

Universidade Estadual Paulista – UNESP

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente

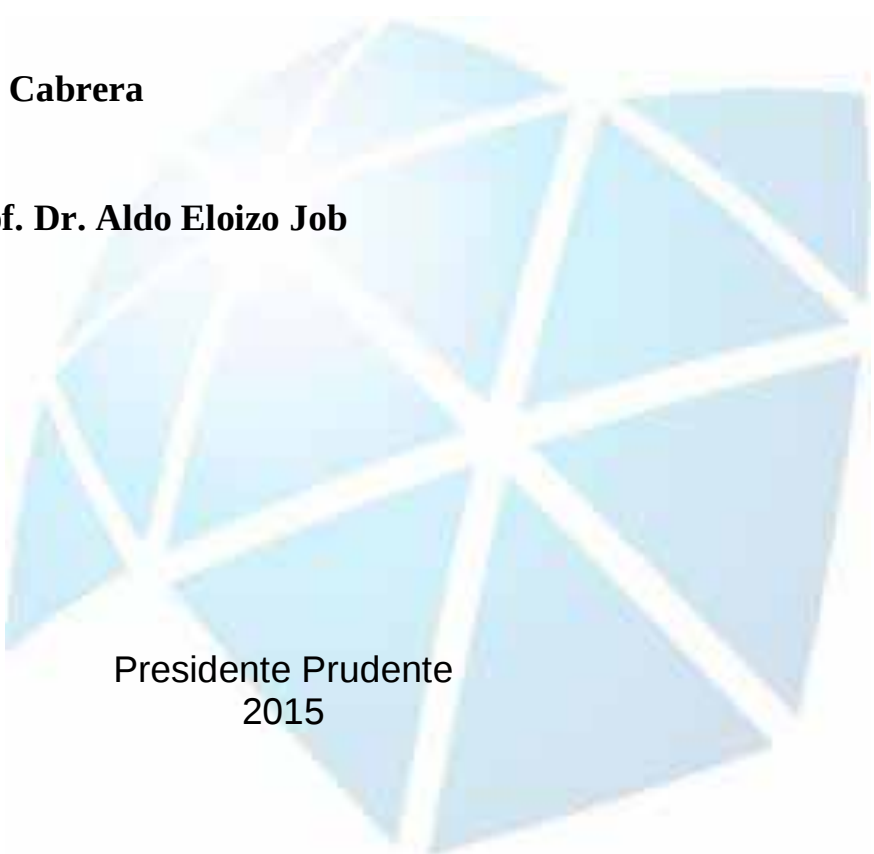
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais – POSMAT

**“DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO DE BORRACHA NATURAL
(LAB-ON-A-CHIP)”**

Flávio Camargo Cabrera

Orientador: Prof. Dr. Aldo Eloizo Job

Presidente Prudente
2015



Flávio Camargo Cabrera

**“DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO DE BORRACHA NATURAL
(LAB-ON-A-CHIP)”**

Tese apresentada como requisito à obtenção do título de Doutor à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, linha de pesquisa de Materiais Poliméricos, Híbridos e Nano-Estruturados, sob a orientação do Prof. Dr. Aldo Eloizo Job.

Presidente Prudente
2015

Termo de Aprovação

Flávio Camargo Cabrera

“DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO DE BORRACHA NATURAL (LAB-ON-A-CHIP)”

**Tese apresentada como requisito à obtenção do título de Doutor à
Universidade Estadual Paulista (UNESP) Faculdade de Ciências e
Tecnologia “Júlio de Mesquita Filho” - Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais**

Orientador: Prof. Dr. Aldo Eloizo Job
Departamento de Física, Química e Biologia, FCT-UNESP Campus de
Presidente Prudente.

Banca Avaliadora:

Prof. Dr. Deuber Lincon da Silva Agostini
Departamento de Física, Química e Biologia
FCT-UNESP, Campus de Presidente Prudente

Prof. Dr. Frank Nelson Crespilho
Instituto de Química - Universidade de São Paulo
Campus de São Carlos

Prof. Dr. Ivan Helmuth Bechtold
Departamento de Física/CFM – UFSC
Santa Catarina

Prof. Dr. Lucas Fugikawa Santos
Laboratório de Optoeletrônica Molecular Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas (IBILCE) – UNESP, Campus de São José do Rio Preto

Cabrera, Flávio Camargo.

Dispositivo microfluídico de borracha natural (Lab-on-a-chip) / Flávio Camargo Cabrera, Presidente Prudente : [s.n], 2015
92 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Eloizo Job

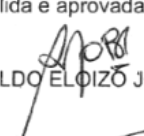
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente, 2015

1. Borracha Natural. 2. Eletrodos de Carbono. 3. Lab-on-a-chip. 4. Sensor. 5. Polímeros.

Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT) II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE FLÁVIO CAMARGO CABRERA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DO(A) FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU.

Aos 27 dias do mês de fevereiro do ano de 2015, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro 02 da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. ALDO ELOIZO JOB do(a) Departamento de Física, Química e Biologia / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Prof. Dr. DEUBER LINCON DA SILVA AGOSTINI do(a) Departamento de Física, Química e Biologia / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Prof. Dr. LUCAS FUGIKAWA SANTOS do(a) Departamento de Física / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Prof. Dr. FRANK NELSON CRESPILO do(a) Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, Prof. Dr. IVAN HELMUTH BECHTOLD do(a) Departamento de Física / Universidade Federal de Santa Catarina, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de FLÁVIO CAMARGO CABRERA, intitulado "Dispositivos microfluídico de borracha natural aplicado em sensoriamento biológico (LAB-ON-A-CHIP)". Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovado _____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. ALDO ELOIZO JOB
Prof. Dr. DEUBER LINCON DA SILVA AGOSTINI
Prof. Dr. LUCAS FUGIKAWA SANTOS
Prof. Dr. FRANK NELSON CRESPILO
Prof. Dr. IVAN HELMUTH BECHTOLD

Dedico todo o meu trabalho e afinco aos meus pais que, antes mesmo do meu nascimento, já acreditavam que eu poderia vencer, ainda que os desafios fossem maiores do que eu...

Agradecimentos

À minha família, Francisco, Ana e João Lucas, pela paciência e atenção dedicadas a mim durante os necessários cuidados de meus projetos...

Ao orientador e amigo, Prof. Dr. Aldo Eloizo Job, por todos os ensinamentos, por acreditar nas ideias que tenho, e mais do que isso, incentivar e permitir que eu as realize...

Ao Prof. Dr. Frank Crespilha, pela amizade e por todos os ensinamentos relacionados ao desenvolvimento deste projeto...

Aos amigos Deuber (Binsk), Renivaldo (Pirapó), Alexandre (Jaguar) e Pedro (Hera), que me incentivaram e ajudaram ao longo dessa trajetória científica...

Aos amigos que conquistei nesse período, Eduardo Budemberg, Dayane, Elton (Roque), Guilherme Rebecos, Marcos, Nelissa, Natália, Carol, Leandra, Geovani Columbia Pictures, entre outros, que me auxiliaram, direta ou indiretamente...

Igualmente, agradeço aos amigos que me acolheram no Instituto de Química da USP de São Carlos, , Fernandinho, Vitor, Germano, João, Andressa, Francisco (Kid), Kamila, Rodrigo (Jesus), Fernanda, Everton, Pospstar, entre outros, que também tiveram grande contribuição em relação aos resultados conquistados....

Aos parceiros da Universidade Federal de Santa Catarina, Fabricio Faixa e Prof. Dr. Ivan H. Bechtold e da UNESP de Sorocaba, Prof. Dr. Nilson Cruz, por toda colaboração científica...

A todos os professores e funcionários do Departamento de Física, Química e Biologia da FCT/UNESP, campus de Presidente Prudente.

Aos Professores da banca avaliadora, pela amizade e pela atenção na apreciação desta tese.

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. FAPESP 2011/23362-0) pelo apoio financeiro a este projeto.

Igualmente, agradecemos o incentivo recebido por parte das redes de pesquisa INEO, NanoBioNet e NanoBioMed.

*... A Deus... Por tudo e por todos,
Por eu ser quem sou, e por Ele ser quem é,
E na miséria que sou,
Ser Ele o meu Guia e Protetor...*

“Apenas se constrói conhecimento científico quando se está fora de sua zona de conforto pessoal”

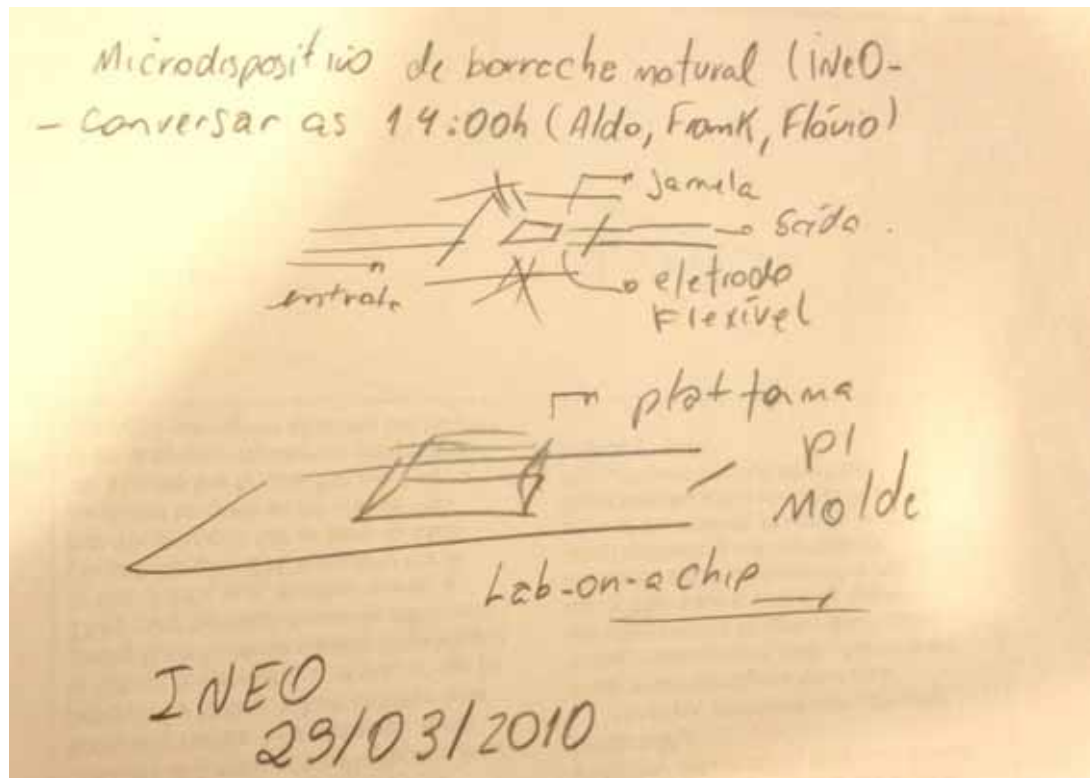
Valtencir Zucolotto

(USP - São Carlos)

“A maravilhosa disposição e harmonia do universo só pode ter tido origem segundo o plano de um Ser que tudo sabe e tudo pode. Isto fica sendo a minha última e mais elevada descoberta”.

Isaac Newton (1642-1727)

Registro da discussão científica que culminou na geração do Projeto de Pesquisa, há cerca de 4 anos, cujos resultados são apresentados como Tese de Doutorado. (Workshop INEO - 2010)



Artigos publicados durante o curso de Doutorado

1. CABRERA F. C., AOKI P. H. B., AROCA R. F., CONSTANTINO C. J. L., DOS SANTOS D. S., JOB A. E. **(2012)** Portable smart films for ultrasensitive detection and chemical analysis using SERS and SERRS. *Journal of Raman Spectroscopy*, V. 43, p. 474-477.
2. CABRERA F. C., AGOSTINI D. L. S., DOS SANTOS R. J., TEIXEIRA S. R., RODRÍGUEZ-PÉREZ M. A., JOB A. E. **(2013)** Characterization of natural rubber/gold nanoparticles SERS-active substrate. *Journal of Applied Polymer Science* (Print), V. 129, I. 1, p. 186-192.
3. CABRERA F. C., MOHAN H., DOS SANTOS R. J., AGOSTINI D. L. S., AROCA R. F., RODRÍGUEZ-PÉREZ M. A., JOB A. E. **(2013)** Green Synthesis of Gold Nanoparticles with Self-Sustained Natural Rubber Membranes. *Journal of Nanomaterials* (Print), V. 2013, Article ID 710902, p. 1-10.
4. CABRERA F. C., AGOSTINI D. L. S., SANTOS R. J., GUIMARAES F. E. G., GUERRERO A. R., AROCA R. F., JOB A. E. **(2014)** Organic acids and protein compounds causing the photoluminescence properties of natural rubber membranes and the quenching phenomena from Au nanoparticle incorporation. *Luminescence*, V. 29, I. 8, p. 1047-1052. DOI: 10.1002/bio.2657.
5. CABRERA F. C., SOUZA J. C. P., JOB A. E., CRESPILO F. N. **(2014)** Natural-rubber-based flexible microfluidic device. *RSC Advances: an international journal to further the chemical sciences*, V. 4, p. 35467-35475.

Artigos Co-Autorados

6. AOKI P. H. B., VOLPATI D., CABRERA F. C., TROMBINI V. L., RIUL JR. A., CONSTANTINO C. J. L. **(2012)** Spray layer-by-layer films based on phospholipid vesicles aiming sensing application via e-tongue system. *Materials Science & Engineering C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems* (Print), V. 32, p. 862-871.
7. SEHNEM A. L., FAITA F. L., CABRERA F. C., JOB A. E., BECHTOLD I. H. **(2013)** Inverse relaxation effect of azo-dye molecules: The role of the film anisotropy. *Chemical Physics Letters* (Print), V. 588, p. 150-154.
8. SIQUEIRA A. F., CABRERA F. C., PAGAMISSE A., JOB A. E. **(2013)** Segmentation of scanning electron microscopy images from natural rubber samples with gold nanoparticles using starlet wavelets. *Microscopy Research and Technique* (Print), V. 77, p. 71-78.
9. FAITA F. L., DOTTO M. E. R., FRANÇA L. G., CABRERA F. C., JOB A. E., BECHTOLD, I. H. **(2013)** Characterization of natural rubber membranes using scaling laws analysis. *European Polymer Journal*, V. 50, p. 249-254.
10. GARCIA N. G., REIS E. A. P., BUDEMBERG E. R., AGOSTINI D. L. S., SALMAZO L. O., CABRERA F. C., JOB A. E. **(2014)** Natural rubber/Leather waste composite foam: A new ecofriendly material and recycling approach, *Journal Applied polymer science*, V. 132, I. 11, p. 41636.
11. SIQUEIRA A. F., CABRERA F. C., PAGAMISSE A., JOB A. E. **(2014)** Estimating the concentration of gold nanoparticles incorporated on natural rubber membranes using multi-level starlet optimal segmentation, *J. Nanopart. Res.* V. 16, p. 2809.
12. SANTOS R. J., AGOSTINI D. L. S., CABRERA F. C., REIS E. A. P., RUIZ M. R., BUDEMBERG E. R., TEIXEIRA S. R., JOB A. E. **(2014)** Sugarcane bagasse ash: New filler to natural rubber composite. *Polímeros*, V. 24, 6, p. 646-653.

Artigos aceitos para publicação

13. SANTOS R. J., AGOSTINI D. L. S., CABRERA F. C., BUDEMBERG E. R., JOB A. E. **(2014)** Recycling Leather Waste: Preparing and Studying on the Microstructure, Mechanical, and Rheological Properties of Leather Waste/Rubber Composite. *Polymer Composites*, DOI: 10.1002/pc.23140
14. SANTOS R. J., CABRERA F. C., AGOSTINI D. L. S., BUDEMBERG E. R., JOB A. E. **(2014)** Upcycling leather waste, Society of Plastics Engineers, *Plastics Research Online*, DOI: 10.2417/spetro.005618.
15. Cabrera F. C., Melo A. F. A. A., Souza J. C. P., Job A. E., Crespilho F.N. **(2015)** A flexible lab-on-a-chip for the synthesis and magnetic separation of magnetite decorated with gold nanoparticles, *Lab Chip*, DOI: 10.1039/c4lc01483a.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

BN – Borracha natural

$\text{BN}_{\text{aq}}^{\text{C}}$ – Borracha natural preparada com látex centrifugado

BN_{vulc} – Borracha natural preparada com látex pré-vulcanizado

PVC – Policloreto de vinil

BN/PVC – Membrana de borracha natural recoberta com PVC

PDMS – Poli (dimetilsiloxano)

PMMA – Poli-metilmetacrilato

RRIM 600 – *Rubber Research Institute of Malasia 600*

AuNPs – Nanopartículas de ouro

T_g – Transição vítrea

Fe_3O_4 -NPs – Nanopartículas de magnetita

Fe_3O_4 -AuNPs – Nanopartículas de magnetita decoradas com nanopartículas de ouro

UV-Vis – Ultravioleta-visível

ASTM – *American Society for Testing and Materials*

HAuCl_4 – Ácido cloroáurico

$(\text{Fe}^{2+}\text{-Fe}^{3+})$ – Solução equimolar de Hexacianoferrato de Potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) e Hexacianoférrico de Potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	extração do látex de árvores do gênero <i>Hevea brasiliensis</i> clone RRM 600. O látex é estabilizado logo após a coleta, utilizando hidróxido de amônio (2% v/v). (b) Representação esquemática da estrutura molecular do látex.....	5
Figura 2:	filmes de PVC (17,6 μm de espessura) recobrindo a superfície interna dos canais e a janela de análise dos dispositivos de borracha natural. Imagens com ampliações de (a) $1.000\times$ e (b) $10.000\times$. (c) Imagens da secção transversal dos filmes de PVC depositados.....	7
Figura 3:	modelo de corpos de prova baseado nas determinações ASTM D412, modelo C de amostras, utilizado na avaliação das propriedades mecânicas das membranas de borracha natural, ensaio de tração vs. deformação.....	9
Figura 4:	ensaio de tração (tensão vs. deformação) utilizado na avaliação de membranas de borracha natural, elaboradas a partir de látex natural, centrifugado e pré-vulcanizado. Os corpos de prova são preparados para os testes seguindo as determinações ASTM D412 modelo C. Os pontos em amarelo definem o limite de deformação elástica.....	11
Figura 5:	espectroscopia de absorção no UV-Vis, razão de scan 400 nm.min^{-1} , avaliando as membranas BN, $\text{BN}_{\text{aq}}^{\text{C}}$, BN_{vulc} e PDMS, método de (a) Absorção (inset) foto comparativa demonstrando a transparência das membranas de borracha natural e PDMS, (b) Transmissão.....	14
Figura 6:	espectroscopia de absorção no UV-Vis, razão de scan 400 nm.min^{-1} , avaliando as membranas BN e BN/PVC, comparando espectros de absorção e transmissão.....	15
Figura 7:	medidas de ângulo de contato, avaliando a interação superficial das membranas de BN, $\text{BN}_{\text{aq}}^{\text{C}}$, BN_{vulc} , BN/PVC e PDMS em contato com a água.....	16
Figura 8:	tratamento por plasma de hexafluoreto de enxofre (SF_6), avaliando a superfície da membrana de borracha natural utilizando água como líquido de análise.....	17
Figura 9:	espectroscopia de absorção no UV-Vis utilizada na avaliação de solução de lixiviado de membranas de borracha natural preparadas com látex natural (BN), centrifugado ($\text{BN}_{\text{aq}}^{\text{C}}$) e pré-vulcanizado (BN_{vulc}).....	18
Figura 10:	microscopia de força atômica (AFM) utilizada na avaliação da morfologia de superfície das membranas de borracha natural (BN), equipamento Digital, modelo Nanoscope IV, modo contato.	20
Figura 11:	espectroscopia de absorção no UV-Vis avaliando (a) processos consecutivos de lixiviação e secagem das membranas de borracha	

	natural (ciclos) (b) avaliação da banda de absorção em 270 nm em função do número de ciclos de lixiviação. Cada ciclo é realizado por imersão em água MilliQ a 40 °C durante 5 horas. Após cada ciclo, a membrana é submetida a tratamento térmico para secagem (65 °C).	21
Figura 12:	espectroscopia de absorção no UV-Vis avaliando os componentes lixiviados das membranas de borracha natural (S_L -BN) e os efeitos gerados pela deposição de filme de PVC sobre a superfície da membrana (S_L -BN/PVC).	22
Figura 13:	espectroscopia FT-IR (ATR) utilizada na avaliação de solução de lixiviado de membranas de borracha natural preparadas com látex natural (S_L -BN), centrifugado (S_L -BN ^C _{aq}) e pré-vulcanizado (S_L -BN _{vulc}), após processo de liofilização.	23
Figura 14:	(a) esquema do molde acrílico com cilindros metálicos a fim de replicar os canais nas membranas de borracha natural. (b) Configuração final do dispositivo lab-on-a-chip. Os eletrodos de carbono flexíveis são inseridos entre as camadas do dispositivo, ficando em contato com a janela de análise. O dispositivo é selado utilizando o próprio látex como adesivo. (c) Apresentação dos quatro diferentes moldes empregados na preparação dos dispositivos de borracha natural. (d) Configuração dos conectores permanentes utilizando cateteres.	30
Figura 15:	procedimento utilizado para replicar a configuração do dispositivo na superfície das membranas de borracha natural. (a) Molde fixado em placas de acrílico. (b) Dispersão do látex sobre o molde, recobrando a configuração de canais e a janela de análise. (c) Tratamento térmico para a secagem do látex, realizado a 65 °C durante 10 horas. (d) Retirada da membrana de borracha natural contendo a réplica do molde do dispositivo. (e) Inserção dos eletrodos entre as camadas do dispositivo; procedimento para fechar o microdispositivo utilizando a membrana de borracha natural e o látex como adesivos.	32
Figura 16:	diferentes configurações dos microdispositivos flexíveis. Canais foram preparados em formas lineares e espirais. (I) Dispositivo preparado com canais espirais com diâmetros de cerca de 665,0 μ m que transferem o fluido de análise para um canal linear de diâmetro aproximado de 142,0 μ m, conduzindo à janela de análise de 0,2 mm. (II) Dispositivo constituído de canais lineares com diâmetro médio de 327,0 μ m e câmara de análise com espessura de 0,6 mm (III) Dispositivo constituído de canais lineares com diâmetro médio de 715,0 μ m e janela de análise de 1,0 mm de espessura (IV) Dispositivo preparado com canais espirais com diâmetros aproximados de 665,0 μ m, designados a funcionar como misturador, transferindo os fluidos de análise para um canal linear	

- de diâmetro médio de 715,0 μm . Essa configuração possui uma janela de análise de 0,7 mm de espessura. 36
- Figura 17:** avaliação microfluídica do dispositivo de configuração I (inset), utilizando vazão de entrada de 8,3 e 80,0 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (bomba seringa). Demonstra-se um fluxo contínuo, visto que o desvio dos pontos experimentais, quando comparado ao fit linear, não é considerado devido aos valores superiores dos erros associados à microbalança. O volume interno do microdispositivo é de 15,0 μL 37
- Figura 18:** avaliação microfluídica dos dispositivos utilizando vazão de entrada em 9,8 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (bomba seringa), em função da deformação angular (ângulo de fechamento) dos microdispositivos de 90°; 27,2°; 12,3° e 2,4° (inset). 38
- Figura 19:** (a) avaliação da banda de absorção da solução de hexacianoferrato de potássio (curva em vermelho) comparada ao espectro de referência medido na janela preenchida com água. (curva em preto). O setup dos experimentos de espectroscopia (inset) demonstra a luz passando através da janela de análise do dispositivo utilizando o módulo de fibra óptica acoplado (Equipamento Avantes - AvaLight-D(H)-S). (b) Absorbância de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em função do aumento na concentração injetada no dispositivo; primeira derivada da curva de cinética da solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em fluxo (inset). Injeções sucessivas nas concentrações de 0,4; 0,4; 0,8; 0,8; 1,8; 3,2 e 4,6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ foram realizadas (Jasco espectrômetro, modelo V-670). 39
- Figura 20:** (a) Imagens de microscopia óptica apresentando a flexibilidade de diferentes configurações de fibras de carbono flexível. (b-c) Avaliação do processo redox para solução de $(\text{Fe}^{2+}-\text{Fe}^{3+})$ sem fluxo (medição estática). O eletrólito suporte utilizado foi solução tampão fosfato, pH 7,0. (b) Voltametria cíclica utilizando $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$ como eletrodo de referência e fibras flexíveis de carbono como eletrodos de trabalho e contra-eletrodo. (C) Voltametria cíclica utilizando apenas fibras flexíveis de carbono como eletrodo de trabalho e contra-eletrodo em curto-circuito com o eletrodo de referência. Velocidade de Varredura de 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 40
- Figura 21:** análises por cronoamperometria do dispositivo microfluídico em função da concentração de $\text{Fe}^{2+}-\text{Fe}^{3+}$. Potencial aplicado em 0,2 V. (inset) primeira derivada da curva amperométrica, a fim de avaliar o aumento proporcional nas concentrações de $\text{Fe}^{2+}-\text{Fe}^{3+}$ em fluxo. Sucessivas injeções foram realizadas em concentrações de: 0,4; 0,4; 0,8; 0,8; 1,8; 1,8; 3,5; 6,5; 8,3 e 9,7 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. O dispositivo utilizado foi de configuração IV (inset), avaliado em vazão de 670 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ com bomba peristáltica. 41
- Figura 22:** análise da densidade de corrente em função do tempo de funcionamento do dispositivo. (I) Avaliação de diferentes

	concentrações de Fe^{2+} - Fe^{3+} , entre 0,8 e 2,4 mmol.L^{-1} (concentração inicial de 0,4 mmol.L^{-1}). (II) Avaliação da influência do fluxo sobre o comportamento do dispositivo depois de a densidade de corrente de 250 $\mu\text{A.cm}^{-2}$ ser atingida no primeiro estágio. (III) Avaliação de diferentes velocidades de fluxo de injeção: $V_1 = 670 \mu\text{L.min}^{-1}$, $V_2 = 335 \mu\text{L.min}^{-1}$, $V_3 = 167,5 \mu\text{L.min}^{-1}$. (IV) e (V) Testes de reversibilidade do sistema repetindo as análises descritas nos estágios iniciais (I) - (III).	42
Figura 23:	microscopia eletrônica de transmissão (MET) de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) com tamanhos em torno de 10,4 nm. Histograma de distribuição dos tamanhos de nanopartículas medidos com o programa ImageJ.	46
Figura 24:	metodologia utilizada para a síntese microfluídica de nanopartículas de Fe_3O_4 -AuNPs e para a avaliação da eficiência das sínteses de nanopartículas decoradas, ambas realizadas por meio de espectroscopia UV-Vis.	47
Figura 25:	(a) Espectro de absorção de solução de ácido cloroáurico (HAuCl_4), concentração de 0,51 mmol.L^{-1} (b) Cinética de crescimento de nanopartículas de ouro. De 0 a 26 minutos, o aumento da absorção é atribuído à formação de nanopartículas (curvas em preto). De 26 a 40 minutos, a redução na intensidade de absorção é atribuída à formação de agregados de nanopartículas (curvas em vermelho) (c) Ampliação da banda de absorção das nanopartículas de ouro (d) Gráfico da cinética de crescimento, aumento na absorção vs. tempo de reação.	48
Figura 26:	microscopia eletrônica de varredura (MEV) de nanopartículas de ouro (Au), com tamanhos em torno de 3,9 nm. Histograma de distribuição dos tamanhos de nanopartículas medidos com o programa ImageJ.	49
Figura 27:	apresentação dos moldes preparados em acrílico, utilizando cilindros metálicos a fim de configurar os canais empregados na preparação dos dispositivos de borracha natural.	49
Figura 28:	esquema da estrutura do dispositivo construído em três camadas de membranas de borracha natural. A primeira camada inclui canais com morfologia interna em espiral, auxiliando na mistura das amostras em fluxo. O fluxo no misturador é controlado por uma válvula passiva posicionada no final do canal. Após a mistura, o fluido atinge o reator snail, onde a reação é completa, fluindo através da segunda camada até o sistema de separação magnética interna. O ímã é posicionado, possibilitando a aproximação do reservatório de formato donut a fim de atrair as partículas em suspensão. Dois canais são construídos em contato com o reservatório, de modo que a amostra preencha, em períodos diferentes, um e outro canal, atingindo as janelas de análise.	51

Figura 29:	(a) Sistema misturador posicionado na junção entre as portas de entrada, contendo morfologia interna espiral. (b) Reator snail, fase de reação no dispositivo. (c) Sistema de separação magnética interna. O imã é posicionado, possibilitando a aproximação do reservatório de formato donut a fim de atrair as partículas em suspensão. (d-e) Dois canais são construídos em contato com o reservatório, de modo que a amostra preencha, em períodos diferentes, um e outro canal, atingindo as janelas de análise.	52
Figura 30:	avaliação microfluídica dos dispositivos utilizando vazão de entrada em $100,0 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ (bomba seringa), em função da deformação angular (ângulo de fechamento) dos microdispositivos de 90° , 47° , $19,4^\circ$ e 0° (inset).	53
Figura 31:	espectroscopia de absorção no UV-Vis do sobrenadante da suspensão de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ (decoradas), após o processo de separação magnética externa. Síntese utilizando concentrações de suspensão de nanopartículas de Fe_3O_4 entre 0 e $126,0 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. (b) Avaliação da intensidade da banda plasmônica de ouro em função da concentração de nanopartículas de magnetita. Síntese realizada com vazão de $100 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$	54
Figura 32:	microscopia eletrônica de transmissão (MET) de nanopartículas de magnetita decoradas com ouro ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$). As concentrações de magnetita são de (a-b) $63,0 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ (b-c) $84,0 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e (e-f) $126,0 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. As nanopartículas de ouro foram identificadas por pontos esféricos em preto, já as nanopartículas de magnetita (em segundo plano) foram destacadas em tons de cinza.	55
Figura 33:	histograma dos tamanhos de nanopartículas de ouro decorando nanopartículas de Fe_3O_4 . Os tamanho foram mensurados utilizando o software ImageJ, referente à Figura 21(a-b). A síntese de nanopartículas decoradas foi realizada utilizando a concentração de $63,0 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de magnetita.	56
Figura 34:	espectro ultravioleta-visível obtido a partir de sobrenadantes de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-AuNPs}$ decorados com a concentração de $63,0 \mu\text{g} \text{ mL}^{-1}$ de suspensão de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NPs}$, avaliando a síntese em diferentes fluxos: 25, 50 e $100 \mu\text{L} \text{ min}^{-1}$. A síntese foi avaliada em diferentes fluxos: 25, 50 e $100 \mu\text{L} \text{ min}^{-1}$	56
Figura 35:	a) Espectro UV-Vis obtido a partir de AuNPs sintetizadas com HAuCl_4 ($0,51 \text{ mmol}.\text{L}^{-1}$) (curva em preto); Espectro obtido a partir de sobrenadantes após seis ciclos de reinjeção das partículas decoradas no microdispositivo e posterior separação magnética. b) Dados referentes à absorbância normalizada em 510 nm por ciclo, considerando 100% de absorção para a suspensão estoque de AuNPs e comparado ao sobrenadante obtido para cada ciclo de injeção e separação magnética.....	57

