

COMSOL MULTIPHYSICS. **Convection-diffusion microchannel laminar flow**. Disponível em: <<https://br.comsol.com/multiphysics/convection-diffusion-equation>>. Acesso em: 6 fev. 2016.

DERTINGER, S. K. W.; CHIU, D. T.; NOO LI JEON; WHITESIDES, G. M. Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 6, p. 1240–1246, 2001.

FEYNMAN, R. P.; LEIGHTON, R. B.; SANDS, M. **The Feynman: Lectures on Physics, Mainly Electromagnetism and Matter**. 2nd. ed.. California Institute of Technology. Addison-Wesley Publishing Company, Inc., 1964.

FLETCHER, P. D. I.; HASWELL, S. J.; POMBO-VILLAR, E.; WARRINGTON, B. H.; WATTS, P.; WONG, S. Y. F.; ZHANG, X. Micro reactors : principles and applications in organic synthesis. **Tetrahedron**, v. 58, n. 609, p. 4735–4757, 2002.

FOGLER, H. S. **Elementos de Engenharia das Reações Químicas**. 4.ed ed. Rio de Janeiro: 2009.

GOBBY, D.; ANGELI, P.; GAVRIILIDIS, A. Mixing characteristics of T-type microfluidic mixers. **J. Micromech. Microeng.**, v. 11, p. 126–132, 2001.

HATCH, A.; KAMHOLZ, A. E.; HAWKINS, K. R.; MUNSON, M. S.; SCHILLING, E. A.; WEIGL, B. H.; YAGER, P. A rapid diffusion immunoassay in a T-sensor. **Nature Publishing Group**, v. 19, n. May, p. 461–465, 2001.

HAUKE, G.; HUGHES, T. J. R. A unified approach to compressible and incompressible flows. **COMPUTER METHODS IN APPLIED MECHANICS AND ENGINEERING**, v. 113, n. 3–4, p. 389–395, 1994.

HUGHES, T. J. R.; MALLET, M. A New Finite Element Formulation for Computational Fluid Dynamics: III. The Generalized Streamline Operator for Multidimensional Advective-Diffusive Systems. **COMPUTER METHODS IN APPLIED MECHANICS AND ENGINEERING**, v. 58, n. 3, p. 305–328, 1986.

ISMAGILOV, R. F.; STROOCK, A. D.; KENIS, P. J. A.; WHITESIDES, G.; STONE, H. A. Experimental and theoretical scaling laws for transverse diffusive broadening in two-phase laminar flows in microchannels. **APPLIED PHYSICS LETTERS**, v. 76, n. 17, p. 2376–2378, 2000.

JEON, N. L.; DERTINGER, S. K. W.; CHIU, D. T.; CHOI, I. S.; STROOCK, A. D.; WHITESIDES, G. Generation of Solution and Surface Gradients using Microfluidic Systems. **Langmuir**, v. 16, n. 22, p. 8311–8316, 2000.

KAMHOLZ, A. E.; WEIGL, B. H.; FINLAYSON, B. A.; YAGER, P. Quantitative Analysis of Molecular Interaction in a Microfluidic Channel: The T-Sensor. **Analytical Chemistry, Vol. 71, No. 23. Department of Bioengineering and Department of Chemical Engineering, University of Washington**, p. 5340–5347, 1999.

KAMHOLZ, A. E.; YAGER, P. Theoretical Analysis of Molecular Diffusion in Pressure-Driven Laminar Flow in Microfluidic Channels. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 1, p. 155–160, 2001.

KENIS, P. J. A.; ISMAGILOV, R. F.; WHITESIDES, G. M. Microfabrication Inside Capillaries Using Multiphase Laminar Flow Patterning. **Science**, v. 285, n. 5424, p. 83–85, 1999.

KIRBY, B. J. Micro- and Nanoscale Fluid Mechanics: Transport in Microfluidic Devices. **Cornell University**. 1st ed, p. 82–92, 2010.

KOCH, M.; CHATELAIN, D.; EVANS, A. G. R.; BRUNNSCHWEILER, A. Two simple micromixers based on silicon. **J. Micromech. Microeng**, v. 8, p. 123–126, 1998.

KOJIMA, K.; HIRATSUKA, A.; SUZUKI, H.; YANO, K.; IKEBUKURO, K.; KARUBE, I. Electrochemical Protein Chip with Arrayed Immunosensors with Antibodies Immobilized in a Plasma-Polymerized Film. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 1116–1122, 2003.

LAUTRUP, B. Cap. 20: Creeping Flow. In: **Physics of Continuous Matter: Exotic and Everyday Phenomena in the Macroscopic World**. p. 379–392, 2004.

LIMA, R. S. **Biossensor condutométrico sem contato em microchip contendo ácido fólico como biorreceptor**. UFSCar, 2010.

LOPES, W. Constante de Boltzmann. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 32, fev. 2011.

