



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 10 2013 017530-7 A2



(22) Data de Depósito: 09/07/2013

(43) Data da Publicação: 04/08/2015
(RPI 2326)

(54) Título: MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE DISPOSITIVOS ANALÍTICOS EM SUBSTRATOS DE PAPEL: DEPOSIÇÃO DE BARREIRAS HIDROFÓBICAS DE PARAFINA A PARTIR DO PROCESSO DE ESTAMPAGEM A QUENTE E USO DOS REFERIDOS DISPOSITIVOS

(51) Int.Cl.: B41K1/50; B41M3/00; B41M99/00; B41C1/08

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS - UFG

(72) Inventor(es): JOÃO BRUNO COSTA SANTOS, PAULO DE TARSO GARCIA, THIAGO MIGUEL GARCIA CARDOSO, WENDELL KARLOS TOMAZELLI COLTRO

(57) Resumo: MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE DISPOSITIVOS ANALÍTICOS EM SUBSTRATOS DE PAPEL: DEPOSIÇÃO DE BARREIRAS HIDROFÓBICAS DE PARAFINA A PARTIR DO PROCESSO DE ESTAMPAGEM A QUENTE E USO DOS REFERIDOS DISPOSITIVOS Campo da invenção - A presente invenção refere-se à fabricação de dispositivos microfluídicos em papel a partir do uso de um carimbo metálico para definir canais para análises químicas mediante ao depósito térmico de barreiras hidrofóbicas de parafina. O processo de fabricação baseia-se em uma simples etapa de carimbagem, ou estampagem a quente. Os dispositivos resultantes podem ser utilizados, em conjunto, com vários tipos de detecção como, por exemplo, a detecção amperométrica a detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C4D) e a detecção colorimétrica. A presente invenção pode ser utilizada em diversas aplicações químicas incluindo técnicas de separação como, por exemplo, eletroforese em solução livre (em zona) e focalização isoeletrica de proteínas, bem como ensaios rápidos dedicados a diagnósticos de espécies clinicamente relevantes tais como, glicose, proteínas e colesterol, que estão diretamente relacionadas a algumas patologias clínicas.

“MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE DISPOSITIVOS ANALÍTICOS EM SUBSTRATOS DE PAPEL: DEPOSIÇÃO DE BARREIRAS HIDROFÓBICAS DE PARAFINA A PARTIR DO PROCESSO DE ESTAMPAGEM A QUENTE E USO DOS REFERIDOS DISPOSITIVOS”

5 Campo da invenção

A presente invenção refere-se à fabricação de dispositivos microfluídicos em papel a partir do uso de um carimbo metálico para definir canais para análises químicas mediante ao depósito térmico de barreiras hidrofóbicas de parafina. O processo de fabricação baseia-se em uma simples etapa de carimbagem, ou
10 estampagem a quente. Os dispositivos resultantes podem ser utilizados, em conjunto, com vários tipos de detecção como, por exemplo, a detecção amperométrica a detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C⁴D) e a detecção colorimétrica. A presente invenção pode ser utilizada em diversas aplicações químicas incluindo técnicas de separação
15 como, por exemplo, eletroforese em solução livre (em zona) e focalização isoeletrica de proteínas, bem como ensaios rápidos dedicados a diagnósticos de espécies clinicamente relevantes tais como, glicose, proteínas e colesterol, que estão diretamente relacionadas a algumas patologias clínicas.

Fundamentos da Invenção

20 No âmbito internacional, os avanços tecnológicos referentes à área da microfluídica vêm proporcionando uma verdadeira revolução na instrumentação analítica moderna.

O substrato de papel possui um baixo custo, alta abundância, porosidade elevada, alta biodegradabilidade, excelente compatibilidade química, de peso
25 leve, é flexível, está disponível em diferentes formas e formatos, possui acessibilidade global e apresenta facilidade de estocagem. Devido à porosidade das fibras de celulose, a molhabilidade do papel permite que a solução seja transferida em uma direção delimitada por barreiras hidrofóbicas por um fenômeno conhecido como fluxo lateral.