Figura 36: (a) Imagem do dispositivo de borracha natural contendo o sistema de separação magnético (b) Preenchimento do dispositivo com suspensão de Fe_3O_4 -NPs em concentração de $0,42 \text{ mg.mL}^{-1}$ (c) Esquema demonstrativo do funcionamento do sistema de separação magnética interna (d) Imagem do sistema de separação magnética interna em funcionamento à uma distância de 2,5 mm (entre o ímã e o reservatório) e (e) distância de 4,5 mm (entre o ímã e o reservatório) (f) Imagem de microscopia eletrônica de varredura apresentando a morfologia do reservatório donut (g) Esquema demonstrativo da metodologia utilizada para as análises por espectroscopia UV-Vis, de modo que o feixe de luz incidente atravessasse o microdispositivo diretamente na câmara de análises, apresentada na imagem por microscopia eletrônica de varredura. (h) Medida de transmitância em 600 nm, procedimento realizado no dispositivo (in situ) preenchido com água e suspensão de Fe_3O_4 -NPs, definindo assim os limites de transmissão, medidos sem fluxo (stopping flow), bem como a avaliação do processo de separação magnética interna, que utiliza suspensão de Fe_3O_4 -NPs em vazão de 20 e $50 \mu\text{L.min}^{-1}$ 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	<i>composição base para formulação de látex pré-vulcanizado.....</i>	<i>7</i>
Tabela 2:	<i>dados obtidos de ensaios mecânicos de tração (tensão vs. deslocamento) após a avaliação das triplicatas das amostras BN, BN^C_{aq.}, BN_{vulc.}, PDMS.....</i>	<i>12</i>
Tabela 3:	<i>espectroscopia FT-IR/ATR dos componentes lixiviados, provenientes das membranas de borracha natural (BN) após o processo de liofilização.</i>	<i>24</i>
Tabela 4:	<i>dados obtidos utilizando um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado na avaliação de solução de lixiviado de membranas preparadas com látex natural, centrifugado e pré-vulcanizado. Os elementos enxofre e zinco foram avaliados apenas para os compostos lixiviados de BN_{vulc.}. Os dados descritos como “LD” são utilizados quando o elemento não está presente no lixiviado ou não atinge o limite de detecção do equipamento.</i>	<i>25</i>
Tabela 5 [apud.52]:	<i>análise química elementar de borracha natural (Clone RRIM 600).</i>	<i>25</i>
Tabela 6:	<i>parâmetros dos padrões dos moldes apresentados na Figura 14a: largura, comprimento e espessura da janela de análise, bem como diâmetros dos cilindros utilizados para replicar os canais na superfície das membranas de borracha natural.</i>	<i>31</i>

Resumo

Esta tese apresenta um novo conceito de dispositivo microfluídico flexível, utilizando a borracha natural como material alternativo, de baixo custo, flexível e elástico, para a preparação de plataformas *lab-on-a-chip*. A preparação do dispositivo é realizada com a dispersão do látex sobre o molde. Este é construído em placas de acrílico (PMMA – Poli-metilmetacrilato) contendo a configuração do dispositivo. O látex deve recobrir toda a estrutura, utilizando o método *casting*. Posteriormente, o molde contendo látex é submetido a tratamento térmico para a formação das membranas de borracha natural. As membranas retiradas do molde replicam a configuração do dispositivo em sua superfície. Filmes de policloreto de vinil (PVC) são utilizados como recobrimento interno a fim de evitar a absorção de água e a liberação de composição proteica das membranas de borracha natural. Os dispositivos flexíveis de borracha natural foram implementados como sensores óptico e eletroquímicos, utilizando fibras de carbono flexíveis como eletrodos internos. Torna-se importante ressaltar que as membranas de borracha natural são transparentes (quando considerada a região visível do espectro eletromagnético), bem como biocompatíveis, possibilitando a combinação de propriedades mecânicas, ópticas e biológicas num único dispositivo. Por meio das análises eletroquímicas, demonstrou-se que os dispositivos possuem boa estabilidade e resistência quando submetidos a testes prolongados, mantendo a característica da curva de potencial, bem como o curto intervalo de tempo necessário para atingir a corrente estacionária durante os processos eletroquímicos. Em segunda instância, utilizaram-se os microdispositivos de borracha natural como microreatores para a síntese de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) decoradas com nanopartículas de ouro (Fe_3O_4 -AuNPs). A síntese de partículas decoradas (Fe_3O_4 -AuNPs) mostrou-se efetiva, obtendo relativo grau de homogeneidade na distribuição das nanopartículas de ouro na superfície das partículas de magnetita com tamanhos médios de 6,3 nm.

Palavras-Chave: *Lab-on-a-chip; Dispositivo Microfluídico; Borracha Natural; Fibras Flexíveis de Carbono.*

Abstract

This thesis reports a new concept of flexible microfluidic device, using natural rubber as alternative material, flexible and stretchable, for based-platforms of lab-on-a-chip devices. The device preparation is carried out dropping the latex over the mold, supported on acrylic dishes, containing the configuration of the device. The latex should cover the entire structure by casting method and, subsequently subjecting it to thermal treatment to form the natural rubber membranes. The membranes demolded should replicate the configuration of the device on its surface. Poly(vinyl chloride) (PVC) films are implemented as covering layer on internal surface, avoiding the water absorption and protein compounds leaching from natural rubber membranes. The flexible devices of natural rubber were implemented as optical and electrochemical sensors, using flexible carbon fibers as electrodes internal electrodes. Become important emphasize, that the natural rubber membranes are transparent when considering the visible region in the electromagnetic spectrum as well as it is biocompatible, allowing the combination of mechanical, optical and biological properties in a single device. Rely on electrochemical analysis devices demonstrate good stability and resistance for long term stability tests maintaining the characteristic curve of potential as well as a short interval of time necessary to reach the stationary current for each electrochemical process. In a second instance, we used the natural rubber-based microfluidic as microreactor for the synthesis of magnetite nanoparticles (Fe_3O_4) decorated with gold nanoparticles (Fe_3O_4 -AuNPs). The synthesis of decorated nanoparticles (Fe_3O_4 -AuNPs) shows effectiveness in order to obtain high degree of homogeneity on gold nanoparticles distribution over the surface of magnetite particles, reaching averages sizes of 6.3 nm.

Keywords: *Lab-on-a-chip; Microfluidic device; Natural rubber; Flexible Carbon Fibers.*

Sumário

Apresentação	1
CAPÍTULO 1 - Avaliação das propriedades das membranas de borracha natural aplicadas como plataforma na construção de microdispositivos	3
Introdução.....	3
1.1 - Materiais e Métodos	5
1.1.1 - Obtenção do Látex Natural	5
1.1.2 - Látex Centrifugado.....	6
1.1.3 - Látex Pré-Vulcanizado	6
1.1.4 - Policloreto de Vinil (PVC).....	7
1.1.5 - Poli (dimetilsiloxano) (PDMS)	8
1.1.6 - Processo de lixiviação de borracha natural em água	8
1.1.7 - Liofilização	8
1.2 - Técnicas de Caracterização.....	8
1.2.1 - Espectroscopia de absorção no UV-Vis.....	8
1.2.2 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	9
1.2.3 - Ensaio mecânico: modo tensão vs. deformação	9
1.2.4 - Espectrômetro de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) no modo ATR.....	9
1.2.5 - Espectroscopia de Massa Atômica (ICP).....	10
1.2.6 - Microscopia de Força Atômica (AFM).....	10
1.2.7 - Ângulo de contato.....	10
1.3 - Resultados e Discussão	10
1.3.1 - Avaliação das propriedades das membranas de borracha natural utilizadas como plataforma para a construção dos sensores	10
1.3.2 - Avaliação dos compostos lixiviados pelas membranas de borracha natural em solução aquosa	17
CAPÍTULO 2 - Construção do dispositivo microfluídico.....	28
Introdução	28
2.1 - Materiais e Métodos	30
2.1.1 - Preparação do Dispositivo	30
2.1.2 - Tratamento dos eletrodos flexíveis de carbono	33

2.1.3 - Solução equimolar de Hexacianoferrato de Potássio (K ₃ [Fe(CN) ₆]) e Hexacianoférrico de Potássio (K ₄ [Fe(CN) ₆]) (Fe ²⁺ -Fe ³⁺)	34
2.1.4 - Solução de Hexacianoferrato de Potássio (K ₃ [Fe(CN) ₆]).....	34
2.2 - Técnicas de caracterização	34
2.2.1 - Espectroscopia de absorção no UV-Vis.....	34
2.2.2 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	34
2.2.3 - Microfluídica.....	34
2.2.4 - Microscopia Óptica.....	34
2.2.5 - Análise Eletroquímica	35
2.3 - Resultados e Discussão	35
2.3.1 - Avaliação estrutural do dispositivo	35
2.3.2 - Avaliação microfluídica do dispositivo	36
2.3.3 - Avaliação das propriedades ópticas do dispositivo	38
2.3.4 - Aplicação do microdispositivo em estudos eletroquímicos	39
CAPÍTULO 3 - Aplicação do microdispositivo flexível na síntese de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ -Au.....	44
Introdução.....	44
3.1 - Materiais e Métodos	45
3.1.1 - Reagentes	45
3.1.2 - Técnicas de caracterização.....	45
3.2 - Resultados e Discussão	45
3.2.1 - Síntese de nanopartículas de Fe ₃ O ₄	45
3.2.2 - Síntese de nanopartículas de ouro	47
3.2.3 - Construção do dispositivo.....	49
3.2.4 - Avaliação microfluídica do dispositivo	52
3.2.5 - Síntese de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ decoradas com ouro (Au).....	53
3.2.6 - Avaliação do sistema de separação magnética interna	57
Conclusão	61
Perspectivas	62
Referências	63

Apresentação

No primeiro capítulo da tese, apresenta-se a caracterização das principais propriedades ópticas, mecânicas e estruturais, requisito para a implementação de borracha natural na preparação de plataformas para a construção de dispositivos microfluídicos. Propõe-se o uso da borracha natural (BN) como um polímero alternativo, de baixo custo, flexível e elástico, possibilitando *e.g.* maiores níveis de deformação mecânica (estiramento) do que quando comparado ao poli(dimetilsiloxano) (PDMS), bem como sendo ecologicamente correto (não proporciona a geração de resíduos).

Os testes avaliam as propriedades das membranas de borracha natural, preparadas a partir de látex estabilizado em 2% de hidróxido de amônio, látex centrifugado (utilizando água como solvente) e látex pré-vulcanizado, comparando-as a membranas de poli (dimetilsiloxano) (PDMS) comumente utilizadas como plataforma para a preparação de microdispositivos. Além disso, filmes de policloreto de vinil (PVC) são propostos como alternativa para o recobrimento da superfície interna dos microdispositivos de borracha natural. O recobrimento interno de PVC mostrou-se efetivo, evitando o processo de absorção de água e a liberação da composição proteica das membranas de borracha natural, sem interferir nas propriedades ópticas dos microdispositivos.

A caracterização das membranas de borracha natural tornou-se indispensável após a construção dos sensores ópticos e eletroquímicos bem como do microreator para síntese de nanopartículas decoradas, apresentados nos capítulos posteriores. Além disso, opta-se por utilizar o látex sem beneficiamento (processo de centrifugação ou vulcanização) visando simplificar o preparo dos microdispositivos.

No segundo capítulo, apresenta-se a metodologia empregada na construção dos dispositivos microfluídicos de borracha natural (*lab-on-a-chip*), atingindo o principal objetivo desta tese, *i.e.* introduzir o conceito de dispositivo microfluídico flexível, utilizando a borracha natural como material alternativo, de baixo custo, biocompatível, flexível e elástico, para a preparação de plataformas *lab-on-a-chip*. Além disso, apresenta-se os testes dos dispositivos como sensores ópticos e eletroquímicos. Utilizou-se fibras flexíveis de carbono, inseridas na janela óptica como eletrodos para as medidas eletroquímicas. Torna-se relevante ressaltar que tanto a borracha natural quanto as fibras de carbono são flexíveis. Este fato corrobora atingir as fronteiras de conhecimento, em especial a construção de microdispositivos implantáveis.

A espectroscopia UV-Vis é utilizada para avaliar a cinética de crescimento em fluxo (aumento na concentração) de solução equimolar de hexacianoferrato de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) e hexacianoférrico de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$), por método de transmitância aplicado diretamente na janela (câmara) de análise do dispositivo. A banda observada em 420 nm, associada à transferência de carga metal-ligante, é avaliada durante o estudo de cinética, de modo que a cada variação na concentração, observa-se um desvio na linha de base, atingindo intensidades relativas de absorbância iguais para alterações de concentração análogas.

A avaliação da cinética de crescimento (aumento na concentração) de Fe^{2+} - Fe^{3+} também foi avaliada por meio de técnicas eletroquímicas. Para cada injeção (aumento na concentração), os eletrodos respondem com um aumento na densidade de corrente gerada por reações redox do eletrólito na superfície dos eletrodos. Os dispositivos apresentam boa estabilidade e resistência quando submetidos a testes exaustivos, mantendo a característica da curva de potencial, bem como o curto intervalo de tempo necessário para atingir a corrente estacionária durante os processos eletroquímicos. Esses resultados demonstram a implementação eficiente da matriz polimérica de borracha natural como dispositivo *lab-on-a-chip*, baseado em medidas ópticas e eletroquímicas.

No terceiro capítulo, utilizamos o microdispositivo de borracha natural como microreator na síntese de nanopartículas de magnetita decoradas com ouro (Fe_3O_4 -AuNPs). A principal contribuição do microreator é a possibilidade de sintetizar *fresh nanoparticles*, para uso imediato, e com considerável homogeneidade de tamanhos. Para tanto, a estrutura dos dispositivos foi melhor elaborada, possibilitando o fluxo em três dimensões sem alterar as dimensões originais. Além disso, introduziu-se um sistema de separação interna, que empregou ímãs em escalas milimétricas, inseridos nos microdispositivos. As partículas de magnetita sintetizadas têm tamanhos médios em torno de 10,0 nm e foram decoradas com nanopartículas de ouro de tamanhos médios em torno de 6,0 nm. É importante ressaltar que a síntese relatada foi realizada sem o uso de surfactantes ou solventes orgânicos, o que enquadra a rota como química verde, mantendo o apelo ambiental dos dispositivos de borracha natural.

CAPÍTULO 1 - Avaliação das propriedades das membranas de borracha natural aplicadas como plataforma na construção de microdispositivos

Introdução

Materiais poliméricos têm se tornado matéria-prima, tanto para inovações na produção de tecnologia, quanto nos avanços da ciência fundamental. Denomina-se “*polímero*” o material proveniente da união de determinado número de unidades de repetição, formando uma macromolécula, em geral, de elevado peso molecular e extensa cadeia carbônica.

Os polímeros são ainda classificados como plásticos, borrachas e fibras em função dos tipos de monômero, das ligações formadas e do número médio de monômeros na cadeia polimérica [1]. O termo “*elastômero*” é comumente utilizado para definir polímeros como borrachas, *i.e.* materiais que podem ser deformados repetidamente, atingindo pelo menos o dobro do seu comprimento original sem sofrer alterações estruturais permanentes [1].

Dentre os inúmeros elastômeros existentes, categorizados entre sintéticos e naturais, destaca-se a borracha natural, polímero de elevado grau de elasticidade e flexibilidade e de baixo custo, proveniente do látex extraído principalmente de árvores do gênero *Hevea brasiliensis*. As propriedades mecânicas exibidas pela borracha natural são essencialmente atribuídas às rotações das ligações simples C-C, que permitem diferentes conformações das cadeias e definem a temperatura de transição vítrea (T_g) delimitada abaixo da temperatura ambiente [2,3,4].

Além das propriedades anteriormente citadas, a borracha natural é factível à implementação de metodologias de vulcanização ou incorporação de cargas, que aumenta tanto a resistência química/ambiental, quanto a resistência mecânica (resistência a desgaste, estiramento, etc.), amplamente estudada ao longo dos anos [5,6].

Ainda em relação às propriedades físicas, destacam-se estudos relacionados à biocompatibilidade [7] e indução de angiogênese (formação de vasos sanguíneos) [8,9], atribuídas às membranas de borracha natural. No entanto, ao longo dos anos, um aumento considerável no número de casos de reações alérgicas relacionadas ao contato com produtos de borracha natural tem incentivado pesquisadores a avaliarem a composição do látex, atribuindo principalmente aos constituintes proteicos a responsabilidade por tais reações adversas [10,11]. Metodologias como a centrifugação

ou o tratamento enzimático [12] são reportadas como alternativa para reduzir a quantidade de proteínas do látex e consequentemente evitar as respostas alérgicas.

Atualmente, a borracha natural tem se tornado de grande interesse no desenvolvimento de inovações tecnológicas, como a geração de nanocompósitos aplicados como barreira de gases [13], como atuadores mecânicos (respondendo a estímulos elétricos ou térmicos, comparados a músculos artificiais) [14], bem como a fabricação de materiais denominados “*shape memory*”, que respondem a estímulos como temperatura [15] ou gases presentes no ambiente [16,17], mudando de forma e podendo reassumir a forma original assim que cessado o estímulo externo. Além disso, compósitos poliméricos contendo sais de fosfônio quaternário [18] e nanopartículas de prata [19] têm sido implementados como materiais bactericidas.

A obtenção da borracha natural requer processos de extração do conteúdo líquido (não-borracha), contido na composição do látex, utilizando principalmente agentes coagulantes e/ou tratamento térmico. O látex é definido como uma dispersão coloidal polifásica, constituído de partículas de borracha (monômeros cis-1,4-isopreno), proteínas, fosfolipídios, lutóides (ácidos orgânicos, sais minerais, proteínas, açúcares, entre outros) [20] e partículas Frey-Wyssling (organelas contendo lipídios e carotenóides) [21] dispersos em um meio aquoso [22].

A composição do látex pode ser avaliada em três fases distintas, denominadas: borracha, soro e fração de fundo. A fase borracha é formada, sobretudo, de 96% de hidrocarbonetos, 1% de proteína e 3% de lipídios, podendo conter alguns traços de magnésio, potássio e cobre [23]. A fase soro é constituída de 1,0 a 1,8% de proteínas; 1,0 a 1,2% de carboidratos; 0,4 a 1,1% de lipídios neutros; 0,4 a 0,5% de lipídios polarizados; 0,4 a 0,6% de inorgânicos; 0,4% de aminoácidos, aminas dentre outros; além de 50 a 60% de água [24,25,26]. Por fim, a fração de fundo contém os lutóides, bem como os compostos associados principalmente à planta e aos insumos do solo, que possuem monômeros ligados a íons metálicos.

Neste capítulo, apresentamos os resultados da caracterização das membranas de borracha natural preparadas a partir do látex estabilizado com hidróxido de amônio (BN), látex centrifugado (BN^C_{aq.}) e látex pré-vulcanizado (BN_{vulc}), comparando-os com as propriedades do PDMS, polímero comumente utilizado na preparação de microdispositivos. A técnica de espectroscopia de absorção no UV-Vis foi utilizada a fim de avaliar as propriedades ópticas das membranas de borracha natural, bem como a

caracterização dos componentes lixiviados em água, complementando a caracterização com o uso das espectroscopias FT-IR/ATR e espectroscopia de massa atômica.

1.1 - Materiais e Métodos

1.1.1 - Obtenção do Látex Natural

O látex é obtido de espécies pertencentes, sobretudo, à família das *Euforbiáceas*, principalmente árvores do gênero *Hevea brasiliensis* que apresentam maior grau de produtividade [27,28]. Outras espécies como a mamona (*Ricinus communis* L.) e a mandioca (*Manihot*) podem apresentar a produção de seiva, porém em menor escala. Há ainda outras famílias que contêm espécies produtoras de borracha, como as *moráceas* (*borracha-de-assam*), *apocináceas* (*borracha-de-seda*) e as espécies *Dente-de-leão* [29].

A coleta do látex, utilizado como matéria-prima para preparação das membranas de borracha natural, foi realizada em diferentes árvores do gênero *Hevea brasiliensis* (clone RRIM 600 - *Rubber Research Institute of Malaysia 600*) na Fazenda Indiana, na região de Presidente Prudente, conforme apresentado na Figura 1a.

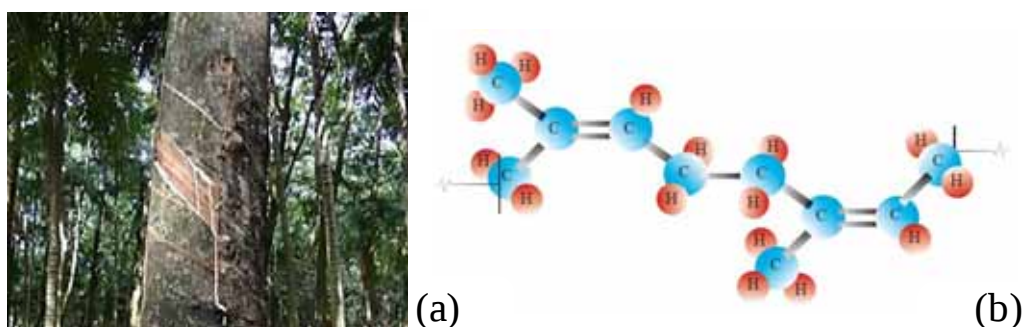


Figura 1: extração do látex de árvores do gênero *Hevea brasiliensis* clone RRIM 600. O látex é estabilizado logo após a coleta, utilizando hidróxido de amônio (2% v/v). (b) Representação esquemática da estrutura molecular do látex.

O látex é essencialmente composto pelo monômero cis-1,4-isopreno (Figura 1b). A fim de evitar a coagulação espontânea do látex, utilizaram-se procedimentos de estabilização em 2% (v/v) de hidróxido de amônio [30].

O processo de estabilização do látex, realizado com hidróxido de amônio, pode ser explicado baseando-se no modelo atual proposto para a estrutura de partículas de borracha contidas no látex. O princípio desse modelo é que as partículas de látex apresentam estrutura *core-shell*, consistindo em moléculas de isopreno em um núcleo central, envolvido por proteínas e fosfolipídios ligados aos grupos terminais da cadeia

do isopreno [31]. Esses grupos funcionais podem ser estabilizados por interação de cargas quando inserida a composição de hidróxido de amônio no látex. Além disso, sabe-se que a proporção de hidróxido de amônio utilizada desfavorece a proliferação de micro-organismos que poderiam conduzir à coagulação do látex [25].

As membranas de borracha natural foram preparadas utilizando o método de “*casting*” do látex estabilizado em hidróxido de amônio, e o tratamento térmico à temperatura de 65 °C durante 15 horas. O tempo de secagem é definido como o mínimo necessário para a secagem completa do látex. A temperatura de secagem foi delimitada com base nos estudos desenvolvidos por Ferreira e colaboradores, que descreve a atividade angiogênica amplificada para membranas tratadas termicamente em temperaturas entre 65 °C e 85 °C [8]. A definição da temperatura em 65 °C possibilita a consideração dos resultados aqui explanados como base comparativa para perspectivas de estudos com ênfase em biomedicina, além de garantir o maior grau de transparência dos microdispositivos.

1.1.2 - Látex Centrifugado

Após a coleta e estabilização em hidróxido de amônio, o látex foi centrifugado a fim de reduzir a quantidade de proteínas (compostos não-borracha) em sua composição. A fase borracha é obtida por centrifugação em um equipamento da marca Cientec-CT 5000R, numa rotação de 6000 rpm, à temperatura de 4 °C durante 90 minutos. A fase borracha é então separada e dispersada em água Milli-Q em concentração de 400,0 mg.mL⁻¹. As membranas de BN_{aq}^C foram preparadas por tratamento térmico da fração borracha dissolvida em água, à temperatura de 55 °C durante 10 horas, conforme metodologia previamente publicada por nossos colaboradores [32]. As amostras foram concedidas pelo Prof. Dr. Fabricio L. Fanta, durante o curso de doutorado desenvolvido na Universidade Federal de Santa Catarina.

1.1.3 - Látex Pré-Vulcanizado

O látex pré-vulcanizado foi adquirido na empresa Du Latex Ltda., em São Paulo. A composição da formulação utilizada na vulcanização do látex é apresentada na Tabela 1, sendo 1,0 phr da base de vulcanização descrita (10,0 g) para 100,0 phr (1000,0 g) de látex (peso em líquido) bi-centrifugado contendo 60% de composto sólido. As membranas de borracha natural vulcanizada foram preparadas utilizando o método de *casting* do látex, e o tratamento térmico à temperatura de 65 °C, durante 5 horas.

Tabela 1: composição base para formulação de látex pré-vulcanizado

<i>Formulação</i>	<i>Partes</i>
<i>ZEDC (Acelerador)</i>	1,0
<i>Enxofre (Agente de Reticulação)</i>	1,0
<i>Óxido de Zinco (Ativador)</i>	1,0
<i>Anchoid (Auxiliar de Processo/Plastificante)</i>	0,2
<i>Água</i>	2,8
Total	6

1.1.4 - Policloreto de Vinil (PVC)

O policloreto de vinil foi adquirido como adesivo comercial em forma líquida, transparente, baseado em resina de PVC, utilizando ésteres e cetonas como solventes. Os filmes de PVC foram depositados manualmente (*casting*) na superfície interna dos canais e da janela de análise do dispositivo de borracha natural (Figura 2). O procedimento de recobrimento superficial com polímeros é por vezes utilizado na literatura para aumentar a hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade da superfície de dispositivos de acordo com a aplicação definida.

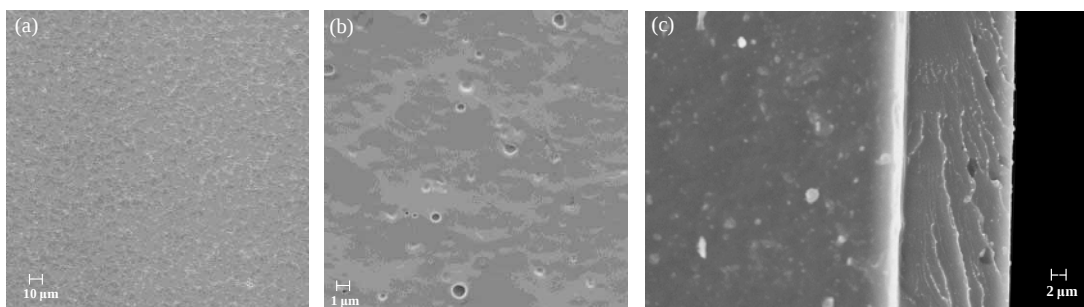


Figura 2: filmes de PVC (17,6 μm de espessura) recobrindo a superfície interna dos canais e a janela de análise dos dispositivos de borracha natural. Imagens com ampliações de (a) 1.000 $\times$ e (b) 10.000 $\times$. (c) Imagens da secção transversal dos filmes de PVC depositados.

Um importante ponto a ser considerado é que a superfície das membranas de borracha natural é passível de modificação, ampliando assim as possibilidades de aplicação dos microdispositivos. Os filmes de PVC depositados apresentam espessura em torno de 17,6 μm , recobrindo toda a superfície do polímero (Figura 2c), o que amplifica o caráter hidrofóbico da superfície interna do dispositivo. Os filmes não interferem no grau de transparência das membranas, demonstrando boa aderência à superfície da borracha natural.

1.1.5 - Poli (dimetilsiloxano) (PDMS)

As membranas de PDMS foram preparadas com elastômero de silicone Sylgard 184, adquirido na empresa Dow Corning - USA por meio da empresa Silimoldes Ltda., que revende o material no Brasil. A proporção de dez partes da base pré-polímero para uma parte do agente de cura foi utilizada na preparação das membranas de PDMS, tratadas termicamente a 65 °C, durante 3 horas, a fim de acelerar o processo de cura do polímero.

1.1.6 - Processo de lixiviação de borracha natural em água

A fim de avaliar os componentes das membranas de borracha natural que são liberados em solução, cerca de 790,0 mg de borracha natural foram preparados a partir de diferentes látex, sendo imersos em 100 mL de solução aquosa, à temperatura de 40 °C, por um período de 5 horas. Essa temperatura foi definida em função da temperatura máxima que o sistema imunológico humano pode suportar sem risco potencial, mais comum em um estado febril. Essa avaliação é importante baseando-se no fato de que os sensores podem, no futuro, configurar um implante. A caracterização dos componentes liberados em solução, provenientes das membranas de borracha natural, foi realizada avaliando a solução (S_L) após a retirada das membranas imersas, definidas como S_L -BN (borracha natural), S_L -BN^C_{aq} (borracha natural preparada a partir de látex centrifugado), S_L -BN_{vulc} (borracha natural preparada a partir de látex pré-vulcanizado) e S_L -BN/PVC (borracha natural recoberta com filme de PVC).