MATSUMOTO, H.; COLGATE, J. E.. Preliminary Investigation of Micropumping Based on Electrical Control of Interfacial Tension. **Institute of Electrical and Electronics Engineers**, p. 105–110, 1990.

MCCREEDY, T. Fabrication techniques and materials commonly used for the production of microreactors and micro total analytical systems. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 6, p. 396–401, 2000.

MCDONALD, J. C.; DUFFY, D. C.; ANDERSON, J. R.; CHIU, D. T.; WU, H.; SCHUELLER, O. J. A.; WHITESIDES, G. M. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **Electrophoresis**, p. 21, 27–40, 2000.

MILOŽIČ, N.; LUBEJ, M.; NOVAK, U.; PLAZL, I. Evaluation of Diffusion Coefficient Determination using a Microfluidic Device. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly Journal**, v. 28, n. 2, p. 215–223, 2014.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Cancer Types**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types>>. Acesso em: 6 fev. 2017.

NOGUEIRA, S. A nova arma contra o câncer. **Galileu**, mar. 2009.

PARENT, C. A.; DEVREOTES, P. N. A Cell ' s Sense of Direction. **Science**, v. 765, n. 284, p. 765–770, 1999.

PINAZZA, O.; SPIGA, M.. Friction factor at low Knudsen number for the duct with sine-shaped cross-section. **International Journal of Heat and Fluid Flow**, v. 24, p. 236–241, 2003.

REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; KRONKA, E. A. M. **Análise química por injeção em escoamento contínuo.pdf**Piracicaba - SP, 1988.

RUZICKA, J.; STEWART, J. W. B.; ZAGATTO, E. A. Flow Injection Analysis Part Iv . Stream Sample Splitting and its Application the Continuous Spectrophotometric Determination Chloride in Brackish Waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 81, p. 387–396, 1976.

SAHU, P. K.; GOLIA, A.; SEN, A. K. Analytical, numerical and experimental investigations of mixing fluids in microchannel. **Microsyst Technol**, v. 18, p. 823–832, 2012.

SIA, S. K.; WHITESIDES, G. M. Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. **Electrophoresis**, v. 24, n. 21, p. 3563–3576, 2003.

SIGMA-ALDRICH.COM. Albumin from bovine serum. p. 2–5, 2000.

SOUZA, M. De. Modelos de Reatores Microestruturados para Análise Conceitual de uma Célula de Hidrogênio Associada a um Reformador de Etanol. Tese de Doutorado. **Uem - Universidade Estadual De Maringá**, 2007.

STEWART, J. W. B.; RUZICKA, J.; BERGAMIN F., H.; ZAGATTO, E. A.. Flow Injection Analysis Part Iii. Comparison of Continuous Flow Spectrophotometry and Potentiometry for the Rapid Determination of the Total Nitrogen Content in Plant Digests. **Analytica Chimica Acta**, v. 81, p. 371–386, 1976.

TAKAYAMA, S.; MCDONALD, J. C.; OSTUNI, E.; LIANG, M. N.; KENIS, P. J.; ISMAGILOV, R. F.; WHAITESIDES, G. M. Patterning cells and their environments using multiple laminar. v. 96, n. May, p. 5545–5548, 1999.

TEKER, K. Bioconjugated carbon nanotubes for targeting cancer biomarkers. **Materials Science and Engineering B**, v. 153, p. 83–87, 2008.

TERRY, S. C.; JERMAN, J. H.; ANGELL, J. B. A Gas Chromatographic Air Analyzer Fabricated on a Silicon Wafer. **IEEE TRANSACTIONS ON ELECTRON DEVICES**, v. ED-26, n. 12, p. 1880–1886, 1979.

TSUKAGOSHI, K.; JINNO, N.; NAKAJIMA, R. Development of a Micro Total Analysis System Incorporating Chemiluminescence Detection and Application to Detection of Cancer Markers. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 6, p. 1684–1688, 2005.

VIRK, M. S.; HOLDO, A. E. Numerical analysis of fluid mixing in T-Type micro mixer. **International Journal of Multiphysics**, v. 2, n. 1, p. 107–128, 2008.

WEIGL, B. H.; BARDELL, R. L.; CABRERA, C. R. Lab-on-a-chip for drug development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 349–377, 2003.

WEIGL, B. H.; YAGER, P. MICROFLUIDICS: Microfluidic diffusion-based separation and detection. **Science**, p. 283, 346–347, 1999.

YAO, S.; TANG, X.; HSIEH, C.; ALYOUSEF, Y.; VLADIMIR, M.; FEDDER, G. K.; AMON, C. H. Micro-electro-mechanical systems (MEMS)-based micro-scale direct methanol fuel cell development. **Science**, v. 31, p. 636–649, 2006.

ZHOU, Y.; WANG, Y.; MUKHERJEE, T.; LIN, Q. Generation of complex concentration profiles by partial diffusive mixing in multi-stream laminar flow. **The Royal Society of Chemistry**, v. 9, p. 1439–1448, 2009.