

SISTEMA MICROFLUÍDICO CONFECCIONADO EM POLIDIMETILSILOXANO PARA FORMAÇÃO CONTROLADA DE GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO PARA MOLÉCULAS COM ALTA MASSA MOLECULAR

Nayara de Souza Mendes (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Emerson Marcelo Giroto (Orientador), e-mail: nayaras.mendes@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Exatas /
Departamento de Química / Maringá, PR

Ciências Exatas e da Terra / Química

Palavras-chave: microfluídica, gradiente de concentração, PDMS

Resumo

O desenvolvimento de novas tecnologias capazes de melhorar análises clínicas com menor tempo de resposta, menor custo de fabricação, economia de reagentes, portabilidade e reprodutibilidade, são objetos de estudos de vários grupos de pesquisas devido a sua importância tecnológica. Neste contexto, construiu-se um dispositivo microfluídico de diluição em polidimetilsiloxano (PDMS) por meio da técnica *soft-lithography*. O perfil de diluição do sistema microfluídico foi avaliado com azul de metileno, fluoresceína e albumina de soro bovino (BSA). A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que foi possível construir um dispositivo capaz de gerar um gradiente de concentração definido e reprodutível para moléculas de baixa e alta massa molecular. Ressalta-se que o processo de fabricação dos dispositivos é suscetível à imperfeições e irregularidades nos microcanais, que influenciam na concentração das amostras coletas, proporcionando perfis de diluição característicos de cada dispositivo.

Introdução

A tecnologia *Lab-on-a-chip* consiste em sistemas laboratoriais integrados em um único dispositivo miniaturizado, sendo aplicada principalmente em procedimentos de análises químicas e biológicas. Sistemas microfluídicos são exemplos de sistemas laboratoriais *Lab-on-a-chip*, sendo caracterizados pelas dimensões de seus canais, os quais consistem em manipular pequenos volumes de fluídos, que variam entre 10^{-9} a 10^{-18} litros, em canais com dimensões micrométricas. Os dispositivos microfluídicos são confeccionados geralmente em vidro ou silicone, configurados para realização de imunoenaios, reações químicas, entrega controlada de fármacos, formação de gradiente de concentração, entre outras (Whitesides, 2006).

Nesses dispositivos, a configuração dos microcanais proporcionam aos fluídos, com concentrações distintas de um determinado soluto, que sejam capazes de se combinarem/misturarem, gerando linhas com novas concentrações. O uso do

gradiente de concentração possibilita quantificar espécies químicas e/ou biológicas em dispositivos portáteis, de simples operação, com pouco consumo de reagentes e amostras, baixo consumo de energia e baixo custo de fabricação (KEENAN e FOLCH, 2008; TOH, et al. 2014).

O desenvolvimento de dispositivos microfluídicos capazes de formar gradientes de concentração definidos pode dispensar a necessidade de calibrações recorrentes, uma vez que o seu comportamento pode ser descrito matematicamente. Diante do exposto, foi proposto solucionar problemas atrelados à reprodução do sistema de microdiluição, bem como garantir uma economia de tempo e, principalmente, economia de reagentes como, por exemplo, na aplicação de sensoriamento de antígeno-anticorpo, que são moléculas biológicas de difícil obtenção e que possuem elevado custo comercial.