1.1.7 - Liofilização

As soluções de água utilizadas no processo de lixiviação dos látex foram liofilizadas a fim de realizar as análises por espectroscopia FT-IR/ATR. Utilizou-se um equipamento da marca Edwards, modelo E-C modolyo, disponibilizado pela Prof.^a Dra. Maria de Lourdes Corradi da Silva, do Departamento de Física, Química e Biologia da FCT - UNESP, campus de Presidente Prudente.

1.2 - Técnicas de Caracterização

1.2.1 - Espectroscopia de absorção no UV-Vis

O espectrofotômetro da marca Varian, modelo Cary 50, operando numa faixa de 190 a 800 nm, com razão de *scan* de 600 nm.min⁻¹, foi utilizado para a avaliação dos componentes lixiviados pela borracha natural quando inserida em solução aquosa a 40

°C durante 5 horas. O espectrofotômetro da marca Jasco, modelo V-670, com razão de *scan* de 400 nm.min⁻¹, foi utilizado para a avaliação óptica das membranas de borracha natural, preparadas a partir de diferentes látex, como descrito no item Materiais e Métodos.

1.2.2 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Utilizou-se um equipamento da marca Zeiss LEO 440, detector secundário de elétrons, com distância de cerca de 9,0 mm entre o canhão de elétrons e a amostra; 15,0 kV e ampliações de 1.000 e 10.000 vezes. A microscopia eletrônica de varredura foi implementada a fim de avaliar a morfologia dos filmes de PVC depositados sobre a superfície das membranas de borracha natural.

1.2.3 - Ensaio mecânico: modo tensão vs. deformação

Os ensaios de tração foram realizados em máquina universal de ensaios da marca EMIC, modelo DL2000, com velocidade de deformação de 500 mm.min⁻¹, célula de carga de 5 kN e um transdutor de deformação interno. Para esse ensaio, foram usados corpos de prova baseados nas determinações ASTM D412 [33], modelo C de amostras, avaliando o comportamento dos corpos de prova (Figura 3) em triplicatas de resultados.

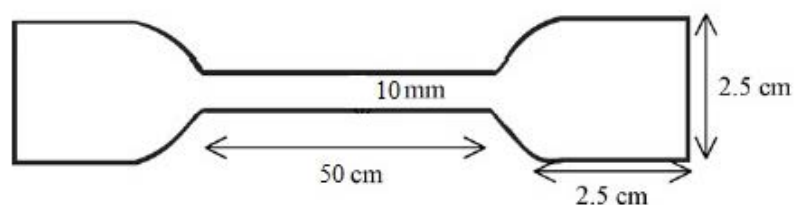


Figura 3: modelo de corpos de prova baseado nas determinações ASTM D412, modelo C de amostras, utilizado na avaliação das propriedades mecânicas das membranas de borracha natural, ensaio de tração vs. deformação.

1.2.4 - Espectrômetro de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) no modo ATR.

Medidas de espectroscopia FT-IR/ATR foram realizadas com um espectrômetro da marca Bruker, modelo Vetor 22, com número de onda no intervalo de 500 - 4000 cm⁻¹, utilizando 32 *scans* com 4 cm⁻¹ de resolução espectral e um detector DTGS. A técnica de espectroscopia FT-IR/ATR foi utilizada com o objetivo de identificar a composição lixiviada pelas membranas de borracha natural. A solução aquosa de lixiviado foi previamente liofilizada.

1.2.5 - Espectroscopia de Massa Atômica (ICP)

O equipamento utilizado no estudo de espectroscopia de massa atômica é um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, marca Perkin Elmer, Modelo Optima 8000 (dados informados pela empresa Venturo Análises Ambientais). A curva analítica realizada está limitada entre 0,05 e 2,00 mg.L⁻¹. Foram adotados padrões ISO Guide 34 para as curvas analíticas, e padrões de rastreabilidade Nist para verificação das mesmas. Todas as amostras passaram por 4 vezes (ciclos) de pré-concentração. A técnica de espectroscopia de massa atômica foi utilizada com o objetivo de identificar a composição lixiviada pelas membranas de borracha natural.

1.2.6 - Microscopia de Força Atômica (AFM)

As imagens obtidas por meio da microscopia de força atômica foram coletadas utilizando um equipamento digital, modelo Nanoscope IV, da Universidade de Windsor, no Canadá, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo F. Aroca. O equipamento foi utilizado com resolução de 1024x1024 pixels, operando em modo contato, com ponta de nitreto de silício.

1.2.7 - Ângulo de contato

As medições de ângulo de contato estático foram realizadas com o equipamento DM300, Kyowa Interface Science Co. - Japão, utilizando água Milli-Q (destilada e deionizada, 18.2 Ω m.cm) como líquido teste, com um volume nominal depositado de 3,0 μ L. As imagens das gotas depositadas sobre a superfície das amostras de borracha natural foram obtidas por meio de um microscópio equipado com câmera CCD acoplada. A análise da forma e ângulo de contato foi realizada utilizando o *software* Image-J[®].

1.3 - Resultados e Discussão

1.3.1 - Avaliação das propriedades das membranas de borracha natural utilizadas como plataforma para a construção dos sensores

1.3.1.1 - Ensaio Mecânico modo Tensão vs. Deformação

A técnica de ensaio mecânico (tensão vs. deformação) foi utilizada a fim de avaliar as propriedades mecânicas, mais especificamente a resistência à tração, das membranas de borracha natural preparadas a partir de látex natural, centrifugado e pré-vulcanizado. O ensaio é ilustrado na Figura 4.

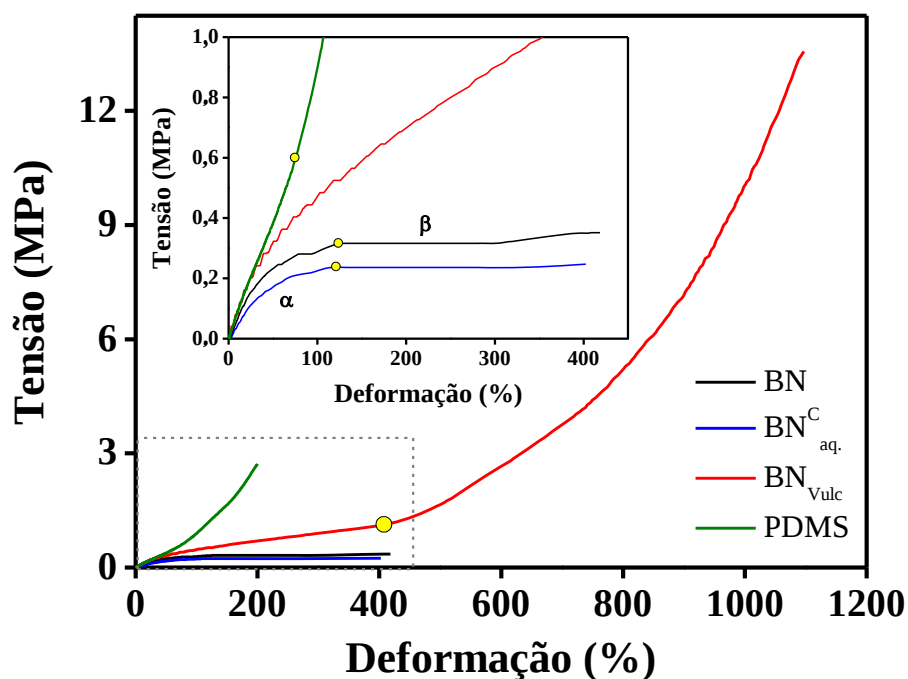


Figura 4: ensaio de tração (tensão vs. deformação) utilizado na avaliação de membranas de borracha natural, elaboradas a partir de látex natural, centrifugado e pré-vulcanizado. Os corpos de prova são preparados para os testes seguindo as determinações ASTM D412 modelo C. Os pontos em amarelo definem o limite de deformação elástica.

Até cerca de 120% de deformação em relação ao tamanho original das amostras de borracha natural, observa-se a região de deformação elástica (descrita na figura por “ α ”), i.e. o polímero pode recobrar a forma original quando cessada a força de tração aplicada, suportando uma tensão aplicada de cerca de 0,3 MPa. Esse valor deve ser levado em consideração quando são construídas as plataformas para os microdispositivos, como a tensão máxima suportada pelas membranas de borracha natural, sem que haja deformação irreversível no dispositivo. Elastômeros, tais como o *Ecoflex* (polímero de silicone), são atualmente uma estratégia importante no desenvolvimento de dispositivos microfluídicos que requerem a habilidade de atingir percentuais de estiramento maiores do que os obtidos quando o polímero PDMS comum é implementado[34].

A partir de 120% de estiramento, as membranas passam por um processo de escoamento das cadeias poliméricas (descrito na figura por “ β ”) [35], atingindo a região de deformação plástica (deformação permanente), identificada a cerca de 300% de deformação para as amostras de BN e BN^C_{aq} , próxima a 400% para a amostra BN_{Vulc} e em 70% para as membranas de PDMS. Todas as amostras apresentam comportamento viscoelástico característico de elastômeros.

A média dos valores de tensão e deformação de ruptura e módulo de Young é descrita na Tabela 2.

Tabela 2: dados obtidos de ensaios mecânicos de tração (tensão vs. deslocamento) após a avaliação das triplicatas das amostras BN, BN^C_{aq.}, BN_{vulc.}, PDMS.

Amostras	Deformação (%)	Tensão de Ruptura (MPa)	Módulo de Young (MPa)
BN ^C _{aq.}	420,6	0,26 ± 0,03	0,4499
BN	452,5	0,37 ± 0,07	0,6035
BN _{vulc.}	1149,7	14,0 ± 0,76	0,7884
PDMS	200,1	2,73 ± 0,75	0,8495

O módulo de Young (E) [36] é calculado em função da tensão (α) e deslocamento (ε) máximos medidos na região linear da curva de ensaio mecânico de tração (região de deformação elástica), *i.e.* dos valores da tangente ao aumento da tensão vs. deslocamento nessa região, conforme a equação:

$$E = \frac{\alpha}{\varepsilon}$$

Sendo,

$$\varepsilon = \frac{l - l_0}{l_0}$$

Onde “ l_0 ” é definido como o comprimento inicial (entre garras) das amostras, e “ l ” é o comprimento final, calculado com a soma do valor inicial “ l_0 ” ao valor de deformação percentual medido no limite linear da curva de tensão.

As membranas de borracha natural (BN) apresentam uma média de tensão e deformação de ruptura de 0,37 MPa e 452,5%, respectivamente. O processo de centrifugação do látex (BN^C_{aq.}) reduz tanto a tensão quanto a deformação de ruptura, mensurados a 0,26 MPa e 420,6%, respectivamente. Durante o processo de tratamento térmico (secagem) do látex, as cadeias se organizam paulatinamente, podendo ocorrer entrelaçamentos ou mesmo a formação de ligações cruzadas naturais. No entanto, quando implementado o processo de centrifugação, a fase borracha é aglomerada, de modo que a água não consiga dissociar totalmente as cadeias poliméricas. Consequentemente, reduz-se o entrelaçamento entre as cadeias poliméricas, diminuindo

a tensão e a deformação de ruptura para as membranas BN^C_{aq} . Após o processo de centrifugação, obteve-se a fase borracha (dispersão coloidal), a qual diluí-se em água, no intuito de diminuir resíduos gerados pelo uso de solventes orgânicos. No entanto, a preparação de membranas de borracha natural a partir de látex centrifugado, utilizando tolueno ou clorofórmio como solventes, é reportada por nossos colaboradores [32].

O processo de vulcanização em líquido, implementado para preparação das membranas BN_{Vulc} , proporciona maior resistência mecânica à tração, ampliando a tensão e a deformação de ruptura para 14,0 MPa e 1149,7%, respectivamente. Além disso, o uso do látex pré-vulcanizado permite a realização do processo de vulcanização (formação de ligações cruzadas) em temperaturas e tempos menores do que quando o processo de vulcanização a seco (incorporação dos agentes de vulcanização em borracha natural utilizando cilindros de mistura) é implementado.

Atribuí-se o aumento na deformação percentual, em relação ao medido para membranas de borracha natural (BN), ao sistema de vulcanização convencional utilizado na preparação dos compósitos, onde há predominância de ligações cruzadas do tipo polissulfídica [37], que contribuem para o aumento da elasticidade da matriz polimérica.

As membranas de PDMS apresentaram limite de tensão e deformação a cerca de 2,73 MPa e 200,1%, respectivamente. Os índices de resistência à tração foram muito superiores aos obtidos para as membranas de BN e BN^C_{aq} , e inferiores aos observados na avaliação das membranas preparadas a partir do látex pré-vulcanizado (BN_{Vulc}). No entanto, estudos desenvolvidos por I. D. Johnston e colaboradores [38] reportam tensões de ruptura entre 3,51 a 7,65 MPa, dependendo da temperatura de cura do polímero. O aumento na tensão de ruptura e resistência à deformação, principalmente quando considerada a região de deformação elástica (não permanente), pode ser conveniente se a aplicação dos microdispositivos requisitarem maior resistência à pressão interna.

A redução na habilidade de estiramento (elasticidade) dos dispositivos é mensurada em função da redução no módulo de Young de 0,7884 MPa referente à BN_{Vulc} para 0,4499 MPa referente à BN. Os baixos valores associados às membranas BN e BN^C_{aq} podem ser de interesse quando são utilizados materiais poliméricos na construção de microválvulas. Essas válvulas são acionadas (abertas) ao atingir valores específicos de pressão, consequentemente permitindo a passagem do fluido, e são caracterizadas como sistemas “switching on/off”.

1.3.1.2 - Espectroscopia de absorção no UV-Vis

Na Figura 5, apresenta-se o estudo das propriedades ópticas das membranas de borracha natural preparadas a partir de diferentes látex, e da membrana de PDMS. Observa-se que as membranas de borracha natural têm considerável transparência (grau de transmissão de luz) avaliando a região espectral entre 800 - 400 nm (visível). As membranas preparadas a partir do látex estabilizado com hidróxido de amônio (BN) possuem transmitância de cerca de 75%, absorvendo totalmente a luz em comprimentos de onda abaixo de 300 nm. Esse fato é associado aos componentes não-borracha, *i.e.* principalmente proteínas e fosfolípidios provenientes dos lutóides e compostos Frey-Wyssling, presentes na composição do látex e que são responsáveis pela coloração amarelada das membranas de borracha natural [39,40,41].

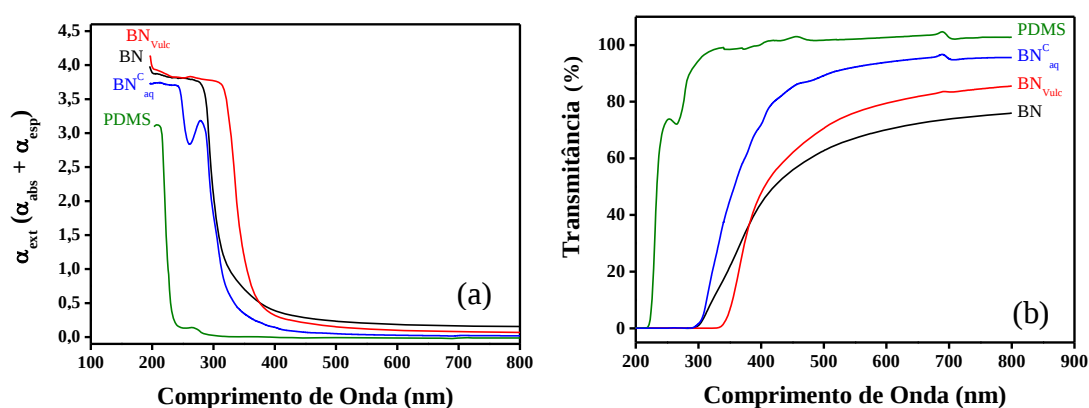


Figura 5: espectroscopia de absorção no UV-Vis, razão de scan 400 nm.min⁻¹, avaliando as membranas BN, BN^C_{aq}, BN_{vulc} e PDMS, método de (a) Absorção (inset) foto comparativa demonstrando a transparência das membranas de borracha natural e PDMS, (b) Transmissão.

O processo de vulcanização, além de ampliar a resistência à tração (abordada anteriormente), melhora o grau de transparência, atingindo índices de transmitância de cerca de 85% sem comprometer consideravelmente a janela espectral dos dispositivos, absorvendo totalmente a luz incidente abaixo de 350 nm. Esse deslocamento na janela espectral pode ser associado às mudanças estruturais (denaturação) das proteínas, atribuídas aos agentes de vulcanização inseridos no látex.

Finalmente, o processo de centrifugação do látex demonstrou excelentes resultados no conceito de ampliação dos índices de transmitância, atingindo cerca de 95% (Figura 5b) e, conseqüentemente, reduzindo a quantidade de proteínas e fosfolípidios, ao que atribuímos à presença da banda de absorção em 279 nm. A grande quantidade de grupos proteicos, e em geral compostos não-borracha, presentes nas

membranas BN e BN_{vulc} causam a saturação, *i.e.* a total absorção de luz, observada nos estudos por espectroscopia de absorção no UV-Vis.

Não obstante, as membranas de PDMS, atingindo 100% (como esperado), superam todos os índices de transmitância obtidos para as membranas de borracha natural. Além disso, o uso do PDMS amplia a região espectral nominal, *i.e.* que pode ser considerada na implementação de microdispositivos baseados em dados espectroscópicos para regiões abaixo de 250 nm.

O recobrimento de PVC, utilizado como camada hidrofóbica na superfície das membranas de borracha natural (BN/PVC), não altera significativamente as propriedades ópticas do polímero (Figura 6). A redução na transmitância pode estar associada ao efeito de reflexão total interna na interface de dois materiais de índices de refração diferentes, nesse caso, a borracha natural e o recobrimento de PVC.

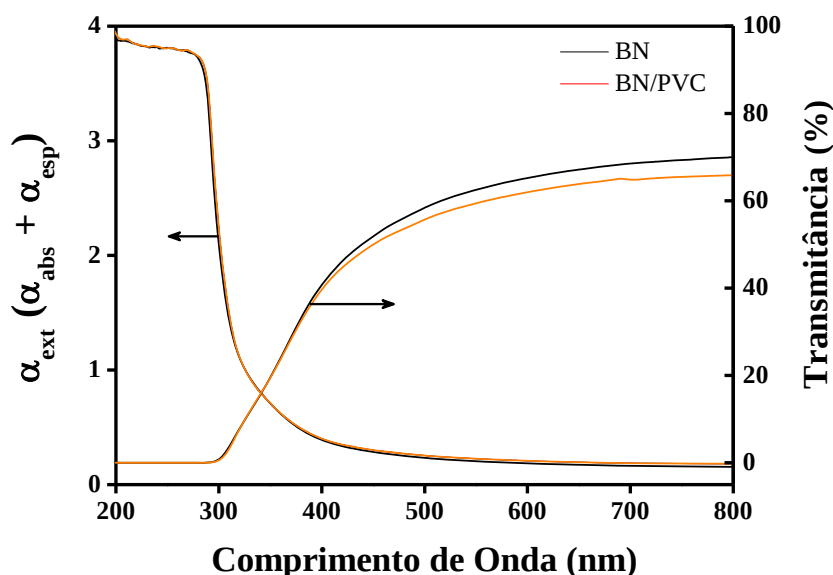


Figura 6: espectroscopia de absorção no UV-Vis, razão de scan 400 nm.min⁻¹, avaliando as membranas BN e BN/PVC, comparando espectros de absorção e transmissão.

1.3.1.3 - Ângulo de contato

A medida de ângulo de contato é realizada para avaliar a molhabilidade do material, o que é essencial para conhecer o comportamento do fluido/fluxo interno de amostra no microdispositivo. O uso de materiais hidrofóbicos diminui a interação da amostra com a parede dos canais, facilitando a condição de fluxo laminar no interior do dispositivo. O ângulo de contato foi medido na superfície das membranas de borracha natural que foram preparadas em contato com as placas de petri, visto que há diferenças estruturais e morfológicas entre essa superfície e a superfície das membranas que ficam

em contato com o ambiente durante o tratamento térmico, *i.e.* o processo de secagem do látex.

O estudo morfológico de superfície de membranas de borracha natural foi previamente publicado por nossos colaboradores [32]. As medidas de ângulo de contato não apresentam modificações significativas quando comparadas às membranas de BN, BN_{aq}^C e BN_{Vulc} , atingindo valores próximos a 75° . A pequena redução no ângulo de contato, medido na superfície das membranas de BN_{aq}^C , pode estar relacionada ao processo de centrifugação, que diminui a concentração de proteínas e consequentemente a quantidade de grupos polares na composição das membranas, facilitando assim a interação líquido-superfície.

O uso do filme de PVC como recobrimento da superfície das membranas de borracha natural (BN/PVC) aumentou o ângulo de contato para 83° , *i.e.* reduziu a interação da água com a superfície da membrana, consequentemente diminuindo o grau de absorção de água. Esse fato corrobora os resultados que apresentaremos no item 1.3.2, demonstrando a redução da quantidade de compostos proteicos liberados em solução relacionada à absorção/interação de água com a superfície das membranas. Como esperado, a membrana de PDMS apresenta superfície hidrofóbica, demonstrando ângulo de contato em torno de 100° , o que justifica a ampla utilização do polímero em aplicações microfluídicas. A membrana de borracha natural recoberta com PVC é a que mais se aproxima das condições oferecidas pelo uso do polímero PDMS.

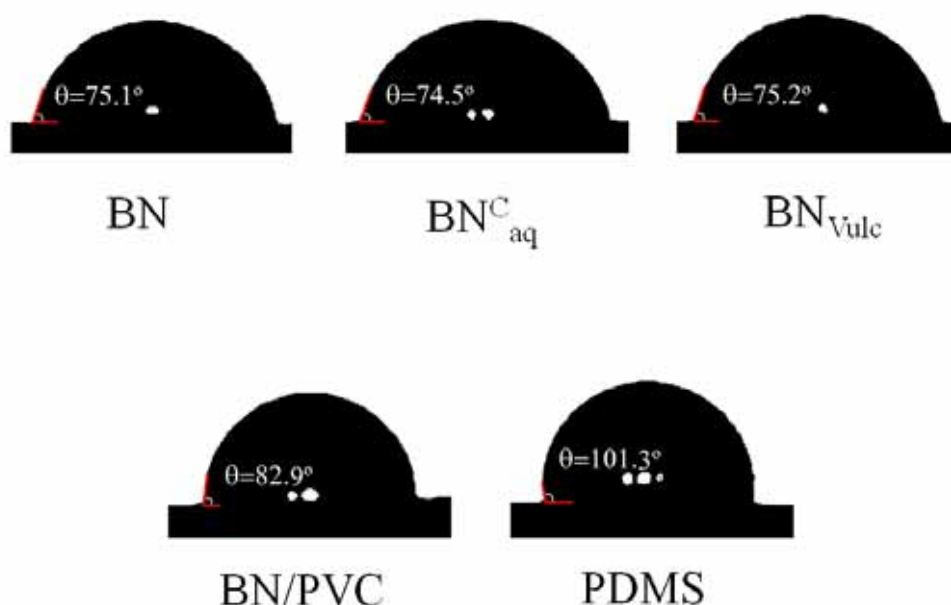


Figura 7: medidas de ângulo de contato, avaliando a interação superficial das membranas de BN, BN_{aq}^C , BN_{Vulc} , BN/PVC e PDMS em contato com a água.

Estudos preliminares foram realizados na Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Sorocaba - SP, em parceria com o Prof. Dr. Nilson Cruz. Utilizou-se o tratamento por plasma de hexafluoreto de enxofre (SF_6) e avaliou-se o ângulo de contato de superfície das membranas de borracha natural, empregando água como líquido de análise em função da potência do plasma (Figura 8).

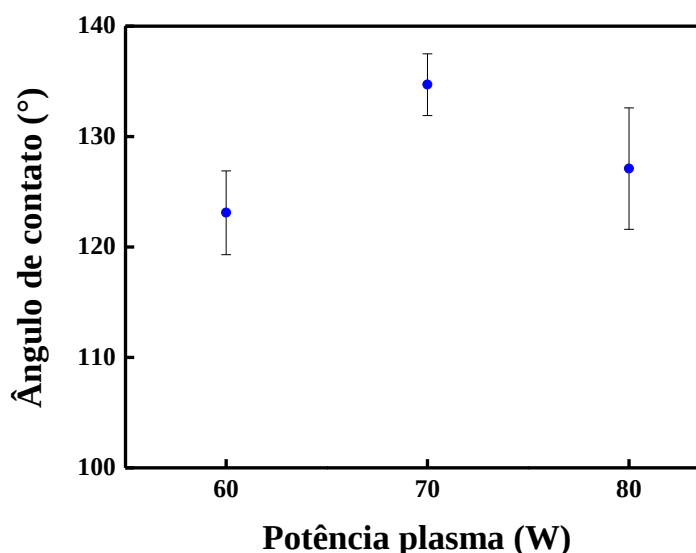


Figura 8: tratamento por plasma de hexafluoreto de enxofre (SF_6), avaliando a superfície da membrana de borracha natural utilizando água como líquido de análise.

O ângulo de contato foi ampliado para valores próximos a 140° , o que representa uma superfície superhidrofóbica, facilitando o fluxo interno no dispositivo microfluídico e possivelmente reduzindo o percentual de absorção de água. Esses resultados serão melhor avaliados e posteriormente divulgados em forma de artigo científico.

1.3.2 - Avaliação dos compostos lixiviados pelas membranas de borracha natural em solução aquosa

Neste item, estudou-se a solução de lixiviado de borracha natural em água (S_L -BN), borracha centrifugada (S_L -BN^C_{aq}) e borracha vulcanizada (S_L -BN_{vulc.}) por meio de espectroscopia de absorção no UV-Vis e espectroscopia de Massa Atômica (ICP). Para a realização dos testes com espectroscopia FT-IR/ATR, as soluções de lixiviado foram liofilizadas para a extração de água.

1.3.2.1 - Espectroscopia de absorção no UV-Vis / Microscopia AFM

As amostras de lixiviado de borracha natural em solução aquosa referentes às membranas preparadas com látex natural, centrifugado e pré-vulcanizado foram estudadas por meio de espectroscopia UV-Vis. Este estudo tem por objetivo avaliar a presença de compostos não-borracha, liberados em solução, que possam interferir no funcionamento dos dispositivos microfluídicos (Figura 9).

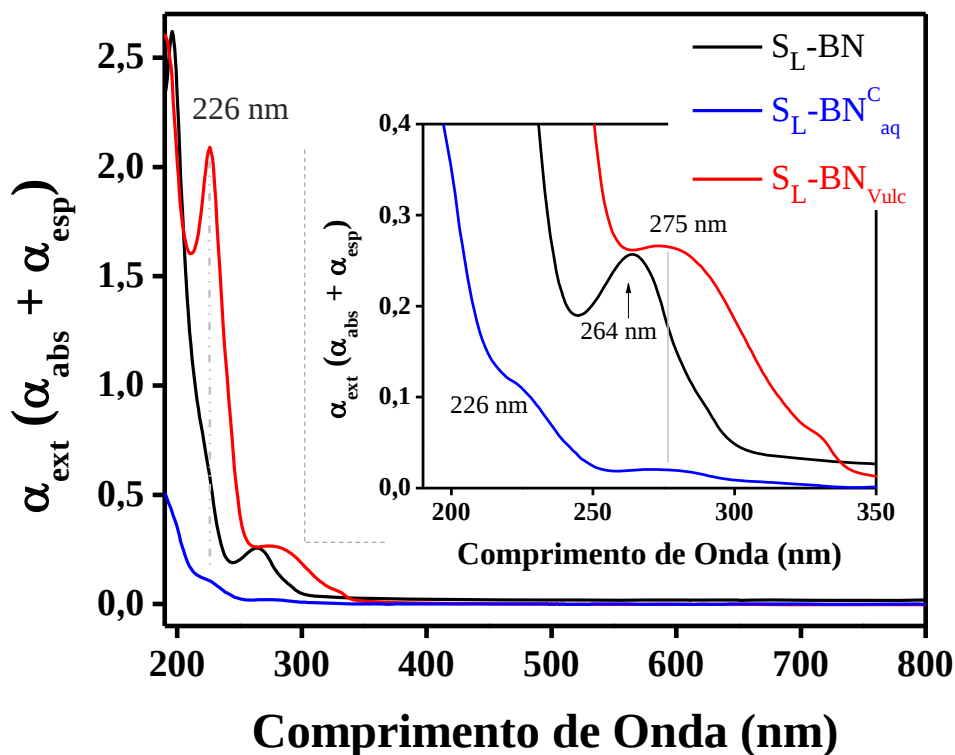


Figura 9: espectroscopia de absorção no UV-Vis utilizada na avaliação de solução de lixiviado de membranas de borracha natural preparadas com látex natural (BN), centrifugado (BN^C_{aq}) e pré-vulcanizado (BN_{vulc}).

O espectro atribuído à solução de lixiviado de membranas de borracha natural, preparadas a partir de látex *in-natura* ($S_L\text{-BN}$), apresenta banda de absorção em aproximadamente 264 nm. Estudos realizados por Arlindo e colaboradores [42], referentes à obtenção e à caracterização de blendas de colágeno com látex, apresentaram bandas de absorção em 281 nm para o látex. Esse valor se deve aos compostos não-borracha. A análise de colágeno por espectroscopia UV-Vis reporta bandas de absorção em 277 nm, resultado gerado por aminoácidos aromáticos. Portanto, atribuem-se às bandas de absorção, obtidas da solução de lixiviado de borracha natural, os compostos orgânicos principalmente as proteínas e os fosfolípidios, denominados componentes não-borracha. Recentemente, esses componentes têm sido associados à fase soro ou

aquosa do látex, contendo, em maior quantidade, proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, entre outros [23,43,44].

Tseplin e colaboradores [45] estudaram a identificação de estados eletrônicos de singletos excitados de isômeros de ácido hidroxibenzóico através das técnicas de espectroscopia UV-Vis, relacionando as bandas de absorção de ácidos benzóicos ao par orbital envolvido na transição eletrônica. Transições envolvendo combinações antiligantes de orbitais π (HOMOs) do anel benzeno e pares de elétrons dos átomos de oxigênio podem ser relacionados ao comprimento de onda das bandas de absorção obtidas nos estudos de componentes lixiviados de membranas de borracha natural.