30 Esse tipo de transporte fluídico apresenta vantagens instrumentais significativas, uma vez que não é necessário o uso de bombas, fontes, ou

qualquer outro equipamento externo. Por esta razão, dispositivos microfluídicos, baseados em papel ou outra plataforma descartável, têm recebido atenção especial uma vez que são ideais para uso no point-of-care, ou para conduzirem ensaios clínicos associados com a telemedicina. Esses dispositivos podem ser

5 considerados como ferramentas analíticas perfeitamente adaptáveis para auxiliarem na diagnóstico preventivo ou remediativo de doenças tropicais (doença de Chagas, leishmaniose, Dengue Tuberculose, AIDS, Malária, dentre outras) comumente encontradas em países em desenvolvimento, ou também de analitos clinicamente relevantes e indicadores de algumas disfunções no

10 organismo dos seres humanos. Esses indicadores incluem alguns analitos de interesse como a glicose, o colesterol, as proteínas (totais ou as frações relacionadas à albumina, globulina, caseína, por exemplo), dentre outros. Dessa maneira, acredita-se que estas plataformas apresentam capacidade tecnológica para serem exploradas pelos órgãos responsáveis pela Saúde Pública e até

15 mesmo em unidades médicas móveis de modo a permitir que a equipe médica possa, de forma preventiva, tomar decisões no ponto de necessidade, ou no deslocamento do paciente até uma clínica especializada. Indubitavelmente, essa ação pode contribuir para a redução do número de óbitos e até mesmo com a melhoria ou aumento da expectativa de vida.

20 **Impacto Tecnológico**

O impacto tecnológico da presente invenção se refere ao desenvolvimento de um método simples, barato e eficiente para produção de dispositivos analíticos em papel. A tecnologia desenvolvida viabiliza a fabricação rápida (< 1 min) de canais com dimensões da ordem de milímetros de largura em qualquer

25 plataforma de papel com excelente reprodutibilidade sem a necessidade de qualquer equipamento sofisticado. A tecnologia de fabricação é extremamente barata e facilmente implementável em qualquer ambiente de trabalho.

Os dispositivos resultantes em plataformas de papel apresentam características ideais para serem rapidamente absorvidas pelo mercado nacional

30 como portabilidade — o que permite que análises químicas sejam realizadas em locais remotos — e baixo custo unitário (R\$ 0,01 — R\$ 0,05). Além disso, a

infraestrutura básica para sua confecção a partir do processo desenvolvido não exige nenhum equipamento de alto custo ou consumível de difícil acesso. O material usado para a criação das barreiras hidrofóbicas é a parafina, matéria-prima derivada do petróleo que apresenta propriedades termoplásticas e que
5 pode ser utilizada como combustível, na fabricação de velas ou em embalagens comumente usadas na indústria de alimentos.

O processo de fabricação baseia-se na utilização de um molde metálico definido em um carimbo. Este, por sua vez, apresenta robustez, elevada resistência mecânica e dispensa manutenção técnica, ao contrário do que ocorre
10 com todas as tecnologias disponíveis para microfabricação de dispositivos em papel. Desse modo, a associação do substrato de baixo custo com a tecnologia proposta contribui para agregar valor tecnológico para a ferramenta instrumental desenvolvida dedicada para análises remotas, onde muitas vezes os testes realizados no campo podem, de alguma forma, contribuir para uma ação
15 remediativa. Esta tecnologia pode ainda ser incorporada de sensores eletroquímicos, permitindo o uso de eletrodos para medir sinais elétricos a partir dos modos de detecção amperométrico ou condutométrico sem contato, conforme processos tecnológicos desenvolvidos anteriormente^{1,2}. A partir do processo proposto, os dispositivos de papel serão utilizados em diferentes
20 aplicações, como descrito a seguir.