Materiais e métodos

Realizou-se a confecção dos dispositivos microfluídicos por meio da técnica *soft-lithography*, para tal, utilizou-se fotorresiste (SU-100, Microchem), fotorrevelador SU-8[®] (solução a base de lactato de etila), mistura de polidimetilsiloxano (PDMS, Sylgard 184[®]) e agente curador (Sylgard 184[®]) na proporção de 10:1 e, os equipamentos *spin coating* (Spin coating Systems, G3P-8) e foto colimadora ultravioleta (Tamarack Scientific, 2110 CP). Em seguida, os dispositivos em PDMS foram acoplados a um substrato de vidro e, utilizando uma bomba de seringa (Harvard Apparatus 11 Plus), soluções de azul de metileno ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$; $D = 8,3 \text{ E}^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), fluoresceína (10^{-3} M , $D = 5,0 \text{ E}^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) e BSA ($300 \mu\text{g mL}^{-1}$; $D = 1,0 \text{ E}^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) foram bombeadas a uma taxa de injeção determinada utilizando água Milli-Q como solvente para as duas primeiras substâncias e tampão fosfato (PBS) para a terceira. Após percorrerem os sistemas, as amostras foram coletadas e quantificadas por meio de espectrofotômetro UV-vis (OceanOptics, USB2000), microscópio de fluorescência (TNI-06T-PL) e Espectrofluorímetro (Varian, Cary-Eclipse). A partir disso, foram determinadas suas respectivas concentrações e, utilizou-se o *software* OriginLab[®] para definir uma função que descrevesse o perfil de diluição obtido, gerando uma caracterização matemática.

Resultados e Discussão

Inicialmente foram confeccionados dois dispositivos microfluídicos 2x5 (dois canais de entrada e cinco canais de saída) possuindo 25000 μm de caminho de homogeneização, sendo um com câmara de mistura com junção em T e outro com junção em Y (Figura 1). Injetou-se em um dos canais de entrada uma solução de azul de metileno $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e no outro água Milli-Q, sob uma taxa de injeção de $1,00 \text{ mL h}^{-1}$. A partir da curva de calibração, determinaram-se os perfis de diluição para cada caso, sendo que o dispositivo com junção em Y apresentou um melhor ajuste aos valores determinados na literatura. A fim de investigar tais diferenças, em um microscópio de fluorescência, os dispositivos foram submetidos à mistura de fluoresceína e água Milli-Q a uma taxa de injeção de $1,00 \text{ mL h}^{-1}$. Por meio de imagens do microscópio de fluorescência (TNI-06T-PL), foi possível observar que na configuração com junção em T pode ocorrer irregularidades no processo de mistura,

apresentando caminhos preferenciais dos fluídos, desorganizando o sistema de mistura. Em contrapartida, o *design* com junção em Y indicou favorecer uma continuidade do fluxo, dificultando que o fluído alcançasse de forma desuniforme outra câmara de mistura (Figura 2).

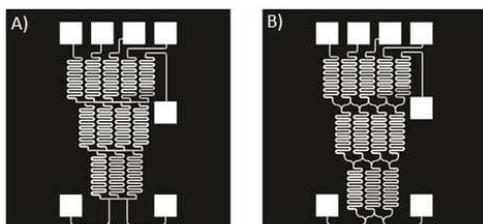


Figura 1 - A) Design dispositivo 2x5 com junção em T B) Design dispositivo 2x5 com junção em Y.

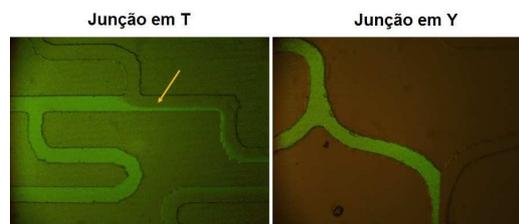


Figura 2 - Imagem de microscópio de fluorescência das câmaras de mistura dos dispositivos T e Y.

Seguidamente, construiu-se um dispositivo 2x6 com junção em Y, com serpentinas medindo 25000 μm de comprimento. Por imagens obtidas pelo microscópio de fluorescência, observou-se que o dispositivo foi capaz de misturar as substâncias de maneira uniforme, formando um gradiente de concentração. A fim de estudar o processo de mistura do dispositivo, injetou-se uma solução de azul de metileno 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e água Milli-Q, sob uma taxa de injeção de 1,00 mL h^{-1} . A partir da determinação dos perfis de diluição, obteve-se uma curva com perfil sigmoidal e os resultados obtidos apresentaram-se concordantes, porém com uma leve variação com relação aos valores teóricos. Essas variações podem ser atribuídas a imperfeições e irregularidades presentes nos canais durante o processo de fabricação dos dispositivos. Para avaliar o processo de mistura em moléculas de alta massa molecular, injetou-se uma solução de BSA no dispositivo 2x6-Y. No entanto, os resultados obtidos não foram satisfatórios, sugerindo que o comprimento da serpentina de mistura não seria suficiente para a completa homogeneização das substâncias.