A banda de absorção em 264 nm para amostras de S_L -BN é deslocada para cerca de 275 nm, quando são avaliados os compostos lixiviados de membranas de BN_{aq}^C e BN_{vulc} . Esse deslocamento é associado ao processo de centrifugação do látex utilizado para a preparação das membranas de BN_{aq}^C e BN_{vulc} , gerando um processo de separação de proteínas (seleção) de acordo com a densidade (peso), possibilitando assim a observação de duas bandas de absorção em vez de apenas uma (S_L -BN).

O processo de centrifugação demonstrou-se efetivo, diminuindo a quantidade de proteínas no látex e, conseqüentemente, a quantidade de compostos não-borracha lixiviados atribuídos à redução na intensidade das bandas de absorção, quando comparadas ao espectro obtido da amostra S_L -BN.

O aumento na intensidade relativa das bandas de absorção, observado para os compostos lixiviados de borracha natural vulcanizada (BN_{vulc}), é atribuído ao maior volume de água, bem como a um aumento na porosidade da superfície das membranas, associado ao látex pré-vulcanizado. [12] Conseqüentemente, aumenta-se a quantidade de grupos proteicos (de baixa densidade molecular) presentes na superfície das membranas (e posteriormente lixiviados em solução) devido ao processo de migração desses componentes durante o processo de evaporação da água presente no látex (tratamento térmico).

A morfologia das membranas de borracha natural foi avaliada utilizando a técnica de microscopia de força atômica (Figura 10) a fim de comprovar a porosidade da superfície. Um conjunto de poros é observado, podendo-se atribuir duas classes de tamanhos, a primeira, em torno de 105,7 nm de largura, e a segunda classe de tamanho em torno de 313,7 nm de largura. Os poros são provenientes da evaporação do conteúdo líquido do látex, gerando acúmulo de gases internos que, ao vencerem a tensão superficial, configuram os poros na superfície das membranas de borracha natural.

A superfície porosa é associada ao efeito de absorção de água, bem como à lixiviação de componentes não-borracha por parte das membranas de borracha natural. Além disso, a liberação de amidas provenientes da cadeia polimérica pode estar relacionada a processos de hidrólise de polímeros em água [46,47]. Esses componentes podem ser correlacionados aos grupos α -terminal, *i.e.* fosfolípidios presentes na cadeia polimérica da borracha natural [48].

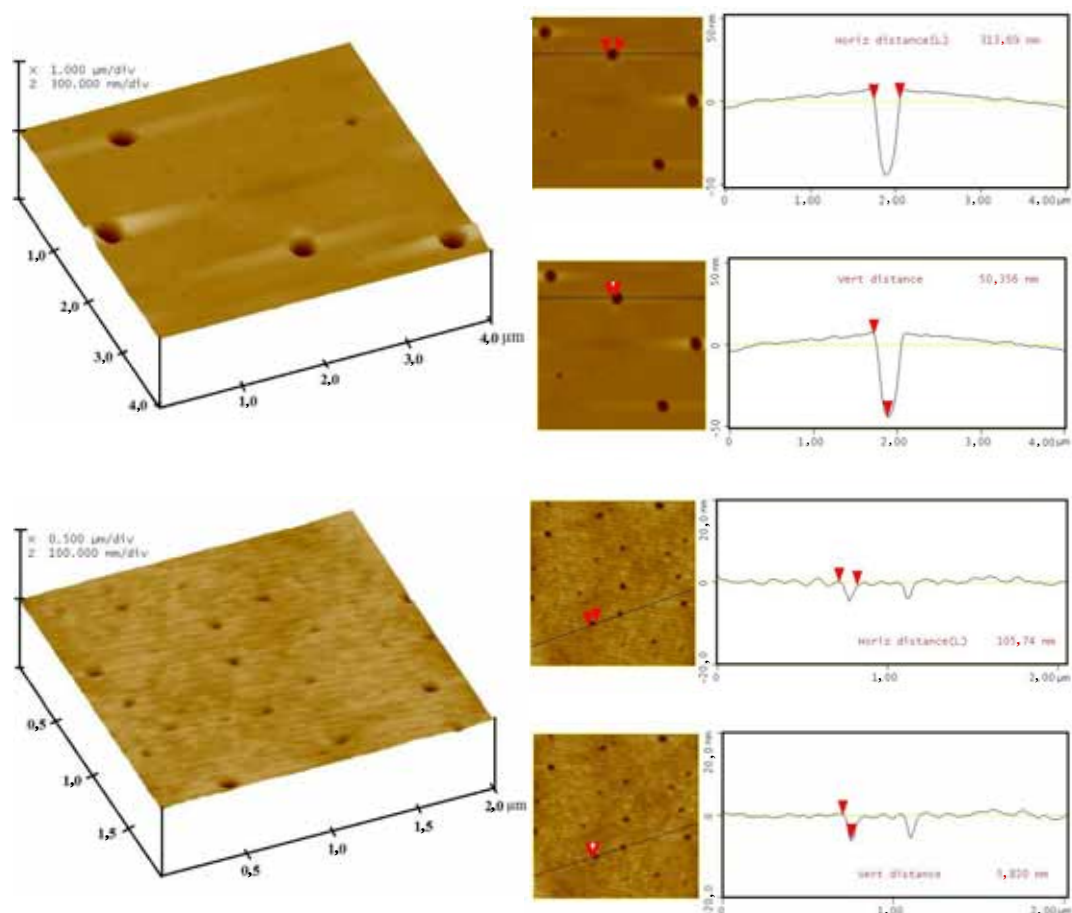


Figura 10: microscopia de força atômica (AFM) utilizada na avaliação da morfologia de superfície das membranas de borracha natural (BN), equipamento Digital, modelo Nanoscope IV, modo contato.

Para melhor avaliar o processo de lixiviação de componentes da borracha natural, realizaram-se ciclos de lixiviação, *i.e.* foram executados, para cada ciclo, processos de imersão em água durante 5 horas a 40 °C, seguidos de tratamento térmico para a secagem das membranas de borracha natural a 65 °C (devido à absorção de água) (Figura 11).

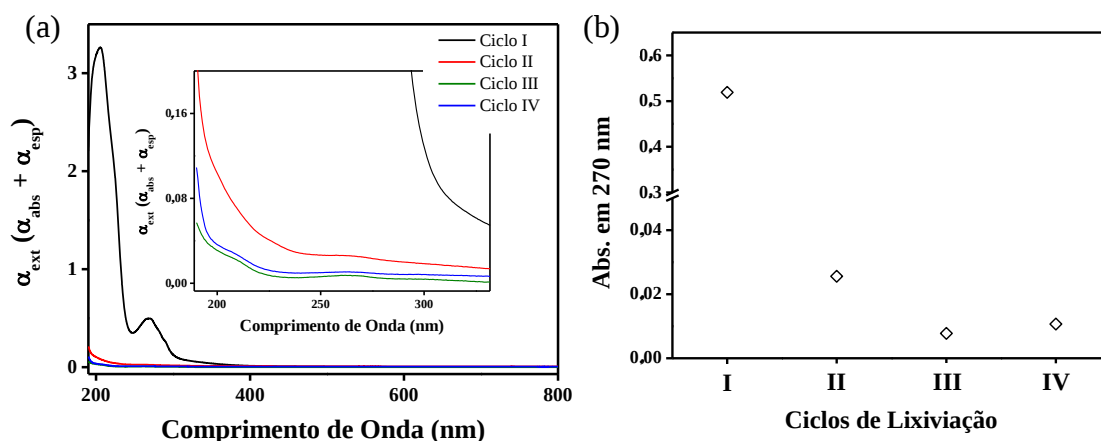


Figura 11: espectroscopia de absorção no UV-Vis avaliando (a) processos consecutivos de lixiviação e secagem das membranas de borracha natural (ciclos) (b) avaliação da banda de absorção em 270 nm em função do número de ciclos de lixiviação. Cada ciclo é realizado por imersão em água MilliQ a 40 °C durante 5 horas. Após cada ciclo, a membrana é submetida a tratamento térmico para secagem (65 °C).

Após o primeiro ciclo de lixiviação, observa-se uma redução significativa na concentração de componentes não-borracha liberados em solução (Ciclos II, III e IV). No entanto, apesar da redução dos componentes lixiviados, o processo de lavagem (aplicado para a avaliação dos componentes lixiviados) não reduz a absorção de água, o que, consequentemente, inviabiliza o uso das membranas de borracha natural para a construção de dispositivos ópticos (ao absorver água, a borracha natural torna-se opaca). A fim de solucionar esse conflito, filmes de PVC foram utilizados como camada de recobrimento interno nos microdispositivos de borracha natural.

Na Figura 12, avalia-se a influência dos filmes de PVC depositados na superfície das membranas de borracha natural em relação aos componentes lixiviados em solução. O estudo foi realizado em solução aquosa, à temperatura de 40 °C, medindo a liberação de componentes após 3 e 5 horas de imersão (BN/PVC). Observa-se a redução considerável na liberação de componentes, principalmente quando examinado o tempo de lixiviação de 3 horas. Além disso, é importante ressaltar que os experimentos envolvendo os microdispositivos são realizados em temperatura ambiente, o que evita ainda mais a liberação de componentes (Figura 12 (*inset*)) quando os filmes de PVC são depositados, visto que o aquecimento favorece a dilatação dos poros dos filmes (Figura 2), favorecendo a lixiviação.

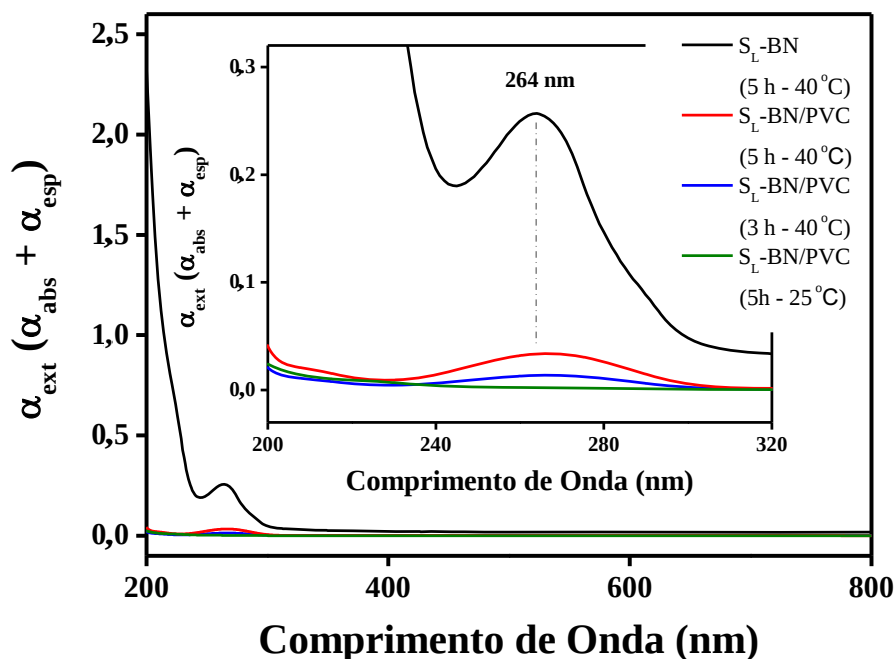


Figura 12: espectroscopia de absorção no UV-Vis avaliando os componentes lixiviados das membranas de borracha natural (S_L -BN) e os efeitos gerados pela deposição de filme de PVC sobre a superfície da membrana (S_L -BN/PVC).

1.3.2.2 - Espectroscopia de absorção no infravermelho (FT-IR/ATR)

Utilizou-se a espectroscopia FT-IR/ATR a fim de identificar os componentes liberados no processo de lixiviação, bem como comparar as estruturas químicas obtidas dos diferentes látex empregados. A Figura 13 mostra os espectros dos componentes liberados em solução a partir de membranas preparadas com látex natural (S_L -BN), centrifugado (S_L -BN^C_{aq}) e pré-vulcanizado (S_L -BN_{vulc}), após a liofilização das soluções de lixiviado. A característica do espectro é associada aos compostos isoprênicos (cis-1,4-isopreno), presentes na cadeia polimérica da borracha natural, o que corrobora a ideia do processo de hidrólise. A atribuição dos picos é realizada na Tabela 3 [24,49,50].

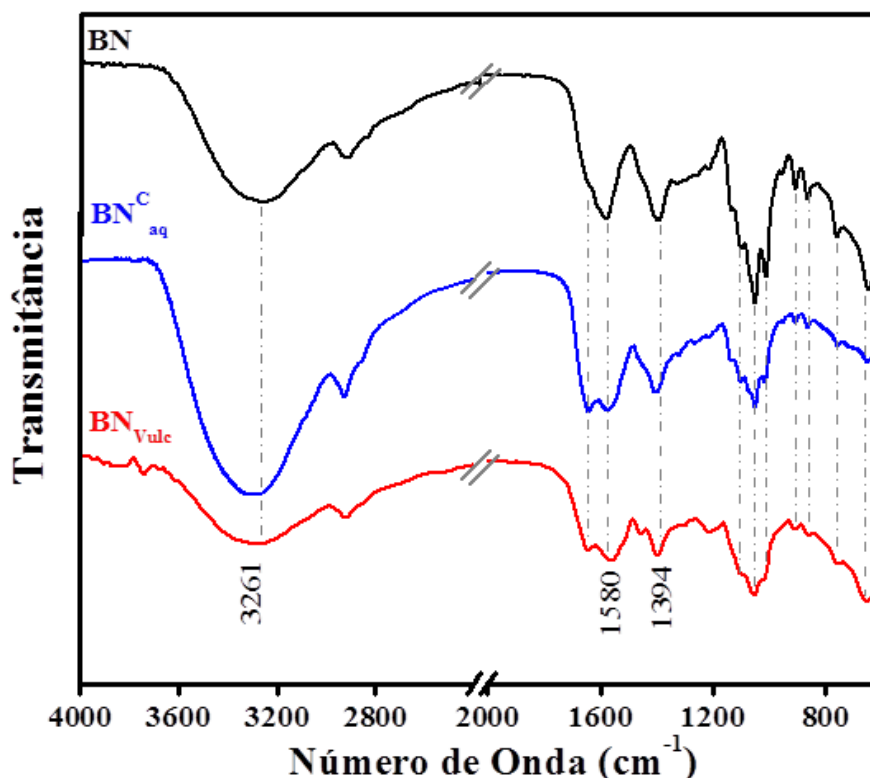


Figura 13: espectroscopia FT-IR (ATR) utilizada na avaliação de solução de lixiviado de membranas de borracha natural preparadas com látex natural (S_L -BN), centrifugado (S_L -BN^C_{aq}) e pré-vulcanizado (S_L -BN_{Vulc}), após processo de liofilização.

Modificações significativas são associadas aos picos observados em 1394, 1580 e 3261 cm^{-1} . O pico em 1394 cm^{-1} (S_L -BN) é relacionado a grupos contendo compostos de $-\text{CH}_3-$: deslocado para 1402 cm^{-1} para a composição de lixiviado de S_L -BN^C_{aq}, e para 1397 cm^{-1} para a composição de S_L -BN_{Vulc}. Essa associação é atribuída a mudanças estruturais nos grupos de fosfolípidios (α -terminal) contidos nas cadeias poliméricas de menor densidade de lixiviados em solução. Os picos em 1580 cm^{-1} , causados pelo estiramento de compostos C-N ou pela deformação N-H, estão em números de onda deslocados nos compostos lixiviados de S_L -BN^C_{aq} (1569 cm^{-1}) e S_L -BN_{Vulc} (1559 cm^{-1}). Igualmente, observa-se o deslocamento do pico em 3261 cm^{-1} (estiramento simétrico de ligação N-H) obtidos para lixiviado de borracha natural (BN). Esses picos são caracterizados em 3294 cm^{-1} para S_L -BN^C_{aq} e em 3292 cm^{-1} para S_L -BN_{Vulc}. Deslocamentos associados a compostos que envolvem amidas são relacionados à modificação estrutural de proteínas (denaturação), [51] corroborando os resultados da espectroscopia de absorção no UV-Vis.

Tabela 3: espectroscopia FT-IR/ATR dos componentes lixiviados, provenientes das membranas de borracha natural (BN) após o processo de liofilização.

Compostos lixiviados de BN		
Experimental (cm ⁻¹)	Literatura (cm ⁻¹)	Atribuição [24,49,50]
760	765	CH ₂ <i>rocking</i>
861	837	=CH <i>bending</i> fora do plano ou deformação C=C-H
910	921	Estiramento C-C
1013	1015	Estiramento C-CH ₂
1044	1040 - 1080	Estiramento C-O de éster
1100	1091 - 1095	Estiramento C-CH ₂ ou CH ₂ <i>twisting</i>
1134	1128 - 1131	CH ₂ <i>wagging</i> ou Estiramento C-C
1215	1220	Amida Terciária (N-H)
1314	1309	-CH ₂ <i>twisting</i>
1394	1375	Deformação simétrica de -CH₃
1456	1451	Deformação de -CH ₂ -
1580	1530 - 1560	Estiramento C-N + Deformação N-H de Amida secundária
1644	1645 - 1650	Estiramento C=O de amida primária
2915	2912	Deformação simétrica de C-H em -CH ₃
3261	3275	Estiramento simétrico de N-H
3960 – 3490		Estiramento simétrico de O-H

1.3.2.3 - Espectroscopia de Massa Atômica

As soluções de lixiviados de borracha natural em solução aquosa, avaliadas para as membranas preparadas com látex natural, centrifugado e pré-vulcanizado, foram estudadas por meio de um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. O objetivo era avaliar a composição elementar relacionada a materiais que não poderiam ser identificados por meio das técnicas de espectroscopia até então utilizadas e que, por sua vez, poderiam influenciar nos futuros estudos de sensoriamento dos dispositivos microfluídicos. Os resultados são ilustrados na Tabela 4.

Tabela 4: dados obtidos utilizando um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado na avaliação de solução de lixiviado de membranas preparadas com látex natural, centrifugado e pré-vulcanizado. Os elementos enxofre e zinco foram avaliados apenas para os compostos lixiviados de BN_{Vulc} . Os dados descritos como “LD” são utilizados quando o elemento não está presente no lixiviado ou não atinge o limite de detecção do equipamento.

Referência SMEWW 21 3030 E	Resultados (mg.L ⁻¹ ou ppm)		
Elemento	S _L -BN	S _L -BN ^C _{aq}	S _L -BN _{Vulc}
Fósforo	LD	LD	LD
Enxofre	-	-	LD
Potássio	0,865	LD	5,289
Cálcio	LD	0,200	LD
Manganês	LD	LD	LD
Magnésio	LD	0,058	0,6975
Ferro	LD	0,043	LD
Zinco	-	-	LD
Sódio	2,5	LD	3,1

*1 ppm $\approx$ 0.999999998 mg.L⁻¹

Martins avaliou a borracha natural preparada a partir do látex coletado de árvores do clone RRIM 600 [52]. A Tabela 5 ilustra a composição obtida por meio de análise química elementar reportada na literatura.

Tabela 5 [apud.52]: análise química elementar de borracha natural (Clone RRIM 600).

Elemento	Média (ppm)
Cobre	2,6 $\pm$ 0,7
Cálcio	75,7 $\pm$ 21,3
Manganês	2,44 $\pm$ 1,1
Cobalto	0,05 $\pm$ 0,04
Sódio	102,0 $\pm$ 41,2
Ferro	109 $\pm$ 75,9
Potássio	1021,28 $\pm$ 517,6
Zinco	7,19 $\pm$ 2,0
Níquel	0,52 $\pm$ 0,45
Magnésio	518,33 $\pm$ 224,4

Como comparativo, todos os valores mensurados analisando os componentes lixiviados das membranas de borracha natural são inferiores aos referidos por Martins e colaboradores. Os elementos enxofre e zinco não foram avaliados para as membranas de BN e de $\text{BN}_{\text{aq}}^{\text{C}}$, visto que são provenientes principalmente da composição utilizada na vulcanização das membranas de borracha natural (BN_{vulc}).

Com base nos resultados reportados por Martins e colaboradores, foram definidos os elementos que seriam investigados na análise por meio de espectroscopia de massa atômica, com exceção do cobalto, que aparece com uma concentração muito pequena nas análises elementares. Os elementos fósforo (P) e enxofre (S) foram incluídos nas avaliações devido à composição do látex pré-vulcanizado e aos resultados complementares desenvolvidos por Rippel [25], que estudou a composição do látex por meio da técnica de fluorescência de raios-X.

As membranas de borracha natural (BN) apresentam lixiviação de potássio a $0,865 \text{ mg.L}^{-1}$ e de sódio a $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$, principalmente por causa da composição do solo e dos insumos agrícolas utilizados na produção de látex. A concentração de potássio e cálcio aumenta consideravelmente quando é avaliada a $\text{S}_\text{L}\text{-BN}_{\text{vulc}}$, atingindo concentrações de $5,289 \text{ mg.L}^{-1}$ e $3,1 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente. Esse aumento é atribuído à composição dos agentes de vulcanização implementados no látex pré-vulcanizado, podendo ser explicado também pelo aumento da concentração de magnésio, medido em $0,6975 \text{ mg.L}^{-1}$ ($\text{S}_\text{L}\text{-BN}_{\text{vulc}}$). Além disso, a composição lixiviada de potássio, cálcio e magnésio, pode ser associada aos compostos do látex (provenientes do solo ou insumos agrícolas), visto que o látex pré-vulcanizado é adquirido comercialmente, possuindo composição diferente da do látex utilizado na preparação das membranas de BN e $\text{BN}_{\text{aq}}^{\text{C}}$.

A composição de zinco e enxofre analisada para os componentes lixiviados de BN_{vulc} não atingiu o limite de detecção do espectrômetro de massa, comprovando a eficiência do processo de vulcanização em líquido (látex). A formulação empregada neste projeto é similar à composição implementada em materiais utilizados em contato com sistemas biológicos vivos (formulação base aplicada na preparação de preservativos) [53] que não apresentam reações adversas, tornando plausíveis os resultados de espectroscopia de massa atômica.

Por meio de espectroscopia de massa atômica, os resultados para a amostra de $\text{S}_\text{L}\text{-BN}_{\text{aq}}^{\text{C}}$ apresentam concentrações de $0,058 \text{ mg.L}^{-1}$ de magnésio, além de cálcio ($0,200 \text{ mg.L}^{-1}$) e ferro ($0,043 \text{ mg.L}^{-1}$), que podem ser associadas ao processo de

centrifugação. Este separa as diferentes composições em função da massa molar. Observa-se também a redução na quantidade de sódio e potássio para a composição de $S_L\text{-BN}_{\text{aq}}^C$, quando comparada aos compostos inorgânicos obtidos da avaliação do lixiviado de borracha natural ($S_L\text{-BN}$).

A identificação dos componentes lixiviados em solução, provenientes das membranas de borracha natural, é essencial quando dispositivos microfluídicos são preparados, *i.e.* evitam erros associados ao sensoriamento devido a componentes lixiviados. No entanto, conclui-se que a concentração de componentes não atinge níveis quantitativos dentro do dispositivo, visto que as medidas são feitas em fluxo contínuo. Além disso, quando foram considerados os testes em temperatura ambiente, o recobrimento de PVC mostrou-se eficiente em evitar a absorção de água e a lixiviação de componentes provenientes das membranas de borracha natural.

CAPÍTULO 2 - Construção do dispositivo microfluídico

Introdução

A tecnologia microfluídica, denominada *lab-on-a-chip*, permite replicar testes laboratoriais em escala miniaturizada, manipulando com grande precisão o volume dos fluidos de análise. Analogamente, sistemas microfluídicos exibem dimensões e volumes característicos, restringidos entre 10^{-6} m e 10^{-3} m ou 1,0 fL e 1,0 μ L [54]. Eventualmente, a miniaturização proporciona portabilidade ao sensor, reduzindo tanto o custo efetivo de manufatura quanto o desperdício do conteúdo amostral. Este último é atribuído ao menor volume de analito requerido pelo dispositivo [55].

Atualmente, a tecnologia microfluídica possibilita a geração de dispositivos controlados por microválvulas e microbombas integradas, vislumbrando a autonomia desses dispositivos. Na literatura, são propostos desafios que envolvem o uso de fluidos de diferentes fases (líquido-gás) ou viscosidades e o uso de partículas sólidas em suspensão, bem como a descoberta de novas rotas de síntese de moléculas de interesse químico/biológico realizadas inteiramente por tecnologia microfluídica [56].

Recentemente, pesquisas sistematizadas têm contribuído para o desenvolvimento da ciência em microescala, envolvendo dispositivos microfluídicos aplicados em diagnósticos *point-of-care* [57,58], sensores imunológicos [59,60] e enzimáticos [61], separação de componentes de plasma sanguíneo [62], bem como a manipulação de DNA [63] e de conjuntos celulares [64,65]. Além disso, microdispositivos inteiramente flexíveis têm sido implementados como células biocombustíveis [66].

Consequentemente, há uma amplificação no número de materiais, sobretudo poliméricos, empregados na construção de plataformas suporte para dispositivos microfluídicos. Dentre os polímeros empregados, destacam-se os copolímeros oleofinas cíclicas (COC) [55], o polimetilmetacrilato (PMMA) [62], o poliestireno (PS) [67], o polidimetilsiloxano (PDMS) [63,66,68] e o poliuretano metacrilato (PUMA) [69]. A utilização de plataforma construída em papel também é reportada na literatura [70].

A maioria dos polímeros utilizados em dispositivos microfluídicos oferece vantagens específicas como baixo custo; excelentes propriedades mecânicas, como a flexibilidade, a elasticidade e a resistência ao desgaste; fácil conexão com outros dispositivos ou sistemas de análise; bem como a transparência. Em suma, a borracha natural possui todas essas propriedades contidas em um único material, além de

apresentar vantagens por ser um polímero orgânico, biodegradável e biocompatível [8,71], o que qualifica o elastômero cis-1,4-polisopreno como um material promissor na construção de plataformas para dispositivos portáteis.

O desenvolvimento de dispositivos microfluídicos flexíveis possibilita aplicações como a fabricação de biosensores implantáveis, evitando o risco de quebra do dispositivo, além de reduzir os índices de oclusão em seus canais. Microdispositivos flexíveis também oferecem vantagens como a construção de mecanismos para a manipulação do fluxo, utilizando, por exemplo, válvulas de controle (*switch-on/switch-off*) [72]. Além disso, esses tipos de dispositivos têm sido aplicados no desenvolvimento de sistemas eletrônicos flexíveis [73,74], assim como em dispositivos implantáveis, permitindo medidas de condições fisiológicas *in vivo*, como a glicose ou mesmo a avaliação da atividade neural, em tempo real [75,76].

A escolha dos eletrodos de carbono como unidade sensorial é baseada nas propriedades mecânicas (flexibilidade), elétricas (alta condutividade) e na biocompatibilidade, com o objetivo de gerar um dispositivo *lab-on-a-chip* totalmente flexível. O emprego de eletrodos de carbono na construção de microdispositivos totalmente flexíveis é encontrado na literatura como uma nova metodologia em termos de células biocombustível. Em 2013, o grupo coordenado pelo Prof. Dr. Frank N. Crespilho publicou um artigo no *Journal Lab-on-a-Chip* [77], relatando a utilização de microeletrodos flexíveis de carbono, como um bioanodo enzimático, atuando em uma célula biocombustível implantada. Por meio dos testes *in vivo*, os pesquisadores obtiveram uma densidade de energia de 95 mW.cm⁻² a 80 mV para células biocombustíveis enzimáticas, resultado inédito até aquele momento.

Neste capítulo, apresentamos o desenvolvimento de um dispositivo microfluídico flexível, adotando a borracha natural como plataforma. A configuração do dispositivo foi transferida do molde, placas de acrílico (PMMA) contendo os padrões em metal, para a membrana de borracha natural por meio do tratamento térmico do látex, utilizando o método *casting*. Dessa forma, o fluxo da amostra é transmitido através dos canais até a janela de análise onde estão fixados os eletrodos de carbono flexível. Esses eletrodos foram implementados a fim de comprovar a aplicação dos microdispositivos de borracha natural como sensores eletroquímicos.

2.1 - Materiais e Métodos

2.1.1 - Preparação do Dispositivo

As placas de acrílico, que contêm as configurações de moldes utilizadas na preparação dos microdispositivos de borracha natural, são apresentadas na Figura 14. As dimensões dos moldes (canais e janelas de análise) são apresentadas na Tabela 6.