Diagnósticos Clínicos

A presente invenção pode ser utilizada em diagnósticos clínicos no ponto de necessidade (point-of-care)³⁻⁶, também incluindo local onde não têm energia elétrica (regiões rurais; guerras militares; grandes catástrofes), locais estes, que
25 requerem a necessidade de se utilizar kits comerciais transportáveis para o campo, onde muitas vezes é necessário obter um diagnóstico precoce ou informações clínicas sobre a saúde do paciente. Por se tratar de um dispositivo simples e que utiliza a detecção colorimétrica, necessita-se apenas do dispositivo analítico e um instrumento para capturar a imagem do dispositivo
30 após a análise. Essa captura pode ser conduzida por uma câmera de celular, por exemplo. Para obter um diagnóstico utilizando a presente invenção, necessita-

se apenas coletar a amostra do paciente (urina, sangue ou soro) e adicionar ao dispositivo. A partir do transporte fluídico sob ação do fluxo lateral, a solução entra em contato com reagentes previamente immobilizados promovendo alterações na coloração da área (ou zona) de detecção. Após a aquisição da
5 imagem, a mesma pode ser enviada para um centro de análise, ou laboratório especializado, através de mensagem eletrônica (e-mail ou simples MMS, Multimedia Messaging Service) para posterior análise. A partir da análise da intensidade de cor da imagem, o especialista terá condições de emitir um laudo (ou boletim) médico bem como prescrever um tratamento adequado de acordo
10 com a situação clínica do paciente.

Focalização Isoelétrica de Proteínas.

A presente invenção também pode ser utilizada para realizar focalização isoeletrica (IEF) de proteínas, que é a separação de proteínas por ponto isoeletrico, uma vez que o dispositivo possui um baixo consumo de reagentes e
15 existe a facilidade de acoplar com várias técnicas de caracterização, como por exemplo, a espectrometria de massas. As proteínas são, na maioria dos casos, indicadoras de disfunções renais e a confirmação do tipo de proteína presente bem como os níveis de concentração presentes na amostra biológica podem auxiliar a medicina no tratamento ideal do paciente.

20 Separações Eletroforéticas e uso da detecção condutométrica sem contato

Pela primeira vez, é apresentado nessa invenção o uso dos chips de papel para eletroforese acoplada com a detecção condutométrica sem contato. A técnica de eletroforese permite a separação de espécies iônicas ou ionizáveis (cátions, ânions, metais pesados, proteínas, carboidratos e etc) sob ação de um
25 campo elétrico aplicado com uma fonte de alta tensão.

Mediante ao avanço instrumental da área da microfluídica, a eletroforese se apresenta como uma das principais técnicas exploradas, devido à simplicidade de sua instrumentação requerida. A porosidade do papel permite a separação eletroforética de espécies inorgânicas e também de biomoléculas. O
30 uso da detecção condutométrica sem contato é vantajoso, pois eletrodos metálicos podem ser utilizados isolados fisicamente do contato com o canal

preenchido com a solução. Isso previne contaminação, degradação e interferência elétrica quando em contato com sistemas de separação.

Objeto da Invenção

Perante à miniaturização em Química Analítica, há a necessidade de desenvolver sistemas analíticos miniaturizados minimamente instrumentados utilizando-se métodos de fabricação que forneçam simplicidade, rapidez, acessibilidade e possibilidade de obtenção de dispositivos descartáveis e portáteis. Neste contexto, a presente invenção descreve o desenvolvimento de uma tecnologia de estampagem a quente para prototipagem de dispositivos analíticos em papel, baseando-se na carimbagem em substratos de papel resultando a formação de barreiras hidrofóbicas com parafina. O método de carimbagem é inovador e requer apenas uma etapa de pré-aquecimento. Os dispositivos em papel podem ser obtidos em um intervalo de tempo inferior a 1 minuto.

Em relação ao custo, os chips produzidos com a presente invenção apresentam um custo final da ordem de R\$ 0,10 (dez centavos de reais), incluindo reagentes e consumíveis para ensaios colorimétricos rápidos. Testes de glicose e albumina bovina sérica podem ser realizados simultaneamente. Devido ao baixo custo, os dispositivos são considerados descartáveis, que é uma característica importante, pois podem ser utilizados em produção em massa.

Sumário da Invenção

O objetivo da presente invenção é a fabricação de dispositivos analíticos em papel de modo simples, rápido, barato e acessível, resultando em protótipos de interesse para ensaios clínicos como glicose e proteínas, os quais podem auxiliar equipes médicas móveis no tratamento imediato a pacientes no ponto de necessidade, por exemplo.

A referida invenção compreende dispositivos microfluídicos a base de papel, contendo microcanais delimitados por barreiras hidrofóbicas à base de parafina, fabricados por um método similar à uma carimbagem.