Um novo *design* de dispositivo com comprimento de câmara de mistura de 50000 μm foi elaborado (Figura 3). Ao injetar BSA 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ neste dispositivo com fluxo de injeção de 0,125 mL h^{-1} , obteve-se novamente uma curva com perfil sigmoidal (Figura 4) e, os perfis de diluição experimentais mostraram uma pequena variação com relação aos valores teóricos, conforme mostrado na Tabela 1.

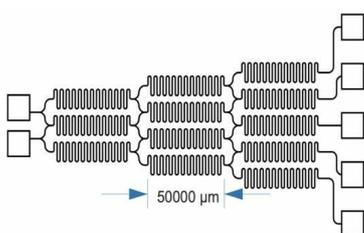


Figura 3 - *Design* do dispositivo microfluídico 2x5-Y com comprimento de câmara de mistura de 50000 μm .

Tabela 1 - Coeficientes de diluição para BSA no dispositivo 2x5-Y.

Canais de saída	Perfil de diluição experimental (%)	Perfil de diluição teórico (%)
1	0,04	0
2	10,47	12,5
3	58,41	50
4	83,83	87,5
5	98,15	100

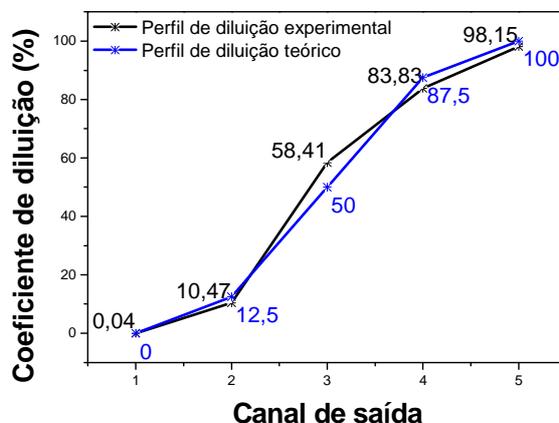


Figura 4 - Perfil do gradiente de concentração para o dispositivo 2x5-Y quando estudado com BSA.

O afastamento dos coeficientes de diluição dos valores teóricos pode ser justificado não apenas pelas imperfeições dos dispositivos antes discutidos, mas também por erros experimentais como, por exemplo, na quantificação da BSA pelo espectrofluorímetro.

Conclusões

Concluiu-se que foi possível confeccionar um dispositivo microfluídico capaz de gerar um gradiente de concentração para espécies de alta massa molecular, obtendo uma curva com perfil sigmoidal. Concluiu-se também que qualquer substância com coeficiente de difusão maior que o da BSA, é capaz de se misturar completamente utilizando o dispositivo testado. Ressalta-se que, outro fator importante é o método de fabricação dos dispositivos, visto que o processo experimental é suscetível à presença de imperfeições no decorrer dos microcanais, que influenciam na concentração das amostras coletas, proporcionando coeficientes de diluição característicos de cada dispositivo construído.

Agradecimentos

UEM, LMSen, CNPq, CAPES, Fundação Araucária (SETI/UGF-PR)

Referências

KEENAN, T. M., FOLCH, A., Biomolecular gradients in cell culture systems. **Lab on a Chip**, v. 8, p. 34–57, 2008.

TOH, A. G. G., WANG, Z. P., YANG, C., NGUYEN, N. Engineering microfluidic concentration gradient generators for biological applications. **Microfluid Nanofluid**, v. 16, p. 1-18, 2014.

WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, p. 368-373, 2006.