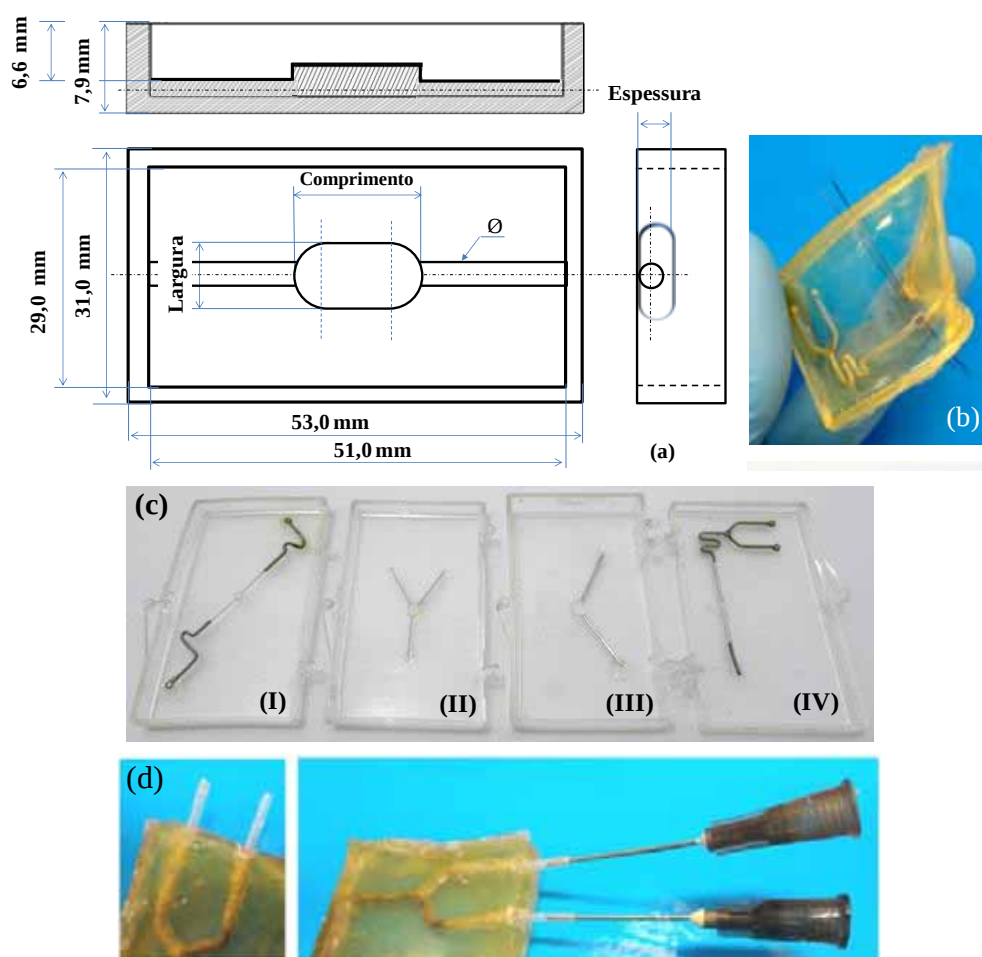


Figura 14: (a) esquema do molde acrílico com cilindros metálicos a fim de replicar os canais nas membranas de borracha natural. (b) Configuração final do dispositivo lab-on-a-chip. Os eletrodos de carbono flexíveis são inseridos entre as camadas do dispositivo, ficando em contato com a janela de análise. O dispositivo é selado utilizando o próprio látex como adesivo. (c) Apresentação dos quatro diferentes moldes empregados na preparação dos dispositivos de borracha natural. (d) Configuração dos conectores permanentes utilizando cateteres.

Os padrões do molde foram preparados em placas de acrílico de forma retangular. A janela de análise é fixada permanentemente com cantos arredondados, a fim de diminuir o volume morto de fluido, quando replicado na superfície de membranas de borracha natural (Figura 14a). Cilindros metálicos foram fixados na superfície das placas de acrílico para replicar os canais do dispositivo na superfície das

membranas de borracha natural. A configuração final do dispositivo é apresentada na Figura 14b. Os eletrodos de carbono flexíveis são inseridos entre as camadas do dispositivo, em contato com a janela de análise. Em seguida, o dispositivo é selado utilizando o próprio látex como adesivo. Quatro configurações diferentes foram preparadas e implementadas de acordo com a requisição do dispositivo nesta fase de desenvolvimento (Figura 14c). Para exemplificar, a configuração IV, que pode ser aplicada como sistema misturador, contém duas portas de entrada e canais espiralados, o que favorece a mistura da solução. Todos os moldes foram construídos em acrílico contendo partes metálicas (aço inoxidável), no entanto, outros materiais podem ser manipulados, desde que tenham resistência à temperatura necessária para a secagem do látex e desde que não apresentem reações ao entrar em contato com o látex ou com o hidróxido de amônio, utilizado no processo de estabilização. A Figura 14d apresenta a configuração dos conectores permanentes desenvolvidos com cateteres e que foram fixados nas portas de entrada e saída do dispositivo.

Tabela 6: *parâmetros dos padrões dos moldes apresentados na Figura 14a: largura, comprimento e espessura da janela de análise, bem como diâmetros dos cilindros utilizados para replicar os canais na superfície das membranas de borracha natural.*

Dispositivo de borracha natural				
Configuração	Largura (mm)	Comprimento (mm)	Diâmetro do Cilindro (μm)	Espessura da Janela de Análise (mm)
I	1,8	1,9	150	0,2
II	2,0	3,0	300	0,6
III	3,4	3,7	700	1,0
IV	1,8	2,4	700	0,7

A Tabela 6 mostra as dimensões dos moldes empregados para replicar as diferentes configurações de canais, bem como as dimensões das janelas de análise a serem construídas na superfície das membranas de borracha natural. O procedimento utilizado neste projeto pode ser comparado à modelagem de protótipos microfluídicos denominados *lab-on-a-foil* [78]. No entanto, nosso sistema de preparação não requer a aplicação de pressão externa para a moldagem ou extração do molde.

O procedimento para replicar a configuração do molde na superfície das membranas de borracha natural é apresentado na Figura 15. Após a preparação do molde (canais e janela de análise são fixados na placa de acrílico) (Figura 15a), o látex é disperso recobrendo toda a sua superfície (Figura 15b). As matrizes recobertas são então submetidas a tratamento térmico em estufa a 65 °C por 10 horas (Figura 15c).

A temperatura e o tempo de tratamento foram definidos a fim de garantir o máximo de transparência na janela de análise, bem como a secagem completa das membranas. O grau de transparência pode ser controlado em função da espessura das membranas de borracha natural, o que está diretamente ligado à configuração do dispositivo a ser moldado, como a espessura da janela óptica ou o diâmetro dos canais que, por sua vez, devem ser recobertos durante o procedimento de modelagem. Além disso, o tempo de duração do tratamento térmico pode requerer ajustes proporcionais à quantidade de água contida na composição do látex, isso pode variar em função do período do ano em que o látex é coletado.

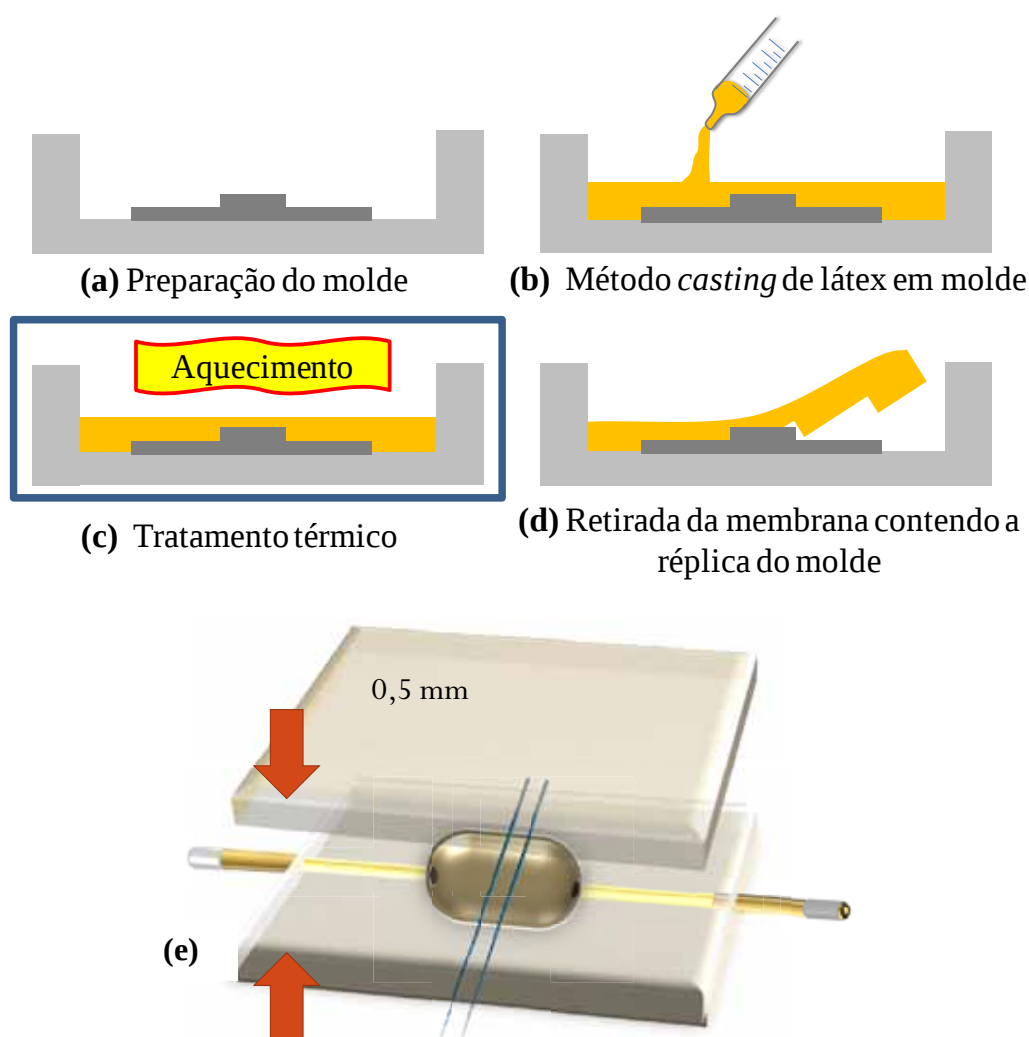


Figura 15: procedimento utilizado para replicar a configuração do dispositivo na superfície das membranas de borracha natural. (a) Molde fixado em placas de acrílico. (b) Dispersão do látex sobre o molde, recobrando a configuração de canais e a janela de análise. (c) Tratamento térmico para a secagem do látex, realizado a 65 °C durante 10 horas. (d) Retirada da membrana de borracha natural contendo a réplica do molde do dispositivo. (e) Inserção dos eletrodos entre as camadas do dispositivo; procedimento para fechar o microdispositivo utilizando a membrana de borracha natural e o látex como adesivos.

Um volume de 2,5 mL de látex é utilizado para preparar cada membrana de borracha natural contendo a réplica do microdispositivo, sendo que cada uma possui espessura de aproximadamente 0,7 mm. Após a secagem completa do látex, as membranas de borracha natural foram removidas dos moldes, reproduzindo o padrão do dispositivo (Figura 15d). A fim de aplicar o dispositivo flexível em sensoriamento eletroquímico, eletrodos de carbono foram inseridos entre as camadas de borracha natural (Figura 15e), em contato direto com a janela de análise, antes de realizar o fechamento do dispositivo.

O dispositivo é fechado utilizando outra membrana de borracha natural, com espessura de 0,5 mm (1,5 mL de látex), e o látex (Figura 15e), que são dispersos ao redor da janela de análise e dos canais do dispositivo, servindo como adesivo entre as camadas. Estas são unidas manualmente. Durante a secagem, o látex polimeriza as superfícies de ambas as membranas de borracha natural unindo as duas camadas do dispositivo. A secagem do dispositivo é realizada em estufa a 65 °C durante 2 horas. Cateteres são empregados como conectores permanentes. Eles são fixados nas entradas e saídas dos dispositivos, utilizando cianoacrilato como adesivo.

2.1.2 - Tratamento dos eletrodos flexíveis de carbono

As fibras flexíveis de carbono (FFC) foram obtidas na forma de tecido de carbono (PWB-3, Stackpole, USA) e utilizadas nos dispositivos como eletrodos para medidas eletroquímicas. Elas foram selecionadas no tecido de carbono de modo a configurar os eletrodos flexíveis internos no dispositivo microfluídico. Os eletrodos de carbono são resistentes ao estiramento e à flexão (Figura 20a), reduzindo os riscos de ruptura e, portanto, a sua inutilização. Esses eletrodos foram previamente tratados com uma solução de 464,0 mg de ácido sulfúrico (H_2SO_4) em 1,0 mol.L⁻¹ de permanganato de potássio (KMnO_4) conforme descrito por Kovtyukhova e colaboradores [79]. Cerca de 500,0 mg de fibras de carbono foram imersos em 120,0 mL da solução de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$, sob banho ultrassônico, durante 3 horas. Finalmente, as fibras foram submetidas a um processo de lavagem utilizando ácido clorídrico (HCl) concentrado e, posteriormente, água destilada ultrapura, a fim de remover os óxidos (MnO_2) formados na superfície dos eletrodos. Após a limpeza, os eletrodos foram posicionados sobre a câmara de análise dos dispositivos (antes de fechar o dispositivo), permitindo o contato com o fluido/amostra e portanto, com as análises eletroquímicas em fluxo.

2.1.3 - Solução equimolar de Hexacianoferrato de Potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) e Hexacianoférrico de Potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$) (Fe^{2+} - Fe^{3+})

A solução equimolar de hexacianoferrato de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$ - 99%) e hexacianoférrico de potássio trihidratado ($K_4[Fe(CN)_6]$ - 99%) foi preparada em solução tampão fosfato, em concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), sendo utilizada na avaliação eletroquímica. Essa solução foi denominada como Fe^{2+} - Fe^{3+} a fim de viabilizar o uso dos termos. Os reagentes foram adquiridos na empresa Sigma-Aldrich.

2.1.4 - Solução de Hexacianoferrato de Potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$)

A solução de hexacianoferrato de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$ - 99%) foi preparada em solução tampão fosfato, em concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0); sendo utilizada nos experimentos de espectroscopia de absorção no UV-Vis.

2.2 - Técnicas de caracterização

2.2.1 - Espectroscopia de absorção no UV-Vis

Os espectrofotômetros utilizados são das marcas Jasco V-670 e Avantes (AvaLight-D(H)-S), ambos trabalham com fontes de luz de deutério-halogênio. O espectrofotômetro da Avantes possibilita o acoplamento de um módulo de fibra óptica, o que permite uma análise pontual no microdispositivo de borracha natural. Ambos operam numa faixa de 190 a 800 nm e numa razão de *scan* de 400 nm.min^{-1} .

2.2.2 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Utilizou-se um equipamento da marca Zeiss LEO 440 (detector secundário de elétrons) operando a uma voltagem de aceleração de 15.0 kV e numa distância de trabalho de 9.0 mm.

2.2.3 - Microfluídica

Uma bomba peristáltica (Millifluidica SCMD-1008) e uma bomba seringa (KDS 100) foram utilizadas para avaliar a microfluídica dos dispositivos e para promover a microfluídica das amostras nos dispositivos.

2.2.4 - Microscopia Óptica

A avaliação estrutural dos canais e janelas de análise, replicados na superfície das membranas de borracha natural, foi realizada com um equipamento da marca

Biofocus, modelo BIO1600TA-L-BI, acoplado a uma lente ocular digital, modelo MEM 1300 Digital Eyepiece.

2.2.5 - Análise Eletroquímica

O estudo eletroquímico do dispositivo foi realizado utilizando um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT204. Os eletrodos de referência e o contra-eletrodo foram ligados em curto-circuito e a velocidade de varredura foi de 50 mV.s^{-1} .

2.3 - Resultados e Discussão

2.3.1 - Avaliação estrutural do dispositivo

Canais lineares e espirais foram construídos na superfície das membranas de borracha natural, gerando quatro diferentes configurações de microdispositivos. Três diâmetros de canais lineares foram testados: $142,0 \mu\text{m}$, $327,0 \mu\text{m}$ e $715,0 \mu\text{m}$. Como misturadores de fluxo, foram introduzidos canais espirais com diâmetros médios de $665,0 \mu\text{m}$ devido à possibilidade de geração de fluxo turbulento no interior do dispositivo. Imagens de microscopia óptica de diferentes configurações dos dispositivos flexíveis de borracha natural são apresentadas na Figura 16.

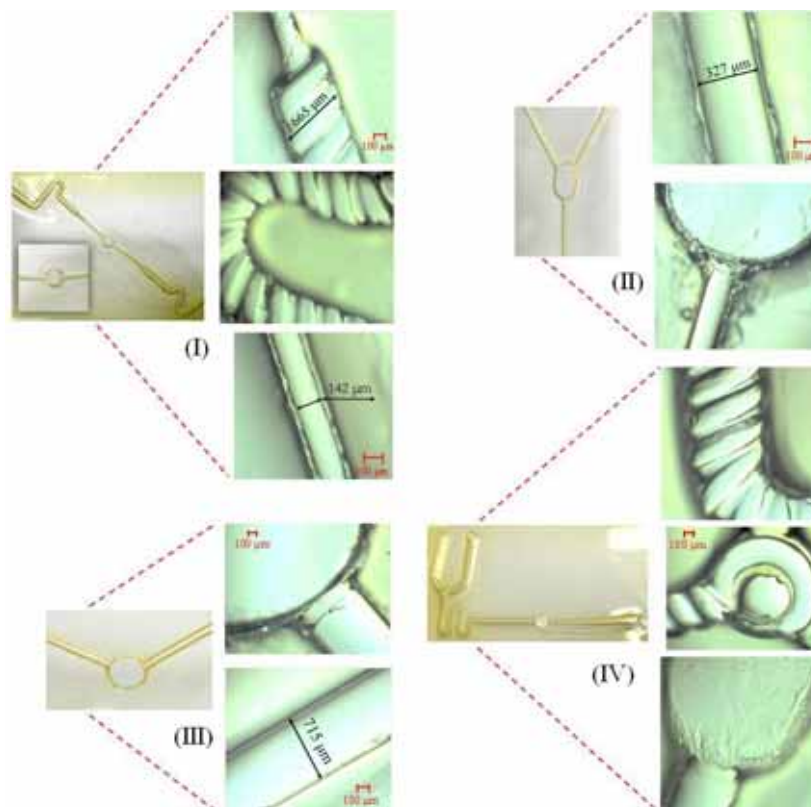


Figura 16: diferentes configurações dos microdispositivos flexíveis. Canais foram preparados em formas lineares e espirais. (I) Dispositivo preparado com canais espirais com diâmetros de cerca de $665,0\ \mu\text{m}$ que transferem o fluido de análise para um canal linear de diâmetro aproximado de $142,0\ \mu\text{m}$, conduzindo à janela de análise de $0,2\ \text{mm}$. (II) Dispositivo constituído de canais lineares com diâmetro médio de $327,0\ \mu\text{m}$ e câmara de análise com espessura de $0,6\ \text{mm}$ (III) Dispositivo constituído de canais lineares com diâmetro médio de $715,0\ \mu\text{m}$ e janela de análise de $1,0\ \text{mm}$ de espessura (IV) Dispositivo preparado com canais espirais com diâmetros aproximados de $665,0\ \mu\text{m}$, designados a funcionar como misturador, transferindo os fluidos de análise para um canal linear de diâmetro médio de $715,0\ \mu\text{m}$. Essa configuração possui uma janela de análise de $0,7\ \text{mm}$ de espessura.

2.3.2 - Avaliação microfluídica do dispositivo

A avaliação microfluídica do dispositivo foi realizada por meio de medidas de vazão ($\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$) em função do tempo de trabalho do dispositivo de configuração I (inset) (Figura 17). Vazões de entrada de $8,0$ e $80,0\ \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ foram analisadas por meio de uma bomba seringa. O volume interno do dispositivo foi medido em torno de $15,0\ \mu\text{L}$.

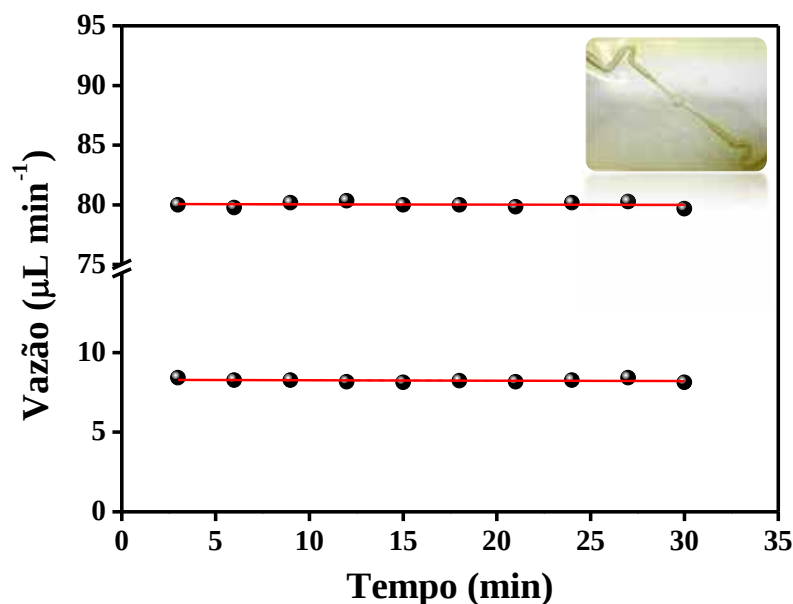


Figura 17: avaliação microfluídica do dispositivo de configuração I (inset), utilizando vazão de entrada de 8,3 e 80,0 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ (bomba seringa). Demonstra-se um fluxo contínuo, visto que o desvio dos pontos experimentais, quando comparado ao fit linear, não é considerado devido aos valores superiores dos erros associados à microbalança. O volume interno do microdispositivo é de 15,0 μL .

Os resultados, para ambos os fluxos de entrada, demonstraram que a vazão do dispositivo é contínua, *i.e.* a estrutura do microdispositivo não apresentou alterações evidentes (expansão volumétrica, absorção de água ou obstrução dos canais) para gerar mudanças consideráveis em seu fluxo interior. A microfluídica do dispositivo flexível foi avaliada em função da deformação angular das membranas de borracha natural (Figura 18).

Observa-se uma tendência decrescente no fluxo quando medido em função do aumento no ângulo de fechamento/deformação, em relação ao eixo horizontal do dispositivo (diminuindo de 90° para cerca de 2°) (Figura 18 (inset)). No entanto, quando se consideram os erros associados às medições sucessivas realizadas e os erros relacionados ao limite de medição da balança de precisão, é plausível afirmar que não há variação considerável no fluxo, *i.e.*, não há variação que desqualifique o dispositivo flexível para aplicação em fluxo contínuo.

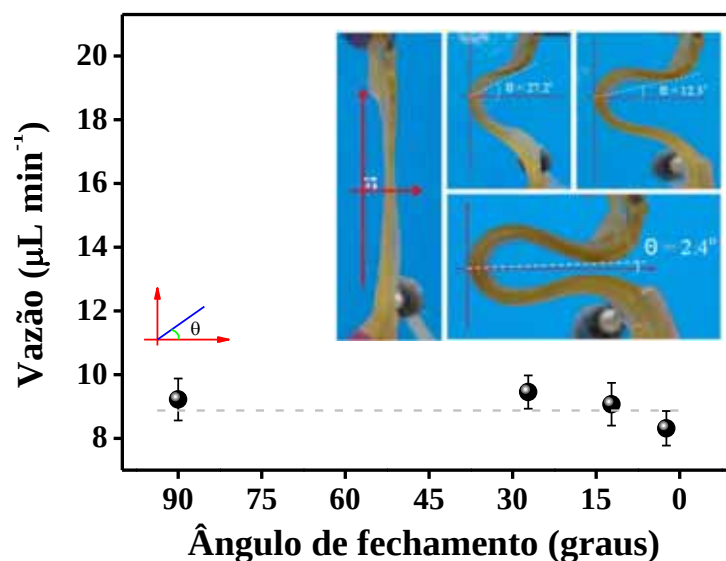


Figura 18: avaliação microfluídica dos dispositivos utilizando vazão de entrada em $9,8 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ (bomba seringa), em função da deformação angular (ângulo de fechamento) dos microdispositivos de 90° ; $27,2^\circ$; $12,3^\circ$ e $2,4^\circ$ (inset).

2.3.3 - Avaliação das propriedades ópticas do dispositivo

No intuito de desenvolver um dispositivo flexível com aplicações ópticas, testamos a configuração I (Figura 16), que apresentou a menor janela de análises, *i.e.* a menor espessura (0,2 mm), equivalente ao caminho óptico nas medidas de espectroscopia eletrônica. A avaliação espectroscópica das membranas de borracha natural demonstrou que o polímero não absorve luz na região espectral do visível, exibindo apenas uma banda de absorção em torno de 280 nm, esse fenômeno é atribuído à composição proteica do látex.

Os testes ópticos (Figura 19) foram então realizados na faixa de comprimento de onda na região do visível, utilizando a vazão de $80 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ de solução de hexacianoferrato de potássio $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, em concentração de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Os experimentos mensuraram a variação na absorção da banda em 420 nm, em função do aumento na concentração de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em fluxo contínuo (Figura 19b). O *setup* experimental é apresentado na Figura 19a (inset), posicionando o dispositivo de modo que a luz atravessasse a janela de análise contendo a solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, o que demonstrou condições favoráveis à detecção das bandas de absorção referentes ao fluido interno de análise.

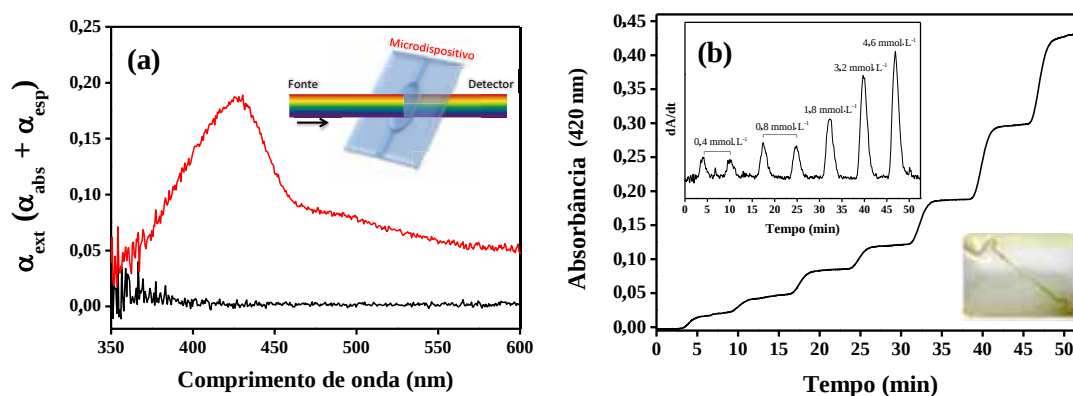


Figura 19: (a) avaliação da banda de absorção da solução de hexacianoferrato de potássio (curva em vermelho) comparada ao espectro de referência medido na janela preenchida com água. (curva em preto). O setup dos experimentos de espectroscopia (inset) demonstra a luz passando através da janela de análise do dispositivo utilizando o módulo de fibra óptica acoplado (Equipamento Avantes - AvaLight-D(H)-S). (b) Absorbância de $K_3[Fe(CN)_6]$ em função do aumento na concentração injetada no dispositivo; primeira derivada da curva de cinética da solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ em fluxo (inset). Injeções sucessivas nas concentrações de 0,4; 0,4; 0,8; 0,8; 1,8; 3,2 e 4,6 mmol.L⁻¹ foram realizadas (Jasco espectrômetro, modelo V-670).

Cada injeção de solução de $K_3[Fe(CN)_6]$, gera crescimento na concentração, propiciando observar um aumento na absorção em relação à *baseline*. Nos compostos $[Fe(CN)_6]^{3-}$, os átomos de Fe têm configuração d^5 , permitindo a transferência de carga proveniente do ligante de campo forte (CN^-) para o metal. Portanto, a banda em torno de 420 nm no espectro eletrônico para solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ é associada à transferência de carga do ligante para o metal. Esse fenômeno de transferência de carga é comumente observado na região eletrônica, no nível t_{2g} , para metais de transição [80,81]. Além disso, a cada aumento na concentração de $K_3[Fe(CN)_6]$ em fluxo, picos de absorção com intensidades relativas similares são observados (Figura 19b), comprovando a reprodutibilidade dos resultados. Esse fato corrobora a afirmação de que a solução não foi absorvida pelas paredes internas da janela de análise, demonstrando que os dispositivos flexíveis de borracha natural podem ser implementados como sensores microfluídicos baseados em medidas ópticas.

2.3.4 - Aplicação do microdispositivo em estudos eletroquímicos

Antes de implementar as fibras flexíveis de carbono como eletrodos nos dispositivos, avaliou-se a flexibilidade dos eletrodos, manipulando uma única fibra, bem como um conjunto de fibras, por meio da formação de nós, estudados por microscopia óptica (Figura 20).

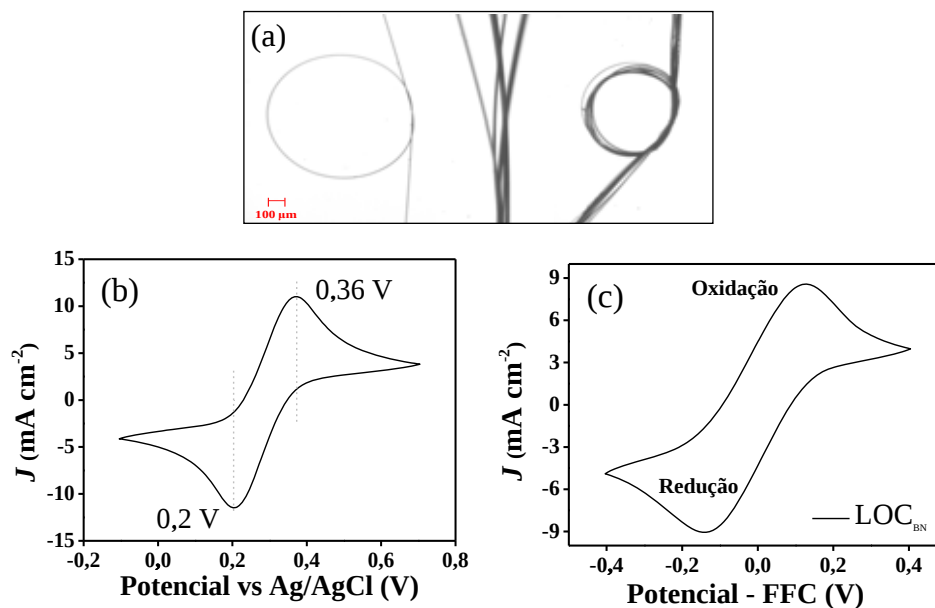
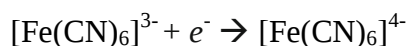


Figura 20: (a) Imagens de microscopia óptica apresentando a flexibilidade de diferentes configurações de fibras de carbono flexível. (b-c) Avaliação do processo redox para solução de (Fe^{2+} - Fe^{3+}) sem fluxo (medição estática). O eletrólito suporte utilizado foi solução tampão fosfato, pH 7,0. (b) Voltametria cíclica utilizando $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$ como eletrodo de referência e fibras flexíveis de carbono como eletrodos de trabalho e contra-eletrodo. (C) Voltametria cíclica utilizando apenas fibras flexíveis de carbono como eletrodo de trabalho e contra-eletrodo em curto-circuito com o eletrodo de referência. Velocidade de Varredura de 100 mV.s^{-1} .