Antecedentes da Invenção

As tecnologias disponíveis para a fabricação de microdispositivos em papel são: fotolitografia, plotagem, gravação a jato de tinta, tratamento por plasma, impressão a cera, impressão a jato de tinta, impressão em flexografia, corte de papel, serigrafia, tratamento a laser, barreiras de poli(dimetilsiloxano) (PDMS) e uma técnica de litografia rápida para ativação de substratos de de papéis, conhecida como Fast Litography Absorption of Sheets (FLASH).⁷⁻¹⁷

O uso do papel na Química Analítica não é novo. Atualmente, o papel é utilizado como filtro em processos de separação. Em 1949, Muller e colaboradores¹⁸ relataram a fabricação de dispositivos em papel usando parafina para a construção das barreiras hidrofóbicas. O método proposto pelos autores consistiu na prensagem de um fio aquecido como desenho do dispositivo sobre um conjunto de papel, constituído de um papel superior parafinado e um papel inferior não parafinado. Após a prensagem, a imagem do fio foi transferida com sucesso para o papel não parafinado.

Atualmente, as tecnologias mais difundidas e utilizadas para fabricação de dispositivos em papel são o método de impressão a cera⁵ e o processo de fotolitografia⁵, porém estes métodos de fabricação necessitam de equipamentos que não são tão acessíveis. No processo de impressão à cera, por exemplo, é necessário o uso de uma impressora (com custo estimado em R\$ 6.000,00) e uma chapa aquecedora, além dos cartuchos de cera (com custo estimado em R\$ 100,00 um kit com quatro bastões). Já o processo fotolitográfico é bastante laborioso e o tempo de fabricação é da ordem de 1 a 3 horas, além de se fazer necessário o uso de uma estação de trabalho fotolitográfica, a qual pode apresentar custo da ordem de R\$ 1.000.000,00 (um milhão de reais).

Descrição Detalhada da Invenção

Fabricação do Dispositivo Analítico:

O processo de fabricação desenvolvido para a produção dos dispositivos em papel (qualitativo, quantitativo ou cromatográfico). Antes da etapa de fabricação, uma quantidade aproximada de 60 g de parafina é colocada em uma placa de petri em uma estufa previamente aquecida à 100°C. Após o aquecimento durante 1 min, a parafina se torna líquida. Um substrato de papel é

então mergulhado na placa de petri durante 1 minuto, deixando escorrer o excesso de parafina para a solidificação da mesma. O papel parafinado é então colocado em contato com o papel não parafinado, gerando um sanduíche de papéis. O processo desenvolvido baseia-se no uso de um carimbo metálico, o qual foi usinado em aço inox contendo uma geometria de um canal único (reto) com 50 mm de comprimento e 3 mm de largura delimitado por duas zonas de detecção de 10 mm cada. O carimbo foi pré-aquecido à 150°C e colocado em contato com o sanduíche de papéis. Ao aplicar uma pressão de aproximadamente 0,1 MPa durante 5 segundos, ocorre a transferência técnica da parafina do papel parafinado para o não parafinado, criando-se assim as barreiras hidrofóbicas para permitir o transporte da solução via fluxo lateral.

O processo apresenta duas micrografias ópticas ilustrando o canal definido com barreiras hidrofóbicas de parafina antes e após preenchimento com solução de corante, respectivamente. A partir das imagens apresentadas pode-se observar que as barreiras são bastante eficientes no direcionamento da solução via ação do fluxo lateral.

O processo mostra micrografias ópticas evidenciando-se a morfologia das superfícies de parafina e papel, respectivamente. Os espaços entre as fibras do papel são totalmente preenchidos com a matéria-prima utilizada, criando-se uma barreira efetiva para o transporte da solução.

Conforme observado, o tempo de carimbagem aumenta a quantidade de parafina transferida para o papel não parafinado. Para tempos superiores a 10 s, o canal obtido no papel é parcialmente obstruído devido ao excesso de parafina transferido.

Como observado, a largura de 35 canais fabricados sequencialmente usando-se o mesmo molde apresentou valor médio de $2,6 \pm 0,2$ mm, ou seja, um desvio padrão relativo de 8%. Esse valor pode ser melhorado aprimorando-se o controle da pressão aplicada ao carimbo.