Os eletrodos de carbono apresentam alta condutividade e alta resistência à tração (tensão aplicada paralelamente ao comprimento das fibras), fatos que qualificam a implementação dos eletrodos no microdispositivo flexível, pois minimizam a possibilidade de ruptura dos eletrodos durante solicitações mecânicas as quais se submetem os dispositivos *lab-on-a-chip*.

A Figura 20b apresenta a curva de voltametria cíclica, proveniente de solução de Fe^{2+} - Fe^{3+} , utilizando Ag/AgCl como eletrodo de referência e fibras de carbono como eletrodos de trabalho e contra eletrodo. Dois picos, observados em 0,2 V e 0,36 V, são associados ao processo redox, como exposto abaixo:



Quando foram testados os eletrodos de trabalho e referência empregando apenas fibras de carbono (Figura 20c), *i.e.*, sem o eletrodo de Ag/AgCl e utilizando o eletrodo de referência e o contra eletrodo em curto-circuito, notou-se um deslocamento

nos picos, atribuído ao processo redox, em -0,14 V e 0,13 V, respectivamente.

A fim de avaliar a aplicação do dispositivo como sensor eletroquímico, os eletrodos foram inseridos nos dispositivos flexíveis, utilizando a configuração IV (Figura 16). Estudou-se a cinética de reação de Fe^{2+} - Fe^{3+} em função do aumento da concentração em fluxo (Figura 21).

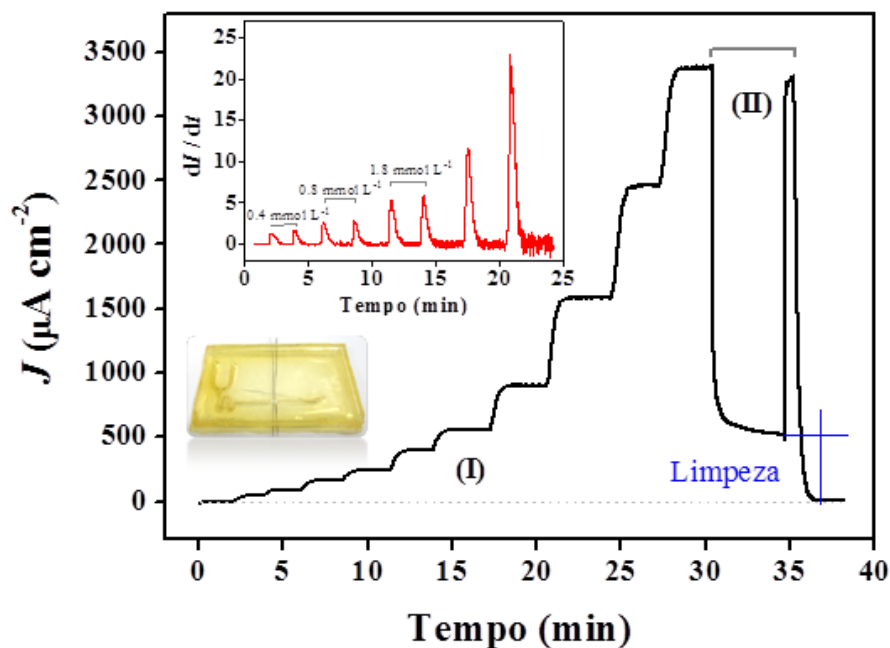


Figura 21: análises por cronoamperometria do dispositivo microfluídico em função da concentração de Fe^{2+} - Fe^{3+} . Potencial aplicado em 0,2 V. (inset) primeira derivada da curva amperométrica, a fim de avaliar o aumento proporcional nas concentrações de Fe^{2+} - Fe^{3+} em fluxo. Sucessivas injeções foram realizadas em concentrações de: 0,4; 0,4; 0,8; 0,8; 1,8; 1,8; 3,5; 6,5; 8,3 e 9,7 mmol.L⁻¹. O dispositivo utilizado foi de configuração IV (inset), avaliado em vazão de 670 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ com bomba peristáltica.

Os testes eletroquímicos foram realizados em função da concentração da solução de Fe^{2+} - Fe^{3+} , aumentada em proporções iguais a 0,4; 0,8 e 1,8 mmol.L⁻¹ (Figura 21). A medida de variação na corrente (dI/dt) responde atingindo o mesmo nível de intensidade relativa quando é ampliada em proporções iguais à concentração em solução. Esses resultados demonstraram a especificidade (calibração) do dispositivo, bem como a reprodutibilidade no desempenho dos eletrodos de carbono.

A cinética de reação foi avaliada em função do aumento na concentração de Fe^{2+} - Fe^{3+} de 0,4 até 34,2 mmol.L⁻¹ (considerando a concentração final após cada injeção), observando a resposta do sensor, que atingiu densidades de corrente de 49 até 3392,0 $\mu\text{A}.\text{cm}^{-2}$, respectivamente.

Durante o segundo estágio do teste (II), apresentado na Figura 21, a bomba

peristáltica foi brevemente desligada e uma solução de tampão fosfato (pH 7,0) foi inserida no dispositivo para realizar a limpeza do sistema (ligando a bomba peristáltica novamente). Após o início do fluxo contendo a solução para limpeza, a densidade de corrente atingiu novamente os níveis anteriormente observados ($3370,0 \mu\text{A.cm}^{-2}$), o que pode ser atribuído ao volume de solução ainda presente dentro dos canais, janela de análise e tubos de conexão. Além disso, menos de 2 minutos foram suficientes para que o sistema fosse limpo, revertendo-o à condição inicial, ou seja, sem o acúmulo de espécies de análise, associado à densidade de corrente que assume valores próximos a zero, o que comprova a reversibilidade do sistema de sensoriamento.

A fim de determinar a estabilidade do dispositivo quando submetido a testes prolongados e sob vazão de fluxo alta ($670 \mu\text{L.min}^{-1}$), a avaliação por cronoamperometria foi realizada para sucessivos aumentos na concentração de Fe^{2+} - Fe^{3+} em fluxo (Figura 22).

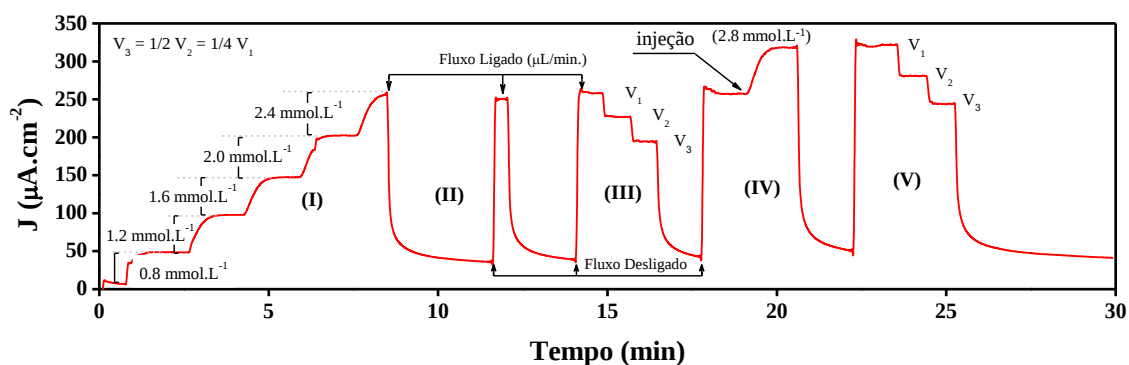


Figura 22: análise da densidade de corrente em função do tempo de funcionamento do dispositivo. (I) Avaliação de diferentes concentrações de Fe^{2+} - Fe^{3+} , entre 0,8 e 2,4 mmol.L^{-1} (concentração inicial de 0,4 mmol.L^{-1}). (II) Avaliação da influência do fluxo sobre o comportamento do dispositivo depois de a densidade de corrente de 250 $\mu\text{A.cm}^{-2}$ ser atingida no primeiro estágio. (III) Avaliação de diferentes velocidades de fluxo de injeção: $V_1 = 670 \mu\text{L.min}^{-1}$, $V_2 = 335 \mu\text{L.min}^{-1}$, $V_3 = 167,5 \mu\text{L.min}^{-1}$. (IV) e (V) Testes de reversibilidade do sistema repetindo as análises descritas nos estágios iniciais (I) - (III).

No primeiro estágio (I), foi avaliada a reprodutibilidade na operação do sensor, aumentando a concentração de Fe^{2+} - Fe^{3+} em duplicatas, atingindo intensidades relativas similares, *i.e.*, sem espécies (reduzidas/oxidadas) sobre a superfície dos eletrodos. Além disso, o sensor flexível exibiu uma velocidade de resposta satisfatória, alcançando a densidade de corrente de estado estacionário imediatamente após cada mudança na concentração de Fe^{2+} - Fe^{3+} em solução.

O segundo estágio da curva de cronoamperometria demonstrou a reversibilidade do dispositivo. Durante essa fase, a bomba peristáltica foi desligada a

fim de avaliar a resposta dos eletrodos de carbono que, por sua vez, exibem a diminuição da densidade de corrente, como se espera em testes de cronoamperometria (estáticos). Quando o fluxo foi novamente ativado, a densidade de corrente retornou a nível similar atingido no estágio anterior. Como complemento, diferentes velocidades de fluxo (vazão) foram testadas, variando apenas a intensidade relativa de densidade de corrente e, portanto, sem alterar as características eletroquímicas do sistema (estágio III). Variações posteriores na concentração em fluxo demonstraram que, mesmo após cíclicos testes, os eletrodos continuaram funcionando como o esperado (estágios IV e V). A resiliência do sistema é notada como resultado de numerosos testes realizados em um breve intervalo de tempo (cerca de 25 min.) e sob alta vazão ($670 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$).

Os resultados apresentados neste capítulo estão publicados no artigo: CABRERA F. C., SOUZA J. C. P., JOB A. E., CRESPILO F. N. (2014) Natural-rubber-based flexible microfluidic device. *RSC Advances: an international journal to further the chemical sciences*, V. 4, p. 35467-35475.

CAPÍTULO 3 - Aplicação do microdispositivo flexível na síntese de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$

Introdução

A tecnologia microfluídica implementada pelo uso de microreatores, designados para a síntese de nanomateriais, tem atraído atenção, principalmente por proporcionar eficiência de mistura. Desse modo, reduz-se o tempo de difusão das espécies químicas acelerando a reação nas sínteses. Além disso, novos parâmetros são adicionados à rota de síntese, como a velocidade de fluxo, a sequência de adição de reagentes ou o ambiente de reação controlado, possibilitando assim um maior controle sobre a reação e, conseqüentemente, sobre a morfologia das nanoestruturas sintetizadas [82,83]. Essas características conduzem pesquisas envolvendo dispositivos em microescala para a preparação de nanopartículas de óxido de ferro, o que promove sínteses de fluxo contínuo, baixa polidispersão e reprodutibilidade de morfologias das nanoestruturas sintetizadas [84,85,86].

Paralelo ao crescimento da nanociência, uma grande demanda de estruturas de óxidos de ferro modificadas, utilizando platina (Pt) [87], por exemplo, tem sido implementada na construção de células a combustível, assim como as partículas modificadas com carbono (C) [88], que são designadas à preparação de anodos para baterias de lítio, bem como as estruturas modificadas com ouro-prata (AuAg) na forma *alloy core shell* [89], que são desenvolvidas para uso em estudos relacionados a fenômenos de ampliação de superfície em espectroscopia Raman (Surface Enhanced Raman Spectroscopy – SERS). Outras configurações de nanoestruturas preparadas com óxidos de ferro são reportadas pela utilização de sílica (SiO_2) [90], sendo aplicadas em sistemas de liberação controlada de drogas, além de compostos contendo prata (Ag) [91], que são implementados no desenvolvimento de fototerapias.

Recentemente, pesquisas sistemáticas envolvendo o uso de nanoestruturas de óxido de ferro modificadas com nanopartículas de ouro têm mencionado aplicações como imunossensores [92], SERS [93], bem como agentes de contraste para diagnósticos por imagem [94,95] e ablação fototérmica de células cancerígenas [96].

Nos capítulos iniciais desta tese, introduziu-se os conceitos de propriedades e *design* de microdispositivos flexíveis de borracha natural. Neste capítulo, a fabricação de microdispositivos foi ampliada, possibilitando o fluxo em três dimensões e apresentando geometrias mais sofisticadas, que foram implementadas na síntese de nanopartículas de magnetita decoradas com ouro ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$).

3.1 - Materiais e Métodos

3.1.1 - Reagentes

O cloreto férrico hexahidratado 99% ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), o cloreto de ferro tetra hidratado 99% ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), o hidróxido de sódio 98% (NaOH), o ácido clorídrico 37% (HCl), o ácido tetracloroáurico tri hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) e o borohidreto de sódio (BH_4Na) foram adquiridos com a empresa Sigma-Aldrich. Todas as soluções/suspensões utilizadas para a síntese de nanopartículas foram preparadas com água ultrapura deionizada.

3.1.2 - Técnicas de caracterização

Neste capítulo, utilizou-se os equipamentos listados no capítulo 2. Dentre eles estão: a bomba seringa, utilizada para geração do fluxo interno; os espectrofotômetros UV-Vis; o microscópio eletrônico de varredura (MEV) e o microscópio óptico.

3.1.2.1 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas de Fe_3O_4 -Au foram obtidas utilizando um equipamento FEI Tecnai G2 F20, operando a 200 kV. As medidas foram realizadas com o depósito (*dropping*) da suspensão de partículas sobre uma grade suporte de carbono/cobre com 300 mesh, que foi adquirida na empresa *Electron Microscopy Science*.

3.2 - Resultados e Discussão

3.2.1 - Síntese de nanopartículas de Fe_3O_4

As nanopartículas de Fe_3O_4 foram sintetizadas por meio do método descrito por Santos e colaboradores [97]. Desta forma, 5,4 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 2,0 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidos em 25 mL de uma solução de 10 mmol L^{-1} de HCl , e então 250 mL de uma solução de 1,5 mol L^{-1} de hidróxido de sódio (NaOH) foram adicionados a essa primeira solução contendo os sais de cloreto de ferro. Essa mistura foi produzida sob vigorosa agitação (20 rpm) na temperatura de 80 °C, em atmosfera de nitrogênio (N_2). A suspensão de nanopartículas de Fe_3O_4 foi separada magneticamente e redispersa em água, como processo de lavagem, até atingir o pH de 6,4.

Após a realização do processo de lavagem, uma suspensão de nanopartículas de Fe_3O_4 (0,42 mg mL^{-1}) foi obtida em 0,01 mol L^{-1} de HCl . As nanopartículas adquiridas apresentam formas cúbicas de tamanhos em torno de 10,4 nm (levando em

consideração a distribuição de tamanhos em função do número de partículas mensurados para cada tamanho), conforme avaliado por meio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 23).

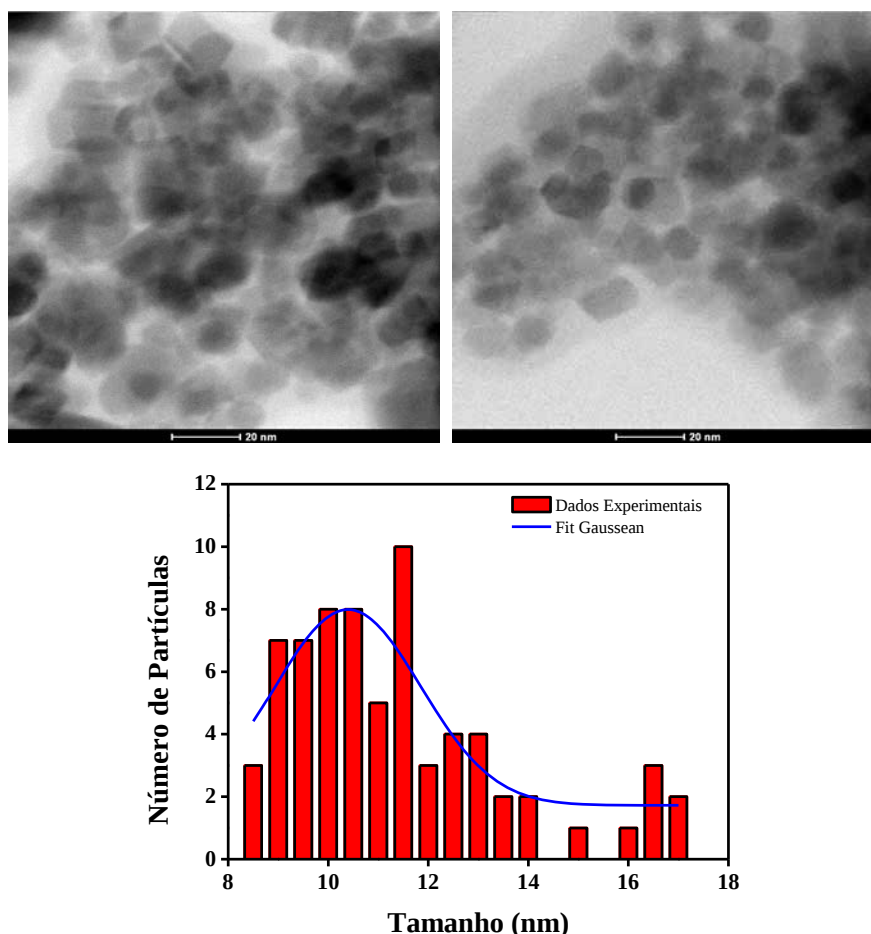


Figura 23: microscopia eletrônica de transmissão (MET) de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) com tamanhos em torno de 10,4 nm. Histograma de distribuição dos tamanhos de nanopartículas medidos com o programa ImageJ.

Para obter as nanopartículas de Fe_3O_4 decoradas com nanopartículas de ouro (AuNPs), alíquotas da suspensão estoque de Fe_3O_4 , nos volumes de 50, 100, 150, 200 e 300 μL , receberam adição de água a fim de atingir um volume final de 1,0 mL para cada alíquota, ou seja, concentrações de 0,021; 0,042; 0,063; 0,084 e 0,126 mg.mL^{-1} , respectivamente. Após a preparação das alíquotas, cada amostra foi submetida à decantação por ação de campo magnético durante 2,0 minutos, separando as nanopartículas e descartando o sobrenadante. Esse processo foi realizado para lavar as nanopartículas, *i.e.*, retirar o excesso de ácido clorídrico contido nas amostras. Por fim, cada alíquota de nanopartículas de Fe_3O_4 , separadas magneticamente, foi redispersa em 1,0 mL de água. O processo de síntese de nanopartículas é descrito na Figura 24.

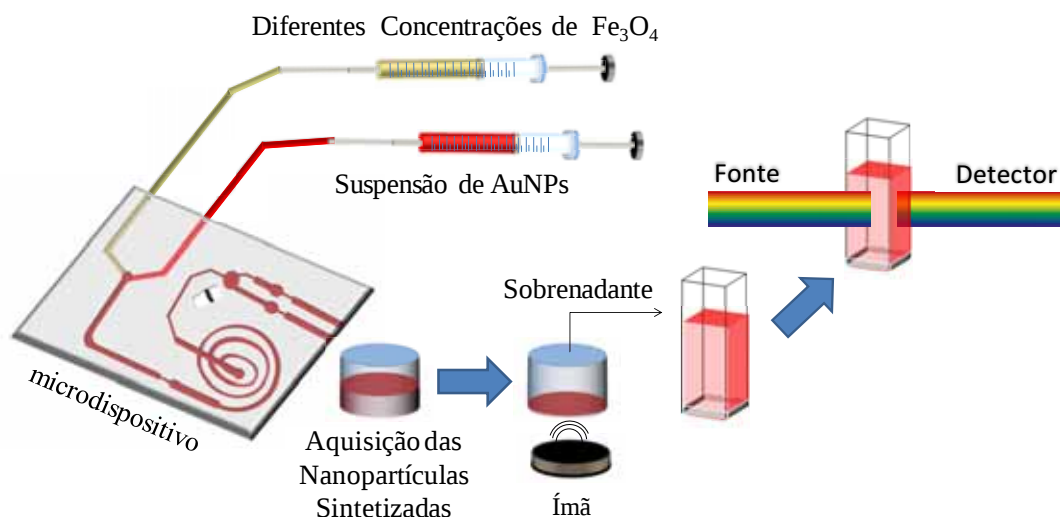


Figura 24: metodologia utilizada para a síntese microfluídica de nanopartículas de Fe_3O_4 -AuNPs e para a avaliação da eficiência das sínteses de nanopartículas decoradas, ambas realizadas por meio de espectroscopia UV-Vis.

3.2.2 - Síntese de nanopartículas de ouro

O estudo da cinética de formação das nanopartículas de ouro, realizado por meio de espectroscopia de absorção no UV-Vis, é apresentado na Figura 25. As nanopartículas de ouro foram sintetizadas conforme o estudo de Martin e colaboradores [98]. Para tanto, uma alíquota de 10 μL , proveniente da solução estoque de 50 mmol.L^{-1} de $\text{AuCl}_4^-/\text{H}^+$ (Figura 25a), foi adicionada a 960 μL de água e, posteriormente, a 30 μL da solução de agente redutor $\text{BH}_4^-/\text{OH}^-$, na concentração de 50 mmol.L^{-1} , obtendo assim um volume final de 1,0 mL de nanopartículas de ouro (suspensão). As nanopartículas de ouro sintetizadas (suspensão estoque) possuem formato esférico, com tamanhos médios de 3,9 nm, como apresentado na Figura 26.

A cinética de redução das nanopartículas de ouro é avaliada em função do tempo de reação após a adição do agente redutor. Um aumento na intensidade das bandas de absorção é notado até 26 minutos após o início da reação, bem como o deslocamento no comprimento de onda das bandas de absorção (*red shift*), atribuído à nucleação e ao crescimento das nanopartículas de ouro. No entanto, após 26 minutos, observa-se a redução na intensidade das bandas de absorção, paralelamente ao deslocamento da banda de absorção para menores comprimentos de onda (*blue shift*), que é associado à redução na dispersão de tamanhos de partículas em suspensão, atingindo menor energia de superfície.

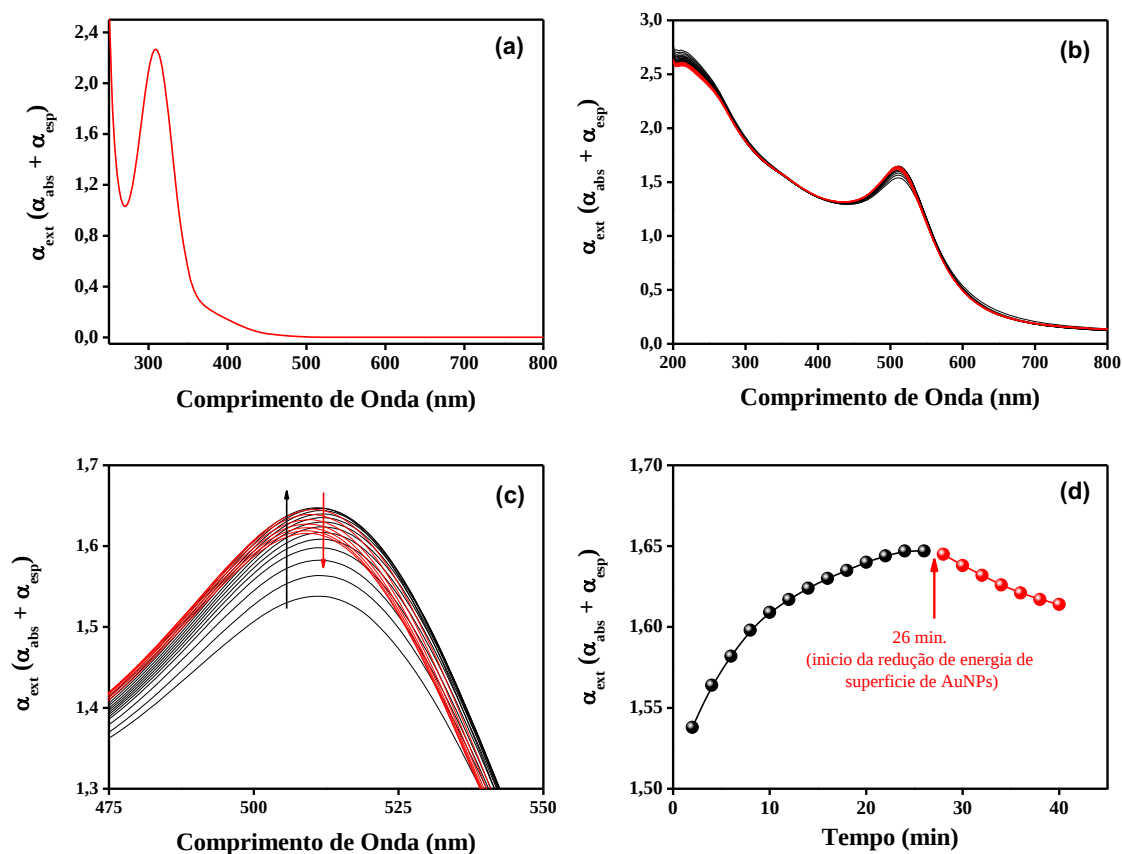


Figura 25: (a) Espectro de absorção de solução de ácido cloroáurico (HAuCl_4), concentração de $0,51 \text{ mmol.L}^{-1}$ (b) Cinética de crescimento de nanopartículas de ouro. De 0 a 26 minutos, o aumento da absorção é atribuído à formação de nanopartículas (curvas em preto). De 26 a 40 minutos, a redução na intensidade de absorção é atribuída à formação de agregados de nanopartículas (curvas em vermelho) (c) Ampliação da banda de absorção das nanopartículas de ouro (d) Gráfico da cinética de crescimento, aumento na absorção vs. tempo de reação.

Na literatura, as nanopartículas de ouro são descritas por possuírem alta energia de superfície [99,100], comumente associada ao tamanho da partícula, *i.e.* a energia de superfície aumenta em função da redução no tamanho da partícula [101]. Portanto, atribui-se o processo de decoração das nanopartículas de ouro na superfície das nanopartículas de Fe_3O_4 a um fenômeno de adsorção física, causado pela alta energia na superfície das nanopartículas de ouro.

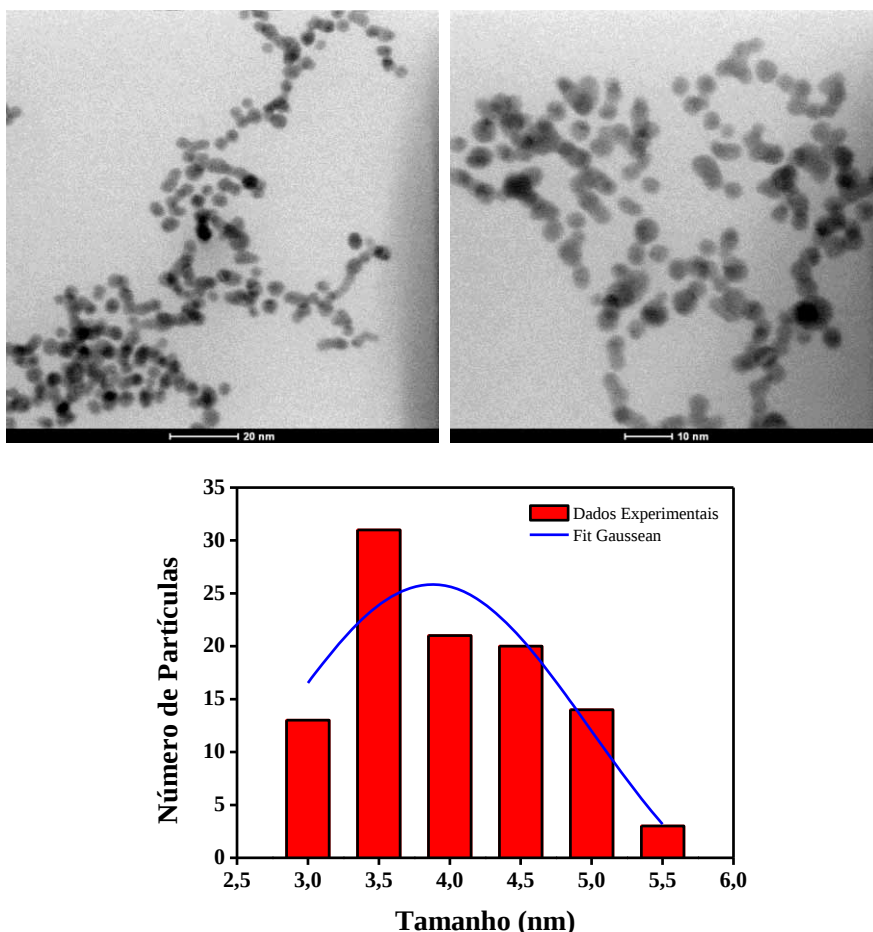


Figura 26: microscopia eletrônica de varredura (MEV) de nanopartículas de ouro (Au), com tamanhos em torno de 3,9 nm. Histograma de distribuição dos tamanhos de nanopartículas medidos com o programa ImageJ.

3.2.3 - Construção do dispositivo

A construção do dispositivo segue o mesmo protocolo descrito no item 1.2.3, utilizando o método de “casting” do látex e modificando apenas a configuração do molde do dispositivo (Figura 27). Além disso, o dispositivo empregado na síntese de nanopartículas de magnetita decoradas apresenta a combinação de três membranas de borracha natural, possibilitando o fluxo entre as camadas, *i.e.* o dispositivo foi melhorado para fluídica em três dimensões.



Figura 27: apresentação dos moldes preparados em acrílico, utilizando cilindros metálicos a fim de configurar os canais empregados na preparação dos dispositivos de borracha natural.