Pode-se observar que, com o carimbo desenvolvido, é possível gravar até 7 canais em uma folha de papel de filtro com diâmetro de 12,5 cm. Isso contribui para a redução de custo unitário para cada dispositivo.

Ensaio Colorimétrico para Glicose e Proteínas:

Os analitos escolhidos para realizar os ensaios colorimétricos foram a glicose e a proteína albumina bovina sérica, e os procedimentos experimentais foram baseados nos procedimentos reportados por Whitesides e colaboradores¹⁹.

A amostra padrão, ou biológica, pode ser inserida no ponto central do dispositivo e ser direcionada para as zonas de detecção sob ação do fluxo lateral.

O resultado obtido com os ensaios para glicose, ocorrem duas reações. A primeira é a reação de oxidação da glicose em ácido glucônico e peróxido de hidrogênio, esta catalisada pela enzima glicose oxidase. A segunda reação ocorre a redução do peróxido de hidrogênio e a oxidação de iodeto a iodo (I^- a I_2), esta catalisada pela enzima peroxidase. Este ensaio está associado na mudança de coloração de incolor para marrom, resultante da conversão do iodeto à iodo, o que indica qualitativamente a presença de glicose. Neste ensaio, o reagente de detecção é composto de duas soluções que são aplicados na zona de detecção do dispositivo de papel. A solução 1 consiste de 0,6 M de iodeto de potássio e 0,3 M de trealose, dissolvida em tampão fosfato 100 mM, pH 6,0. A solução 2 consiste de glicose oxidase 120 unidades/mL e peroxidase 30 unidades/mL (5:1), ambas na concentração de 1mg/mL. Inicialmente aplica-se 5 μ L da solução 1 na zona de detecção e espera 5 minutos para secar, em seguida aplica-se 5 μ L da solução 2 e espera secar pelo mesmo período de tempo. Por fim, aplica-se 13 μ L de padrão de glicose (dissolvido em água) no microcanal do dispositivo, com a finalidade desta ser transportada por fluxo lateral e assim chegar na zona de detecção contendo o reagente de cor imobilizado; depois de 15 minutos, o dispositivo é scanneado e a imagem é analisada por um software gráfico, em uma ferramenta chamada histograma, onde mede-se a intensidade média de pixels em cada região que desenvolveu coloração; esta intensidade obtida é correlacionada com a concentração do analito.

O resultado típico para o ensaio colorimétrico com a proteína albumina bovina sérica, o qual baseia-se na ligação não específica do corante azul de tetrabromofenol (TBPB) com proteínas através de uma interação eletrostática. A

mudança de coloração do TBPB de amarelo para azul, indica a presença de proteína. Neste ensaio, inicialmente aplica-se na zona de detecção 5 μ L de ácido cítrico 250 mM (pH 1,8), com a finalidade de desnaturar as proteínas do papel. Em seguida aplica-se 5 μ L do TBPB na concentração de 3 mM, dissolvido em etanol. Por fim, aplica-se 13 μ L de padrão de BSA (dissolvido em tampão fosfato 100 mM, pH 6,0) no microcanal do dispositivo. Então, o dispositivo é scaneado depois de 10 minutos e o procedimento realizado para correlacionar intensidade de cor com concentração é o mesmo realizado no ensaio de glicose.

Faixa Clínica para os Ensaio de Glicose e Proteínas:

O processo apresenta uma curva de calibração para o ensaio colorimétrico de glicose, para concentrações de 0 a 50 mM. Como pode-se observar, o ensaio apresentou linearidade apenas na faixa entre 0 e 12 mM, o que é ideal para os ensaios clínicos com amostras biológicas (soro e urina). O limite de detecção obtido (0,14 mM) permite a diagnósticos de proteinúria, por exemplo, na urina. A faixa clínica obtida (com comportamento linear) também permite o diagnóstico de diabetes, usando-se a urina como amostra biológica.

No andamento do processo a uma curva de calibração para a albumina bovina sérica (BSA), a qual exibiu um comportamento exponencial em relação ao aumento da concentração. Mesmo assim, a faixa obtida permite diagnosticar diferentes doenças renais, causadas por distúrbios nos níveis de concentração de proteínas totais e também na albumina, que representa 70% do total de proteínas.

Focalização Isoelétrica (IEF):

O processo apresenta uma imagem resultante da geração de um gradiente de pH, que é utilizado na separação de proteínas a partir do ponto isoelétrico (pI). Inicialmente, o microcanal do dispositivo foi preenchido com uma solução comercial do anfólito Bio-LYTE 3-10 (adquirido junto à Bio-Rad). Em seguida coloca-se em um reservatório uma solução 50 mM de ácido fosfórico (H_3PO_4), que é o ânólito, e no outro reservatório uma solução 50 mM de hidróxido de sódio (NaOH), que é o cátólito. A geração do gradiente de pH é obtida aplicando um potencial de 210 V durante 30 minutos, do ânólito para o cátólito; para verificar

se o gradiente de pH é formado, o dispositivo é embebido com um indicador ácido-base (como por exemplo, o vermelho de metila e o azul de bromotimol). Para a separação das proteínas, basta aplicar uma mostura de proteína no dispositivo contendo o gradiente de pH gerado sob uma aplicação de potencial elétrico. As proteínas serão focalizadas em uma determinada região do dispositivo, onde $\text{pH} = \text{pI}$.

Eletroforese com detecção condutométrica sem contato:

O processo apresenta um esquema da montagem dos dispositivos de papel para eletroforese. Inicialmente os dispositivos de papel foram colocados em contato com uma transparência revestida com resina termossensível. Em seguida, furos foram confeccionados nos reservatórios extremos para se ter acesso aos microcanais. Após essa etapa, fez-se o alinhamento e a laminação térmica resultando em um dispositivo robusto para análise eletroforética. Após a laminação, reservatórios para soluções foram criados usando-se abase de ponteiros de 100 μL , que foram colados nos dispositivos usando-se a resina epóxi bicomponente. Para detecção condutométrica sem contato, dois eletrodos foram confeccionados com fita adesiva de cobre e posteriormente colados sobre a transparência. Nesse caso, a espessura da transparência promove o isolamento elétrico necessário dos eletrodos com o microcanal.

O procedimento experimental utilizado na eletroforese. O chip desenvolvido conforme descrição anterior foi conectado a uma fonte de alta tensão para aplicação de um campo elétrico. Para introdução da amostra, fez-se um furo no dispositivo para promover a injeção via gotejamento (injeção hidrostática).

O processo apresenta um eletroferograma obtido para a separação de cátions inorgânicos (K^+ , Na^+ e Li^+ , 1 mM cada). Na análise dos cátions, foi injetado 1 μL de uma mistura equimolar de em um dispositivo no formato de um canal único, com comprimento total de 50 mm e comprimento efetivo de 40 mm. O tampão de corrida utilizado foi uma solução de ácido 2-morfolino-etanosulfônico (MES) e Histidina (His), 20 mM cada (pH 6,1). O potencial de separação foi de 500 V. Para detecção utilizou-se uma frequência de 477,1 KHz

e amplitude de 2,2 V_{p-p} . Foi possível analisar os três cátions em menos de 350 segundos.

O processo apresenta um eletroferograma para separação e detecção de BSA. Assim como na análise dos cátions, injetou-se 1 μL de uma solução padrão de BSA 250 μM . O tampão de corrida utilizado foi uma solução de MES/His 25 mM (pH 6,1). O potencial de separação foi de 500 V. Para detecção, utilizou-se uma frequência de 518,4 KHz e amplitude de 2,9 V_{p-p} . O tempo de análise para a BSA foi de 200 segundos, que é um curto tempo de análise, por se tratar da análise de uma macromolécula; mostrando assim a potencialidade dos dispositivos da referida invenção.