A Figura 28 apresenta o esquema do dispositivo microfluídico construído em três camadas. A primeira camada inclui duas portas de entrada de fluxo, conduzindo as amostras para serem misturadas nos canais que contêm morfologia interna em espiral. (Figura 29a). A mistura entre os fluxos provenientes das duas portas de entrada, *i.e.* entre a suspensão de ouro e a suspensão de nanopartículas de Fe_3O_4 , é conduzida por meio de uma microválvula, forçando a mistura até preencher completamente o canal. Cateteres foram inseridos nas portas de entrada dos dispositivos, configurando conectores permanentes. Após a mistura das amostras em fluxo, o fluido atinge o reator *snail* (Figura 29b), onde a reação química se completa. Uma membrana de borracha natural com espessura de 0,5 mm, que contenha apenas a configuração do sistema de separação magnética (suporte para imã) e um furo para a condução do fluxo da primeira para a terceira camada, é representada na segunda camada da Figura 28. O látex é utilizado como adesivo e para cada camada adicionada, o processo de tratamento térmico a 65 °C durante 2 horas é realizado.

Na terceira camada (Figura 28), o sistema de separação magnética é introduzido, de modo que um imã com dimensões de 2,0 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura é inserido na câmara construída no dispositivo (Figura 29). Esse imã (Neodímio Ferro Boro - especificação N35 – adquirido com a MagTek Ltda.) pode ser movimentado manualmente mesmo após o fechamento do dispositivo, utilizando um contato metálico sobre a superfície da membrana de borracha natural, . A aproximação do imã do reservatório de formato *donut* (Figura 29c) possibilita o processo de separação magnética das partículas em fluxo. O formato do reservatório foi escolhido com base nos estudos realizados por Garcia e colaboradores [102], que pesquisaram os efeitos de vórtices locais em diferentes geometrias de reservatórios, demonstrando que o formato *donut* favorece a separação de nanopartículas em microfluídica.

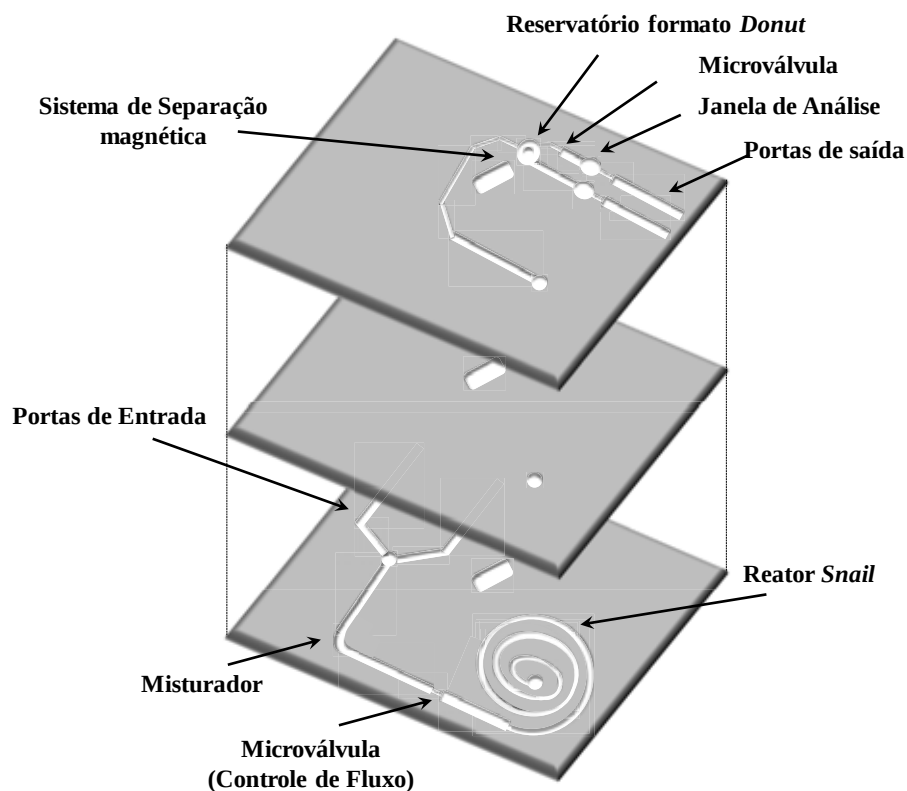


Figura 28: esquema da estrutura do dispositivo construído em três camadas de membranas de borracha natural. A primeira camada inclui canais com morfologia interna em espiral, auxiliando na mistura das amostras em fluxo. O fluxo no misturador é controlado por uma válvula passiva posicionada no final do canal. Após a mistura, o fluido atinge o reator snail, onde a reação é completa, fluindo através da segunda camada até o sistema de separação magnética interna. O ímã é posicionado, possibilitando a aproximação do reservatório de formato donut a fim de atrair as partículas em suspensão. Dois canais são construídos em contato com o reservatório, de modo que a amostra preencha, em períodos diferentes, um e outro canal, atingindo as janelas de análise.

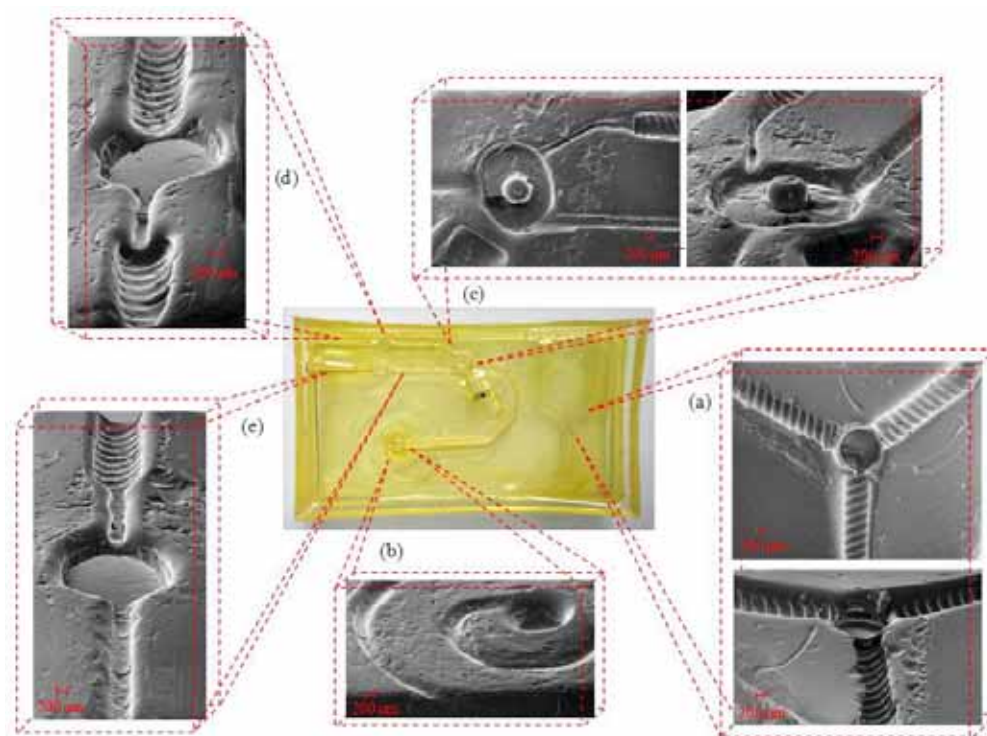


Figura 29: (a) Sistema misturador posicionado na junção entre as portas de entrada, contendo morfologia interna espiral. (b) Reator snail, fase de reação no dispositivo. (c) Sistema de separação magnética interna. O ímã é posicionado, possibilitando a aproximação do reservatório de formato donut a fim de atrair as partículas em suspensão. (d-e) Dois canais são construídos em contato com o reservatório, de modo que a amostra preencha, em períodos diferentes, um e outro canal, atingindo as janelas de análise.

Durante o processo de separação magnética, a válvula passiva (Figura 29d), posicionada entre o canal e o reservatório *donut*, certifica que o fluido preencha primeiramente a janela inferior (Figura 29e). Esse método possibilita a configuração de uma linha de base entre as duas janelas de análise durante o processo de separação magnética.

3.2.4 - Avaliação microfluídica do dispositivo

O comportamento do fluxo no dispositivo flexível foi avaliado em função da deformação angular das membranas de borracha natural (Figura 30).

Novamente, assim como avaliado para os dispositivos de fluxo bidimensional, uma tendência decrescente no fluxo é medida em função do aumento no ângulo de fechamento do dispositivo considerando o eixo horizontal, que diminui de 90° para cerca de 0° (Figura 30 (*inset*)). A variação no fluxo mensurado no dispositivo não é relevante quando são considerados os erros associados tanto às medições sucessivas, quanto aos erros relacionados ao limite de medição da balança de precisão.

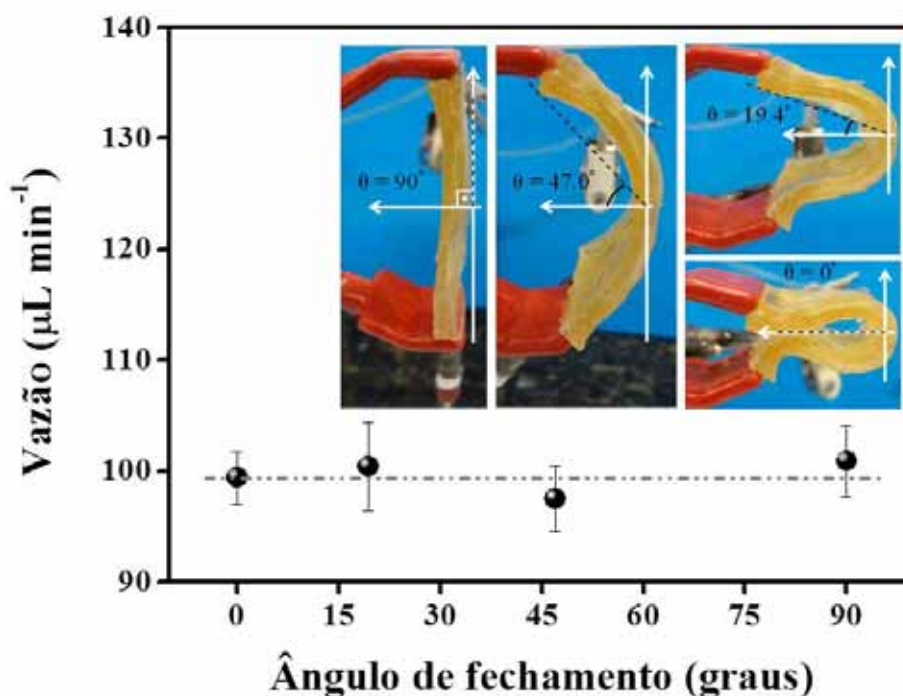


Figura 30: avaliação microfluídica dos dispositivos utilizando vazão de entrada em $100,0 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ (bomba seringa), em função da deformação angular (ângulo de fechamento) dos microdispositivos de 90° , 47° , $19,4^\circ$ e 0° (inset).

3.2.5 - Síntese de nanopartículas de Fe_3O_4 decoradas com ouro (Au)

A fim de obter as nanopartículas de Fe_3O_4 decoradas com nanopartículas de ouro, as suspensões estoque preparadas em volume de 1,0 mL (suspensão de Fe_3O_4 e suspensão de nanopartículas de ouro preparadas conforme metodologia detalhada nos itens 3.2.1 e 3.2.2) foram injetadas no dispositivo a uma vazão de $100 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. Diferentes concentrações de suspensão de nanopartículas de Fe_3O_4 foram testadas (C_1 - C_5). O volume interno do dispositivo é de aproximadamente $94,0 \mu\text{L}$ e o tempo de residência é de cerca de 1,0 minuto. A síntese foi realizada sem a agitação e sem o aquecimento. Após passar pelo dispositivo, *i.e.* a mistura microfluídica da suspensão de ouro e das suspensões de Fe_3O_4 , a suspensão de nanopartículas de magnetita decoradas com ouro foi submetida à decantação por meio de separação magnética, durante 5,0 minutos (Figura 24). A microscopia eletrônica de varredura foi escolhida para avaliar a morfologia das nanopartículas sintetizadas para as diferentes concentrações de magnetita.

A princípio, a separação magnética das partículas sintetizadas foi realizada fora do microdispositivo, *i.e.*, após a reação interna da suspensão de nanopartículas de ouro e da suspensão de nanopartículas de Fe_3O_4 . As partículas decoradas foram coletadas em *eppendorfs* e foram submetidas à decantação por ação de campo magnético (contato

com imã). Desse modo, quando o sobrenadante das amostras é avaliado, percebe-se que quanto menor a quantidade de ouro presente, maior será a quantidade de ouro que reagiu com as nanopartículas de magnetita (partículas decoradas). Esse processo foi mensurado utilizando a espectroscopia UV-Vis (Figura 31).

Na Figura 31a, observa-se o decréscimo na intensidade das bandas de absorção, relacionadas à ressonância plasmônica de superfície das nanopartículas de ouro, em função do aumento na concentração de nanopartículas de magnetita (concentrações variando de 0 a 126,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A partir da concentração de 84,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Fe_3O_4 , percebe-se que toda a composição de ouro inserida no dispositivo é consumida no processo de decoração (Figura 31b). Esse resultado pode ser atribuído à supressão das bandas plasmônicas, *i.e.*, à ausência das nanopartículas de ouro no sobrenadante.

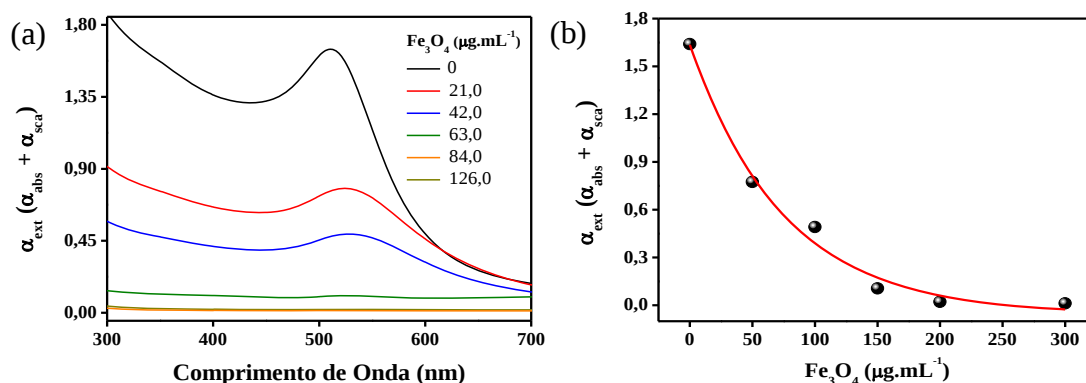


Figura 31: espectroscopia de absorção no UV-Vis do sobrenadante da suspensão de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ (decoradas), após o processo de separação magnética externa. Síntese utilizando concentrações de suspensão de nanopartículas de Fe_3O_4 entre 0 e 126,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. (b) Avaliação da intensidade da banda plasmônica de ouro em função da concentração de nanopartículas de magnetita. Síntese realizada com vazão de 100 $\mu\text{L.min}^{-1}$.

Baseado nos resultados da espectroscopia de absorção no UV-Vis, as nanopartículas sintetizadas com as concentrações de 63,0; 84,0 e 126,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Fe_3O_4 foram estudadas por meio de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 32). As partículas de ouro foram identificadas em preto (em formato esférico), e as partículas de magnetita foram identificadas nas imagens em escala de cinza.

Observa-se que a homogeneidade na distribuição ou recobrimento de nanopartículas de ouro sob as partículas de magnetita diminui em função do aumento na concentração da suspensão de Fe_3O_4 , de 63,0 a 126,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Quando são avaliadas as ampliações de imagens na Figura 32d e Figura 32f, fica evidente que algumas áreas da superfície das nanopartículas de magnetita não foram recobertas por partículas de

ouro. Dessa forma, a concentração idealizada para a síntese de magnetita decorada com nanopartículas de ouro foi definida em $63,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os tamanhos das nanopartículas de ouro que decoram as partículas de magnetita são de cerca 6,3 nm (Figura 33) para concentrações de magnetita de $63,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os tamanhos das nanopartículas de ouro apresentados no histograma, referidos na Figura 32(a-b), foram mensurados utilizando o programa ImageJ.

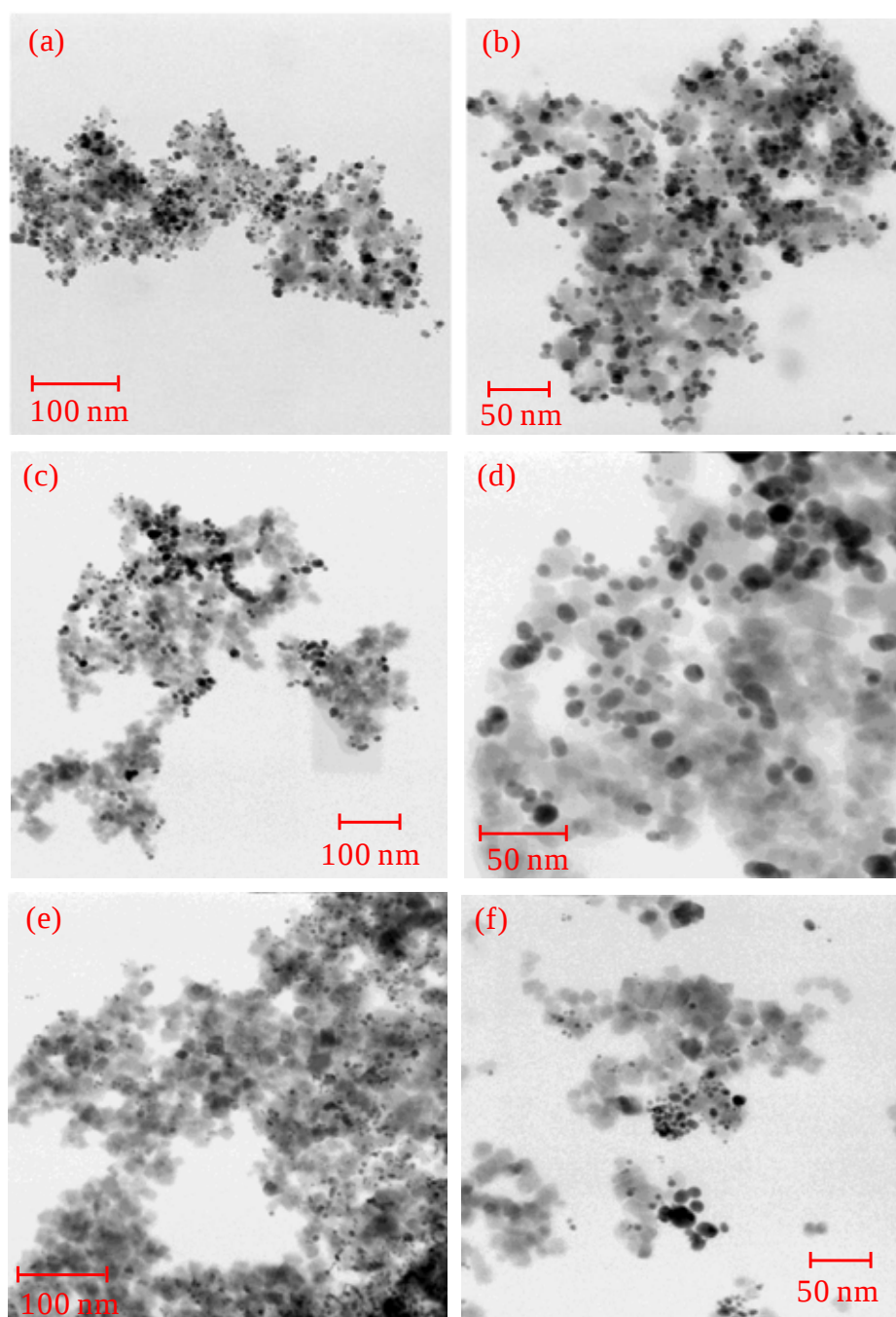


Figura 32: microscopia eletrônica de transmissão (MET) de nanopartículas de magnetita decoradas com ouro ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$). As concentrações de magnetita são de (a-b) $63,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (b-c) $84,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e (e-f) $126,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As nanopartículas de ouro foram identificadas por pontos esféricos em preto, já as nanopartículas de magnetita (em segundo plano) foram destacadas em tons de cinza.

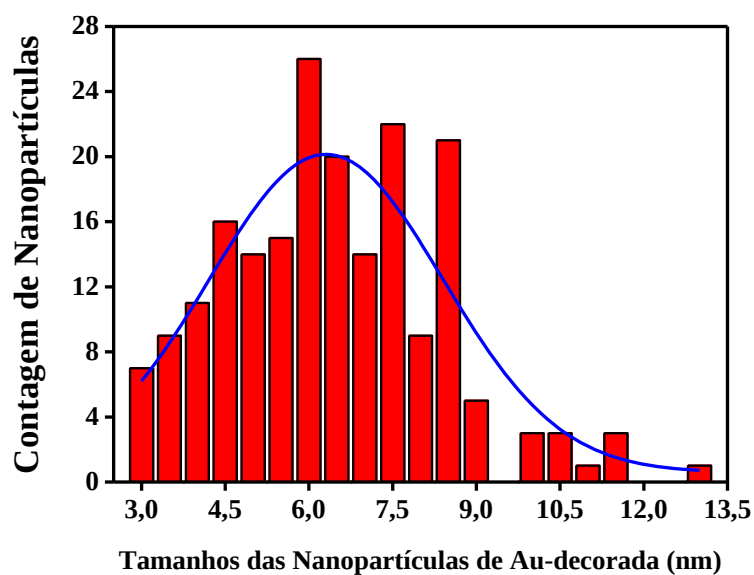


Figura 33: histograma dos tamanhos de nanopartículas de ouro decorando nanopartículas de Fe_3O_4 . Os tamanho foram mensurados utilizando o software ImageJ, referente à Figura 21(a-b). A síntese de nanopartículas decoradas foi realizada utilizando a concentração de $63,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de magnetita.

Torna-se importante destacar que foi avaliada a influência da vazão no processo de decoração de nanopartículas de Fe_3O_4 (Figura 34).

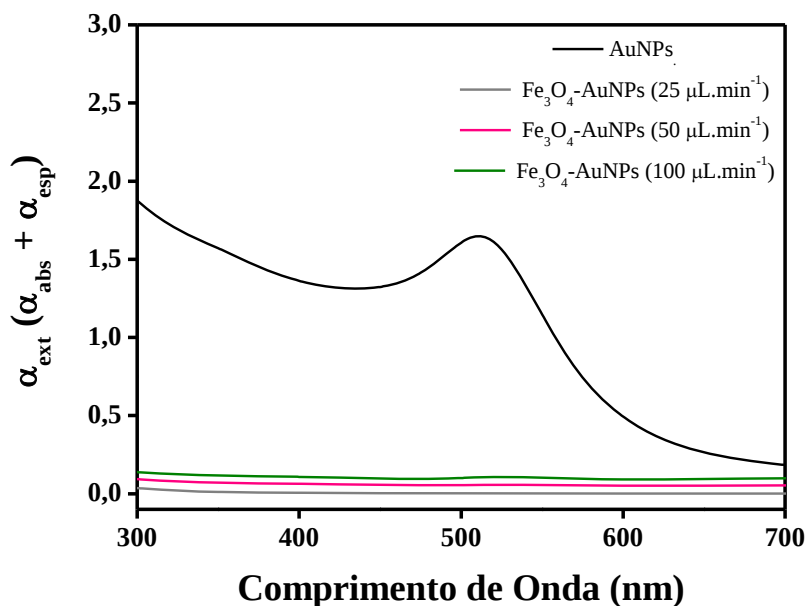


Figura 34: espectro ultravioleta-visível obtido a partir de sobrenadantes de Fe_3O_4 -AuNPs decorados com a concentração de $63,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de suspensão de Fe_3O_4 -NPs, avaliando a síntese em diferentes fluxos: 25, 50 e $100 \mu\text{L min}^{-1}$. A síntese foi avaliada em diferentes fluxos: 25, 50 e $100 \mu\text{L min}^{-1}$.

Analisou-se o fluxo definido em 25, 50 e $100 \mu\text{L.min}^{-1}$ (Figura 34), obtendo resultados similares independente da vazão. Dessa forma, a vazão a $100 \mu\text{L.min}^{-1}$ foi

utilizada a fim de maximizar o rendimento da síntese, *i.e.* a quantidade de nanopartículas decoradas que podem ser preparadas em um menor intervalo de tempo.

Demonstrou-se ainda a estabilidade das nanopartículas decoradas (Fe_3O_4 -AuNPs), *i.e.* que as nanopartículas de ouro são estáveis e não se desprendem da superfície das partículas de Fe_3O_4 -NPs. Para tanto, as nanopartículas decoradas foram submetidas à separação magnética (seis ciclos, indicados de I a VI). Para cada ciclo, a suspensão de Fe_3O_4 -AuNPs foi reinjetada no microdispositivo, em seguida, ela foi submetida à separação magnética após a coleta nas portas de saída do dispositivo, analisando o sobrenadante de cada ciclo (Figura 35).

A análise das partículas de ouro em suspensão, provenientes da dissociação da superfície das partículas decoradas, foi realizada monitorando a banda de ressonância plasmônica em 510 nm, atribuída às AuNPs. O valor de 100% de absorção é considerado para a suspensão de ouro original (solução estoque) utilizada na síntese de partículas decoradas (curva em preto), definindo a concentração máxima possível de AuNPs no sobrenadante. Observa-se que para todos os ciclos, as nanopartículas de ouro não se desprendem, atribuído devido à ausência de bandas plasmônicas quando avaliado o sobrenadante. Desta forma, assumimos que as nanopartículas de ouro ainda estejam decorando a superfície das nanopartículas de Fe_3O_4 .

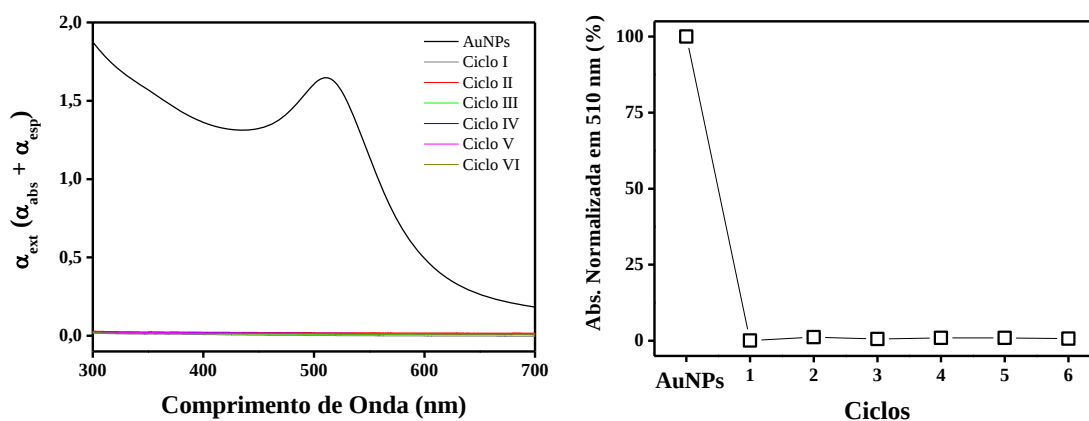


Figura 35: a) Espectro UV-Vis obtido a partir de AuNPs sintetizadas com HAuCl_4 ($0,51 \text{ mmol.L}^{-1}$) (curva em preto); Espectro obtido a partir de sobrenadantes após seis ciclos de reinjeção das partículas decoradas no microdispositivo e posterior separação magnética. b) Dados referentes à absorbância normalizada em 510 nm por ciclo, considerando 100% de absorção para a suspensão estoque de AuNPs e comparado ao sobrenadante obtido para cada ciclo de injeção e separação magnética.

3.2.6 - Avaliação do sistema de separação magnética interna

Testes envolvendo a utilização do sistema de separação interna do microdispositivo, aplicados a partículas de magnetita, são apresentados na Figura 36. A

suspensão estoque de nanopartículas de Fe_3O_4 ($0,42 \text{ mg.mL}^{-1}$) foi utilizada nos testes de separação interna nos microdispositivos de borracha natural a fim de facilitar a avaliação da efetividade do sistema proposto. A separação magnética, posterior à síntese de nanopartículas, é comumente realizada na literatura com o objetivo de retirar o excesso de reagentes ou surfactantes (por exemplo, NaOH). Ela pode ser comparada a um processo de lavagem das nanopartículas e pode ser uma aplicação para os microdispositivos apresentados nesta tese.

Na Figura 36, apresenta-se o microdispositivo vazio (Figura 36a) e preenchido com a suspensão de partículas de magnetita (Figura 36b), bem como o sistema de separação magnética desligado (*switch off*), *i.e.* o ímã está posicionado à meia distância em relação ao reservatório *donut* e ao canal de ligação com o reator *snail*. Nessa condição, as partículas não são atraídas pelo campo magnético do ímã, inserido no microdispositivo, que atua sobre as partículas conforme o ímã é aproximado do reservatório *donut*. Esse processo é descrito na Figura 36c. O ímã é inserido no dispositivo durante o processo de fechamento, de modo que a aproximação e o afastamento do ímã em relação ao reservatório são realizados utilizando qualquer acessório metálico externo.