Referências

- [1] Gobbi, A. L.; Kubota, L. T.; Piazzetta, M. H. O.; Crouchan, M. S. K.; Passos, R. F. C. Dispositivo de separação cromatográfica em papel associada à detecção eletroquímica, método de operação e uso do referido dispositivo. BR 1011116, 2010.
- [2] Carrilho, E.; Da Silva, J. A. F.; Coltro, W. K. T. Aparelho Detector sem contato para Biossensores microfluídicos. BR 0905675-0 A2, 2009.
- [3] Lode, P. V. Point-of-care immunotesting: Approaching the analytical performance of central laboratory methods. Clin. Biochem. 2005, 38, 591-606
- [4] Carrilho, E.; Phillips, S. T.; Vella, S. J.; Martinez, A. W.; Whitesides, G. M. Paper Microzone Plates. Anal Chem. 2009, 81, 5990-5998.
- [5] Martinez, A. W. Phillips, S. T.; Carrilho, E.; Whitesides, G. M. Diagnostics for the Developing World: Microfluidic paper-based analytical devices. Anal. Chem. 2010, 82, 3-10
- [6] Olkkonen, J.; Lehtinen, K.; Erho, T. Flexographically Printed Fluidic Structures in paper. Anal. Chem. 2010, 82, 10246-10250
- [7] Li, X; Ballerini, D. R.; Shen, W. A perspective on paper-based microfluidics: Currents status and future trends. Biomicrof. 2012, 6, 11301-1 -11301-13
- [8] Yager, P.; Domingo, G. J.; Gerdes, J. Point-of-Care Diagnostics for Global Health. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2008, 10, 107-144

- [9] Carrilho, E.; Martinez, A. W.; Whitesides, G. M. Understanding Wax Printing: A simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Anal. Chem.* 2009, 81, 7091-7095
- [10] Bruzewicz, D. A.; Reche, M.; Whitesides, G. M. Low cost printing of Poly (dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper. *Anal. Chem.* 2008, 80, 3387-3392
- [11] Dungchai, W.; Chailapakul, O.; Henry, C. S. A low-cost simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax-screen-printing. *Analyst*, 2011, 136, 77
- [12] Zhang, A.; Zha, Y. Fabrication of paper-based microfluidic device using printed circuit technology. *AIP Advances*, 2012, 2, 22171
- [13] Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Wiley, B. J.; Gupta, M.; Whitesides, G. M. FLASH: A rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. *Lab on a chip*, 2008, 8, 2146-2150
- [14] Whitesides, G. M.; Phillips, S. T.; Martinez, A. W.; Butte, M. J.; Wong, A. Thomas, S. W.; Sindi, H.; Vella, S. J.; Carrilho, E.; Miricca, K. A.; Liu. Y. Lateral flow and flow-through bioassay devices based on patterned porous media, methods of making same, and methods of usings same. US 8.377710- B2, 2013.
- [15] Whitesides, G. M.; Phillips, S. T.; Martinez, A. W.; Butte, M. J.; Wong, A. Thomas, S. W.; Sindi, H.; Vella, S. J.; Carrilho, E.; Miricca, K. A.; Liu. Y. Lateral flow and flow-through bioassay devices based on patterned porous media, methods of making same, and methods of usings same . US 2009-0298191 A1, 2009.
- [16] Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Wiley, b.; Whitesides, G. M. Methods os Patterning Paper. WO 2010/022324 A2, 2010.
- [17] Carrilho, E.; Martinez, A. W.; Whitesides, G. M. Methods of micropatterning paper-based microfluidics. WO 2010/102294 A1, 2010.
- [18] Muller, R. H.; Clegg, D. L. Automatic paper Chromatography. *Anal. Chem.* 1949, 21 (9), 1123-1125
- [19] Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Carrilho, E. Thomas III, S. W.; Sindi, H.; Whitesides, G. M. Simple Telemedicine for developing regiuons: Camera Phones

and paper-based microfluidic devices for real-times, off-site diagnosis. *Anal. Chem.* 2008, 80, 3699-3707

REIVINDICAÇÕES

“MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE DISPOSITIVOS ANALÍTICOS EM SUBSTRATOS DE PAPEL: DEPOSIÇÃO DE BARREIRAS HIDROFÓBICAS DE PARAFINA A PARTIR DO PROCESSO DE ESTAMPAGEM A QUENTE E 5 USO DOS REFERIDOS DISPOSITIVOS”

1. Processo de microfabricação de dispositivos microfluídicos em papel, **caracterizado** pelo fato de compreender:

um sistema de estampagem a quente empregando-se um carimbo metálico construído em aço inox sobre um sanduíche de papéis contendo papel
10 parafinado e papel não parafinado.

barreiras hidrofóbicas transferidas para o substrato de papel a partir da etapa de estampagem.