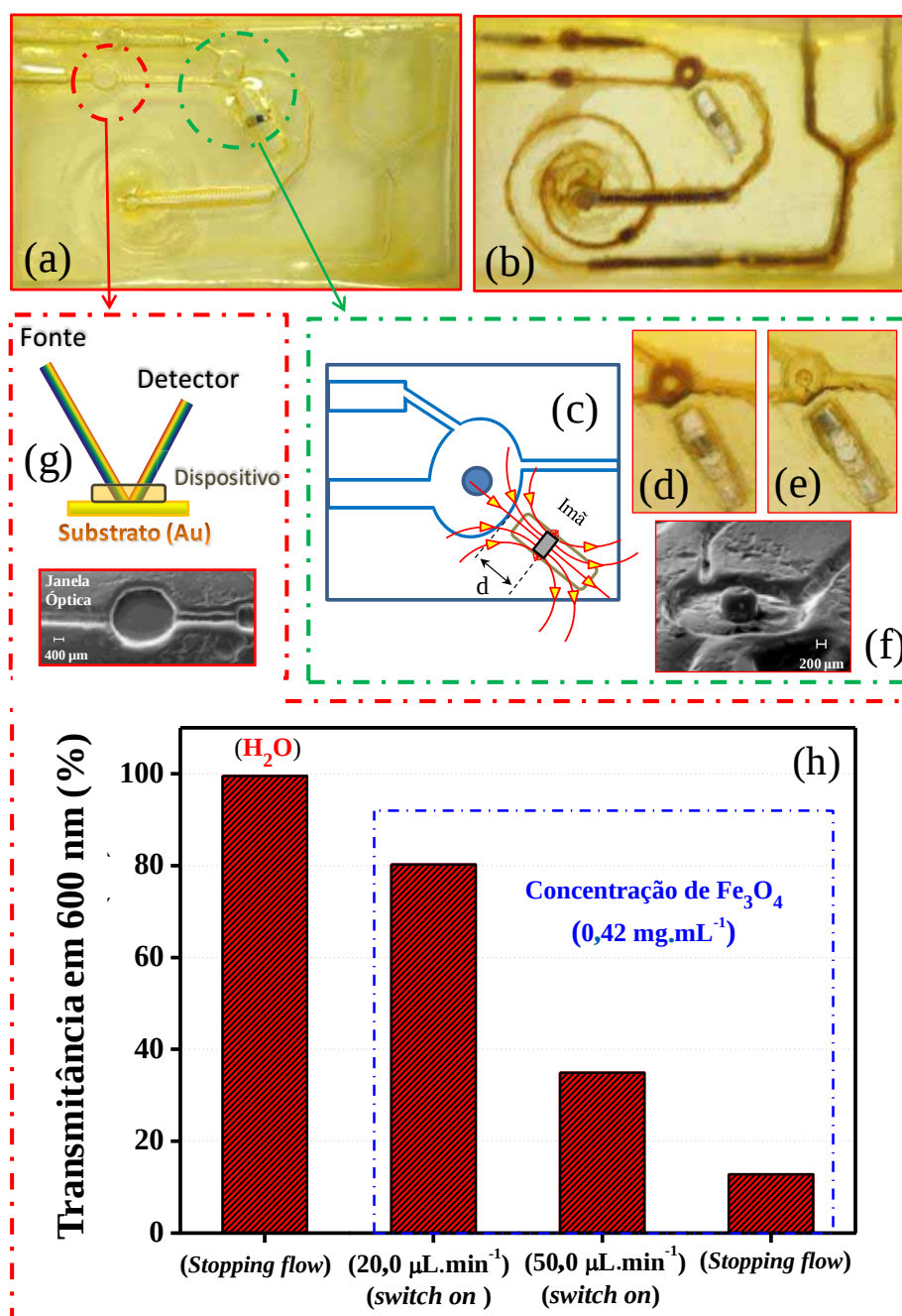


Figura 36: (a) Imagem do dispositivo de borracha natural contendo o sistema de separação magnético (b) Preenchimento do dispositivo com suspensão de Fe_3O_4 -NPs em concentração de $0,42 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (c) Esquema demonstrativo do funcionamento do sistema de separação magnética interna (d) Imagem do sistema de separação magnética interna em funcionamento à uma distância de 2,5 mm (entre o ímã e o reservatório) e (e) distância de 4,5 mm (entre o ímã e o reservatório) (f) Imagem de microscopia eletrônica de varredura apresentando a morfologia do reservatório donut (g) Esquema demonstrativo da metodologia utilizada para as análises por espectroscopia UV-Vis, de modo que o feixe de luz incidente atravessasse o microdispositivo diretamente na câmara de análises, apresentada na imagem por microscopia eletrônica de varredura. (h) Medida de transmitância em 600 nm, procedimento realizado no dispositivo (in situ) preenchido com água e suspensão de Fe_3O_4 -NPs, definindo assim os limites de transmissão, medidos sem fluxo (stopping flow), bem como a avaliação do processo de separação magnética interna, que utiliza suspensão de Fe_3O_4 -NPs em vazão de 20 e 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$.

O sistema de separação magnética é constituído de uma abertura retangular na superfície das membranas de borracha natural, feita sob molde para os imãs, possibilitando a movimentação deles e, conseqüentemente, a separação das partículas de magnetita do sobrenadante. O sistema de nanopartículas é ativado em duas condições de intensidade de separação de acordo com a redução na distância (d) entre o imã e o reservatório *donut*, apresentado na Figura 36d (distância de 4,5 mm) e na Figura 36e (distância de 2,5 mm). A morfologia do reservatório *donut* é exibida na Figura 36f, previamente desenvolvida por Garcia e colaboradores [102] para facilitar a separação das partículas.

Os testes de separação magnética em fluxo, com vazões de 20 e 50 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$, são apresentados na Figura 36h (Espectroscopia UV-Vis). As medições foram realizadas por método de reflexão do feixe, utilizando um substrato de ouro, de modo que a luz atravessasse o microdispositivo diretamente na janela de análise, conforme exposto no esquema da Figura 36g. Quando preenchido com água (*baseline*), o dispositivo apresenta cerca de 99,5% de transmitância, medida no comprimento de onda de 600 nm, definindo assim o limite máximo de transmitância através do dispositivo. O limite mínimo, ou seja, o máximo de partículas em suspensão no interior da câmara de análise (impedindo a passagem de luz), é mensurado quando a suspensão concentrada de Fe_3O_4 é utilizada, de modo que a transmitância seja reduzida para cerca de 12,8%.

Quando o fluxo interno a 50 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ é iniciado e o imã é movimentado até uma distância $d = 2,5$ mm, observa-se que o percentual de transmitância aumenta para valores a cerca de 40%, atribuídos à separação parcial das partículas em suspensão. Quando a vazão microfluídica é reduzida para 20 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$, percebe-se o aumento na transmitância para valores próximos a 80%, justificados pelo aumento no percentual de partículas atraídas pela ação do campo magnético e, portanto, diminuindo as partículas em suspensão no interior do dispositivo. O percentual de separação de 80% é considerado como efetivo no processo de separação magnética interna, implementada nos microdispositivos flexíveis.

Os resultados apresentados neste capítulo estão publicados no artigo: CABRERA F. C., MELO A. F. A. A., SOUZA J. C. P., JOB A. E., CRESPILO F.N. (2015) A flexible lab-on-a-chip for the synthesis and magnetic separation of magnetite decorated with gold nanoparticles, *Lab Chip*, DOI: 10.1039/c4lc01483a.

Conclusão

A metodologia para construção dos dispositivos microfluídicos de borracha natural (*lab-on-a-chip*), principal objetivo desta tese, foi desenvolvida com sucesso. O processo de preparação dos dispositivos é relativamente simples, de baixo custo e não requer equipamentos de difícil acesso ou conhecimentos aprofundados para a manipulação do polímero. A evolução do dispositivo é vislumbrada pelo uso de diferentes composições de látex utilizado como matéria prima. O látex pré-vulcanizado é eficiente se for requerida uma maior resistência à tração, não interferindo consideravelmente nas propriedades ópticas (percentual de transmitância). O processo de centrifugação do látex mostrou-se eficiente, reduzindo a composição de proteínas e fosfolípidios (compostos não-borracha) lixiviados em solução, bem como ampliando o grau de transmitância (atingindo cerca de 95%).

Em relação à microfluídica, o dispositivo demonstrou-se qualificado, pois não apresentou interferência considerável no fluxo quando foi submetido a deformações angulares próximas aos 360° de deflexão interna. As propriedades ópticas avaliadas demonstraram a possibilidade, tanto do uso dos dispositivos na região visível do espectro eletromagnético, quanto do uso contínuo, baseado na condição de limpeza e reprodutibilidade do sistema microfluídico. A inserção dos eletrodos flexíveis de carbono foi bem sucedida. Quando submetidos aos testes eletroquímicos, os eletrodos foram capazes de mensurar as reações redox do eletrólito, gerando um aumento na densidade de corrente como resposta, bem como apresentando curto intervalo de tempo para atingir a corrente estacionária durante os processos eletroquímicos.

Por fim o uso dos microdispositivos de borracha natural como reatores na síntese de nanopartículas decoradas de Fe_3O_4 -AuNPs foi introduzido. Partículas de magnetita decoradas com partículas de ouro de tamanhos médios de 6,3 nm foram obtidas. A concentração da suspensão de nanopartículas de $63,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Fe_3O_4 proporcionou melhores resultados em termos de homogeneidade de distribuição das nanopartículas de ouro decoradas na superfície das nanopartículas de magnetita. Além disso, a fim de possibilitar o processo de síntese interna, melhorias foram implementadas no dispositivo, o que possibilitou a microfluídica em três dimensões e, consequentemente, manteve as dimensões originais dos dispositivos.

Perspectivas

Como perspectivas, propomos o estudo aprofundado do tratamento por plasmas, aplicado à superfície das membranas de borracha natural, para obter superfícies hidrofóbicas, essenciais no desenvolvimento dos microdispositivos, avaliando ainda a influência em suas propriedades ópticas e mecânicas. Sugerimos também o desenvolvimento de estudos envolvendo a preparação de moldes em escala micrométrica, utilizando impressora tridimensional (3D), bem como a impressão com o látex como matéria-prima, eventualmente, uma opção para o aperfeiçoamento dos microdispositivos de borracha natural. O tratamento de superfície utilizando hexametildissilazano será oportunamente estudado com o objetivo de obter superfícies hidrofóbicas, melhorando o fluxo no interior dos dispositivos.

Além das perspectivas apresentadas, os microdispositivos de borracha natural vislumbram aplicações biomédicas como sensores implantáveis, visto que a borracha natural é biocompatível, aspecto favorecido pela redução das dimensões dos dispositivos utilizando impressoras 3D. Além disso, a implementação do látex centrifugado possibilitará melhorias nas propriedades ópticas e biológicas dos microdispositivos. A avaliação do processo de lixiviação em meios como soro ou plasma sanguíneo, bem como o estudo *in vitro/in vivo* da biocompatibilidade e da funcionalidade do dispositivo serão realizados em momento oportuno. Por fim, os resultados apresentados nesta tese serão adotados como suporte experimental para o desenvolvimento, no futuro, de sensores biológicos.

Referências

- [1] CANEVAROLO Jr., S. V. **Ciência dos Polímeros** - Um texto básico para tecnólogos e engenheiros. *Editora Artliber*, 2002, p. 16-20.
- [2] MANO, E. B; MENDES, L.C.; **Introdução a Polímeros**, 2. ed. Edgard Blücher, 1999.
- [3] NAUTON, W. J. S. **Ciencia y tecnologia del caucho**, 1. ed. Companhia Editorial Continental, 1967.
- [4] BLOW, C. M. **Rubber technology and manufacture**, 2. ed. Institution of the rubber industry, 1975.
- [5] FLORY, P. J. Network structure and the elastic properties of vulcanized rubber. **Chemical Reviews**, v. 35, p. 51-75, 1944.
- [6] ROCHMADI, H. A.; HONGGOKUSUMO, S. H. Vulcanization kinetics of natural rubber based on free sulfur determination. **Indonesian Journal Chemistry**, v. 13, p. 21-27, 2013.
- [7] MRUÉ, F. *et al.* Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane, **Materials Research**, v. 7, p. 277-283, 2004.
- [8] FERREIRA, M. *et al.* Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, p. 564-569, 2009.
- [9] FRADE, M. A. C. *et al.* Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrane. **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, v. 3, p. 157-162, 2004.
- [10] MEADE, B. J.; WEISSMAN, D. N.; BEEZHOLD, D. H. Latex allergy: past and present. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 225-238, 2002.
- [11] KNOP, K. J. *et al.* Component-resolved allergy diagnosis by microarray: Potential, pitfalls, and prospects. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 50, p. 87-101, 2010.
- [12] PERRELLA, F. W.; GASPARI, A. A. Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. **Methods**, v. 27, p. 77-86, 2002.
- [13] SCHERILLO, G. *et al.* Tailoring assembly of reduced graphene oxide nanosheets to control gas barrier properties of natural rubber nanocomposites. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, p. 2230-2234, 2014.
- [14] COTTINET, P-J. *et al.* Electro-thermo-elastomers for artificial muscles. **Sensors and Actuators A**, v. 180, p. 105-112, 2012.
- [15] LIN, T. *et al.* New Design of Shape Memory Polymers Based on Natural Rubber Crosslinked via Oxa-Michael Reaction. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, p. 5695-5703, 2014.
- [16] QUITMANN, D. *et al.* Environmental Memory of Polymer Networks under Stress. **Advanced Materials**, v. 26, p. 3441-3444, 2014.
- [17] QUITMANN, D. *et al.* Solvent-Sensitive Reversible Stress-Response of Shape Memory Natural Rubber. **Applied Materials and Interfaces**, v. 5, p. 3504-3507, 2013.

-
- [18] QIU, T.; ZENG, Q.; AO, N. Preparation and characterization of chlorinated nature rubber (CNR) based polymeric quaternary phosphonium salt bactericide. **Materials Letters**, v. 122, p. 13-16, 2014.
 - [19] ZHANG, Y. *et al.* Morphology and Antibacterial Properties of Natural Rubber Composites Based on Biosynthesized Nanosilver. **Journal Applied Polymer Science**, DOI: 10.1002/APP.40746, 2014.
 - [20] HAMZAH, S.; GOMEZ, J. B. Electron microscopy of ultracentrifuged fractions of Hevea latex. II. Bottom fractions. **Journal Rubber Research Inst. Malaysia**, v. 31, p. 117-129, 1983.
 - [21] DICKENSON, P. B. Electron microscopical studies of latex vessel system of Hevea brasiliensis. **Journal Rubber Research Inst. Malaysia**, v. 21, p. 543-559, 1969.
 - [22] AGOSTINI, D. L. S. **Estudo dos componentes não isoprênicos do látex de Hevea brasiliensis indutores de angiogênese**, 2013. 104f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Faculdade de Ciências e tecnologia (FCT), programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT), Presidente Prudente, 2013.
 - [23] FERREIRA, M. *et al.* Avaliação dos parâmetros fisiológicos do látex de clones de seringueiras da região de Presidente Prudente (SP). **Boletim de Pesquisa (Embrapa)**, São Carlos, n. 8/99, I. 1517-476X, 1999.
 - [24] AGOSTINI, D. L. S.; CONSTANTINO, C. J. L.; JOB, A. E. Structural investigation of the latex and natural rubber membrane used in the angiogenesis formation. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 91, p. 1388-6150, 2008.
 - [25] RIPPEL, M. M. **Caracterização microestrutural de filmes e partículas de látex de borracha natural**. 2005 s/n. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Química; Campinas, 2005.
 - [26] RIPPEL, M. M.; BRAGANÇA, F. C. Borracha natural e nanocompósitos com argila. **Química Nova**, v. 32, p. 818-826, 2009.
 - [27] SILVA, J. Q. *et al.* Sistemas de exploração de seringueira utilizados em clones asiáticos Prang Besar no oeste paulista. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 949-955, 2007.
 - [28] DALL'ANTONIA, A. C. *et al.* Avaliação de clones de borracha natural crua por ensaios padrão e análise dinâmico-mecânica, **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, p. 239-245, 2006.
 - [29] DOS SANTOS, K. A. M. Estudo da fotodegradação de poliisoprenos naturais (borrachas naturais) em radiações específicas do ultravioleta (UV), **Universitas Ciências de Saúde**, v. 3, p. 303-312, 2005.
 - [30] GASPAR, A.; FARIA, E. Latex allergy, **Revista Portuguesa de Imunoalergologia**, v. 20, p. 173-192, 2012.
 - [31] NAWAMAWAT, K. *et al.* Colloids and surfaces a: Physicochemical and Engineering Aspects. **Colloids and Surfaces A**, v. 390, p. 157-166, 2011.
 - [32] FAITA, F. L. *et al.* Characterization of natural rubber membranes using scaling laws analysis. **European Polymer Journal**, v. 50, p. 249-254, 2014.

-
- [33] Active Standart ASTM D412 - Test Methods for Vulcanized Rubber and Thermoplastic Elastomers-Tension. ASTM International, 2013, DOI: 10.1520/D0412-06AR13.
 - [34] KUBO, M. *et al.* Stretchable Microfluidic Radio frequency Antennas. **Advanced Materials**, v. 22, p. 2749-2752, 2010.
 - [35] CALLISTER JR., D. W.; RETHWISCH, D. G. Características, aplicações e processamento de polímeros. **Ciência e Engenharia de Materiais**, 7. ed., Editora LTC, 2007, Cap. 15, p. 523-576.
 - [36] BROWN, R. Testing. In. WHITE Jr.; DE, S. K. (Ed.). **Rubber Technologist's Handbook**. Reino Unido: Rapra Technology Limited, 2001, Cap. 10, p. 311-349.
 - [37] LOO, C. T. High temperature vulcanization of elastomers: 2. Network structures in conventional sulphenamide-sulphur natural rubber vulcanizates. **Polymer**, v. 15, p. 357-365, 1974.
 - [38] JOHNSTON, I. D. *et al.* Mechanical characterization of bulk Sylgard 184 for microfluidics and microengineering. **Journal Micromechanics Microengineering**, v. 24, p. 1-7, 2014.
 - [39] LEELA, E.; MUHAMED, A. P. Assessment of biodeterioration of rubber wood exposed to field conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, V. 57, p. 31-36, 2006.
 - [40] BLACKLEY, D. C. **Polymers Latices: Science and technology**. Glasgow: Chapman & Hall, 1997. v. 2.
 - [41] SETHURAJ, M. R.; MATHEW, N. M. **Natural Rubber: Biology, Cultivation and Thechnology**, Netherlands: Elsevier Science, 1992.
 - [42] ARLINDO, E. P. S.; FUZARI JR, G. C.; MALMONGE, J. A.; Obtenção e Caracterização de Blendas de Colágeno com Látex de Borracha Natural. In: 17º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS (CBECIMat), 2006, Foz do Iguaçu. Anais.
 - [43] Li, S. D. *et al.* Study on thermal degradation of sol and gel of natural rubber. **Journal Applied Polymer Science**, v. 75, p. 1339-1344, 2000.
 - [44] AGOSTINI, D. L. S.; CONSTANTINO, C. J. L.; JOB, A. E. Thermal Degradation of Both Latex and Latex Cast Films Forming Membranes Combined TG/FTIR investigation. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 91, p. 703-707, 2008.
 - [45] TSEPLIN, E. E. *et al.* Identification of Singlet Excited Electronic States of Hydroxybenzoic Acid Isomers, **Optics and Spectroscopy**, v. 106, p. 334-342, 2009.
 - [46] SEAGER, S. L.; SLABAUGH, M. R. **Organic and Biochemistry for Today**, 4. ed. Brooks Cole, 1999.
 - [47] DE PAOLI, M. A. **Degradação e estabilização de polímeros**, 2. ed. (online), Editora ChemKeys, 2008.
 - [48] AMNUAYPORN SRI, S.; SAKDAPIPANICH, J.; TANAKA, Y. Highly Purified Natural Rubber by Saponification of Latex: Analysis of Green and Cured Properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 118, p. 3524-3531, 2010.
 - [49] NALLASAMY, P.; MOHAN, S. Vibrational spectra of cis-1,4-polyisoprene. **The Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 29, p. 17-26, 2004.

-
- [50] HEALEY, A. M.; HENDRA, P. J.; WEST, Y. D. A Fourier-transform Raman study of the strain-induced crystallization and cold crystallization of natural rubber. **Polymer**, v. 37, p. 4009-4024, 1996.
 - [51] KONG, J.; SHAONING, Y. U. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. **Acta Biochimica**, v. 39, p. 549-559, 2007.
 - [52] MARTINS, M. A. *et al.* Avaliação de borracha natural do clone RRIM 600 para aplicação em nanocompósitos. In: VI WORKSHOP DA REDE DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO, 2012, ISSN 2175-8395, Fortaleza, 2012.
 - [53] BÓ, M. C. **Degradação de preservativos masculinos de borracha natural - Análise de dados, modelagem do processo e revisão do tempo de validade.** 2007. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano (IMA), Rio de Janeiro, 2007.
 - [54] YEO, L. Y. *et al.* Microfluidic devices for bioapplications. **Small**, v. 7, p. 12-48, 2011.
 - [55] AHN, C. H. *et al.* Disposable Smart Lab on a Chip for Point-of-Care Clinical Diagnostics, **Proceedings of The IEEE**, v. 92, p. 154-173, 2004.
 - [56] ELVIRA, K. S. *et al.* The past, present and potential for microfluidic reactor technology in chemical synthesis, **Nature Chemistry**, v. 5, p. 905-915, 2013.
 - [57] GUBALA, V. *et al.* Point of Care Diagnostics: Status and Future, **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 487-515, 2012.
 - [58] FOUDEH, A. M. *et al.* Microfluidic designs and techniques using lab-on-a-chip devices for pathogen detection for point-of-care diagnostics, **Lab on a Chip**, v. 12, p. 3249-3266, 2012.
 - [59] CHIRIACÓ, M. S. *et al.* EIS microfluidic chip for immunoassay and ultrasensitive cholera toxin detection, **Lab on a Chip**, v. 11, p. 658-663, 2011.
 - [60] LEE, M. *et al.* SERS based immunonassay using gold array embedded gradient microfluidic chip, **Lab on a Chip**, v. 12, p. 3720-3727, 2012.
 - [61] KIM, D. N. *et al.* Fabrication of microfluidic devices incorporating bead-based reaction and microarray-based detection system for enzymatic assay. **Sensors and Actuators B**, v. 137, p. 305-312, 2009.
 - [62] SAKAMOTO, H. *et al.* Plasma separation PMMA device driven by capillary force controlling surface Wettability, **Micro & Nano Letters**, v. 7, p. 64-67, 2012.
 - [63] CHHINA, S. K.; PEREZ, C. F.; PARAMESWARAN, M. Microfluidic system to detect DNA amplicons using agglutination technique, **Journal Micromechanics and Microengineering**, v. 22, 115038 (8pp), 2012.
 - [64] CHUANG, C. H.; HUANG, Y. W.; WU, Y. T. Dielectrophoretic chip with multilayer electrodes and micro-cavity array for trapping and programmably releasing single cells. **Biomed Microdevices**, v. 14, p. 271-278, 2012.
 - [65] DAVIS, L. M. *et al.* Microfluidic Cell sorter for using in developing red fluorescent proteins with improved photostability. **Lab on a Chip**, 2013, DOI: 10.1039/C3LC50191D.

-
- [66] MORIUCHI, T. *et al.* Development of a flexible direct photosynthetic/metabolic biofuel cell for mobile use. **International Journal of Precision Engineering and Manufacturing**, v. 10, p. 75-78, 2009.
 - [67] VASDEKIS, A. E. *et al.* Solvent immersion imprint lithography, **Lab on a Chip**, v. 14, p. 2072-2080, 2014.
 - [68] SONG, W. *et al.* Elastomer based tunable optofluidic devices, **Lab on a Chip**, v. 12, p. 3590-3597, 2012.
 - [69] ALVANKARIAN, J.; MAJLIS, B. Y. A new UV-curing elastomeric substrate for rapid prototyping of microfluidic devices. *Journal Micromechanics and Microengineering*, v. 22, 035006 (15pp), DOI: 10.1088/0960-1317/22/3/035006, 2012.
 - [70] MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WHITESIDES, G. M. Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 19606-19611, 2008.
 - [71] MRUÉ, F. *et al.* Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Materials research**, v. 7, p. 277-283, 2004.
 - [72] LIM, Y. C. *et al.* Lab-on-a-chip: a component view. **Microsystem Technology**, v. 16, p. 1995-2015, 2010.
 - [73] YUEN, P. K.; GORAL, V. N. Low-cost rapid prototyping of flexible microfluidic devices using a desktop digital craft cutter. **Lab on a Chip**, v. 10, p. 384-387, 2010.
 - [74] ZHANG, B. *et al.* Flexible packaging of solid-state integrated circuit chips with elastomeric microfluidics. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1-8, 2013.
 - [75] KURITA, R. *et al.* O. Microfluidic device integrated with pre-reactor and dual enzyme-modified microelectrodes for monitoring in vivo glucose and lactate. **Sensors and Actuators B**, v. 87, p. 296-303, 2002.
 - [76] RETTERER, S. T. *et al.* Constant pressure fluid infusion into rat neocortex from implantable microfluidic devices. **Journal of Neural Engineering**, v. 5, p. 385-391, 2008.
 - [77] SALES, F. C. P. F. *et al.* An intravenous implantable glucose/dioxygen biofuel cell with modified flexible carbon fiber electrodes, **Lab on a Chip**, v. 13, p. 468-474, 2013.
 - [78] FOCKE, M. *et al.* Lab-on-a-Foil: microfluidics on thin and flexible films. **Lab on a Chip**, v. 10, p. 1365-1386, 2010.
 - [79] KOVTYUKHOVA, N. I. *et al.* Layer-by-Layer Assembly of Ultrathin Composite Films from Micron-Sized Graphite Oxide Sheets and Polycations, **Chemistry of Materials**, v. 11, p. 771-778, 1999.
 - [80] ALEXANDER, J. J.; GRAY, H. B. Electronic structures of hexacyanometalate complexes. **Journal American Chemical Society**, v. 90, p. 4260-4271, 1968.
 - [81] RADHA, S.; KAMATH, P. V. Electronic spectra of anions intercalated in layered double hydroxides. **Bulletin of Materials Science**, v. 36, p. 923-929, 2013.
 - [82] MARRE, S.; JENSEN, K. F. Synthesis of micro and nanostructures in microfluidic systems, **Chemical Society Review**, v. 39, p. 1183-1202, 2010.

-
- [83] SONG, Y.; HORMES, J.; KUMAR, C. S. S. R. Microfluidic Synthesis of Nanomaterials. **Small**, v. 4, p. 698-711, 2008.
 - [84] FRENZ, L. *et al.* Droplet-Based Microreactors for the Synthesis of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles, **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, p. 6817-6820, 2008.
 - [85] HASSAN, A. A. *et al.* Synthesis of iron oxide nanoparticles in a microfluidic device: preliminary results in a coaxial flow millichannel. **Chemical Communications**, p. 1783-1785, 2008.
 - [86] SIMMONS, M. *et al.* The Preparation of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in Microreactors, **Journal of Flow Chemistry**, v. 3, p. 7-10, 2013.
 - [87] HUANG, Y. *et al.* Synthesis of yolk/shell Fe₃O₄@polydopamine/graphene/Pt nanocomposite with high electrocatalytic activity for fuel cells, **Journal of Power Sources**, v. 246, p. 868-875, 2014.
 - [88] HU, M.; JIANG, Y.; YAN, M. Scalable synthesis of Fe₃O₄/C composites with enhanced electrochemical performance as anode materials for lithium-ion batteries. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 582, p. 563-568, 2014.
 - [89] SUN, H.-L. *et al.* Surface enhanced Raman spectroscopic studies on magnetic Fe₃O₄@AuAg alloy core-shell nanoparticles, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 114, p. 579-585, 2013.
 - [90] YANG, Y. *et al.* Synthesis and drug-loading properties of folic acid-modified superparamagnetic Fe₃O₄ hollow microsphere core/mesoporous SiO₂ shell composite particles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, p. 2200-2210, 2014.
 - [91] LIN, A. Y. *et al.* Encapsulated Fe₃O₄/Ag Complexed Cores in Hollow Gold Nanoshells for Enhanced Theranostic Magnetic Resonance Imaging and Photothermal Therapy. **Small**, DOI: 10.1002/sml.201303593, 2014.
 - [92] LIANG, W. *et al.* A novel magnetic Fe₃O₄@gold composite nanomaterial: Synthesis and application in regeneration-free immunosensor, **Materials Letters**, v. 64, 2616-2619, 2010.
 - [93] CAI, W.; WANG, X.; YAN, Y. Controllable fabrication and sensitive detection based on SERS substrates with Au nanocubes coated Fe₃O₄. **Materials Research Bulletin**, v. 52, p. 1-5, 2014.
 - [94] ZHU, J. *et al.* Synthesis of Au-Fe₃O₄ heterostructured nanoparticles for in vivo computed tomography and magnetic resonance dual model imaging. **Nanoscale**, v. 6, p. 199-202, 2014.
 - [95] LI, J. *et al.* Facile One-Pot Synthesis of Fe₃O₄@Au Composite Nanoparticles for Dual-Mode MR/CT Imaging Applications. **Applied Materials & Interfaces**, v. 5, p. 10357-10366, 2013.
 - [96] WANG, C.; CHEN, J.; TALAVAGE, T.; IRUDAYARAJ, J. Gold Nanorod/Fe₃O₄ Nanoparticle "Nano-Pearl-Necklaces" for simultaneous Targeting, Dual-Mode Imaging, and Photothermal Ablation of Cancer Cells. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, 2759-2763, 2009.

-
- [97] SANTOS, G. P.; MELO, A. F. A. A.; CRESPILO, F. N. Magnetically controlled single-nanoparticle detection via particle-electrode collisions, **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, p. 8012-8018, 2014.
- [98] MARTIN, M. N. *et al.* Charged gold nanoparticles in non-polar solvents: 10-min synthesis and 2D self-assembly. **Langmuir**, v. 26, p. 7410-7417, 2010.
- [99] CARUNTU, D. *et al.* Attachment of Gold Nanograins onto Colloidal Magnetite Nanocrystals. **Chemistry of Materials**, v. 17, p. 3398-3402, 2005.
- [100] YALI, C. *et al.* Preparation and mechanism of Fe₃O₄/Au core/shell superparamagnetic microspheres. **Science in China (Series B)**, v. 44, p. 404-410, 2001.
- [101] CAMPBELL, C. T.; PARKER, S. C.; STARR, D. E. The Effect of Size-Dependent Nanoparticle Energetics on Catalyst Sintering. **Science**, v. 298, p. 811-817, 2002.
- [102] GARZA-GARCÍA, L. D. *et al.* Continuous flow micro-bioreactors for the production of biopharmaceuticals: effect of geometry, surface texture, and flow rate, **Lab on a Chip**, v. 14, p. 1320-1329, 2014.