2. Processo de microfabricação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato do carimbo apresentar sistema automatizado para
15 aquecimento, pressão e controle do tempo.

3. Processo de microfabricação, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado** pelo fato do processo envolver uma prensa térmica, ao invés de um carimbo, para promover a transferência de uma determinada quantidade de parafina para o papel.

20 4. Processo de microfabricação, de acordo com as reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato da parafina ser substituída por qualquer outro material com propriedades termoplásticas.

5. Processo de microfabricação, de acordo com as reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato do dispositivo de papel ser laminado com filmes de
25 poliéster contendo resina termoplástica para evitar evaporação ou permitir a aplicação de bombeamento eletrocinético da solução.

6. Sistema microfluídico fabricado por estampagem a quente, de acordo com as reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato do dispositivo resultante ser usado para detecção colorimétrica de ensaios clínicos.

30 7. Sistema microfluídico fabricado por estampagem a quente, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato das zonas apresentarem respostas

seletivas aos ensaios de glicose, proteínas totais e outras espécies clinicamente relevantes.

8. Sistema microfluídico fabricado por estampagem a quente, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato do dispositivo ser aplicado de maneira análoga para outros ensaios clínicos, como tuberculose, Dengue, doença de Chagas, leishmaniose, gripe A, sífilis, HIV, câncer, testes de gravidez, dentre outras.

9. Sistema microfluídico fabricado por estampagem a quente, de acordo com as reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato do dispositivo resultante ser usado para aplicações eletroforéticas, nas quais se aplica um potencial para gerar um gradiente de pH, ou campo elétrico para promover a separação de espécies de acordo com suas mobilidades eletroforéticas ou tamanho.

10. Sistema microfluídico fabricado por estampagem a quente, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato do dispositivo ser integrado com detecção condutométrica sem contato.

11. Sistema microfluídico fabricado por estampagem a quente, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato dos eletrodos serem integrados ao dispositivo pela fixação de fitas adesivas de cobre ou alumínio.

12. Sistema microfluídico fabricado por estampagem a quente, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato dos eletrodos serem integrados ao dispositivo pela deposição metálica por sputtering ou evaporação de qualquer material metálico.

13. Sistema microfluídico fabricado por estampagem a quente, de acordo com as reivindicações 10 a 12, **caracterizado** pelo fato dos eletrodos serem integrados ao dispositivo pela inserção de grafite, pó de grafite, pasta de carbono, cola de prata ou outro material condutor ao substrato de papel.

14. Sistema microfluídico fabricado por estampagem a quente, de acordo com as reivindicações 10 a 14, **caracterizado** pelo fato dos eletrodos apresentarem contato físico com a solução, permitindo a detecção condutométrica com contato.

15. Sistema microfluídico fabricado por estampagem a quente, de acordo com

as reivindicações 1 a 14, **caracterizado** pelo fato do papel ser substituído por qualquer outro material poroso susceptível a formação de barreiras hidrofóbicas a partir da transferência térmica.

RESUMO

“MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE DISPOSITIVOS ANALÍTICOS EM SUBSTRATOS DE PAPEL: DEPOSIÇÃO DE BARREIRAS HIDROFÓBICAS DE PARAFINA A PARTIR DO PROCESSO DE ESTAMPAGEM A QUENTE E
5 **USO DOS REFERIDOS DISPOSITIVOS”**

Campo da invenção

A presente invenção refere-se à fabricação de dispositivos microfluídicos em papel a partir do uso de um carimbo metálico para definir canais para análises químicas mediante ao depósito térmico de barreiras hidrofóbicas de parafina. O
10 processo de fabricação baseia-se em uma simples etapa de carimbagem, ou estampagem a quente. Os dispositivos resultantes podem ser utilizados, em conjunto, com vários tipos de detecção como, por exemplo, a detecção amperométrica a detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C⁴D) e a detecção colorimétrica. A presente invenção pode ser
15 utilizada em diversas aplicações químicas incluindo técnicas de separação como, por exemplo, eletroforese em solução livre (em zona) e focalização isoelétrica de proteínas, bem como ensaios rápidos dedicados a diagnósticos de espécies clinicamente relevantes tais como, glicose, proteínas e colesterol, que estão diretamente relacionadas a algumas patologias clínicas.