

ESTUDO DE TÉCNICAS DE MICROFABRICAÇÃO PARA CONFECÇÃO DE SISTEMAS DE MICROANÁLISE TOTAL POR REPLICAÇÃO EM MICROMOLDES METÁLICOS: UMA INTERAÇÃO ENTRE ANÁLISE LABORATORIAL E ENGENHARIA DE FABRICAÇÃO

C. L. F. de Assis¹, S. K. Pereira²

¹Instituto Federal de São Paulo, Campus Votuporanga

²Centro Universitário de Votuporanga

¹Av. Jerônimo Figueira da Costa, 3014 - Pozzobon, Votuporanga-SP / CEP: 15503-110

¹fazolocla@ifsp.edu.br

RESUMO

Sistemas de microanálise total (μ TAS) são dispositivos microfluídicos capazes de realizar reações químicas em microescala, importantes na detecção para prevenção e tratamentos de diversas patologias. Este trabalho apresenta uma revisão da literatura em microanálise clínica, relacionada a possibilidade de fabricação de dispositivos microfluídicos por meio de replicação em micro moldes metálicos. O emprego de processos de microusinagem, em particular o microfresamento, favoreceria a produção de micromoldes complexos e com alta razão de aspecto. Com base no estudo de trabalhos acadêmicos, há a viabilidade de desenvolvimento de novas microestruturas multicanaís para a microanálise laboratorial, aplicando o microfresamento na produção de dispositivos poliméricos por meio de micromoldes, com controle do acabamento para o escoamento de micro ou nanofluidos, maior complexidade geométrica e possibilidade de otimização da produção.

Palavras-chave: Microanálise clínica, Microfabricação, Microfresamento, Micromoldes.

1. INTRODUÇÃO

O avanço dos recursos tecnológicos traz informações precisas, importantes e úteis, auxiliando a interpretação médica na investigação e diagnóstico de diversas doenças ⁽¹⁾. Atualmente as técnicas de análises analíticas fornecem subsídio para o prognóstico e diagnóstico de doenças infecciosas e genéticas, estudos de vínculo genético, fármaco-genômica dentre outras soluções em pesquisa científica e clínica, e análises em diversas áreas ^(2,3).

Os sistemas de microanálise total (μ TAS) têm capacidade de integrar vários processos em um único dispositivo ⁽⁴⁾. Oferecem plataformas eficientes para análise simultânea em estudos de genoma, proteoma, metaboloma dentre outros ^(2,5). Processos convencionais de fabricação são os métodos mais utilizados na preparação dos μ TAS, porém a pesquisa por métodos alternativos e economicamente viáveis, continua sendo um objetivo permanente ⁽⁶⁾.

A viabilidade de técnicas de microfabricação para a construção de sistemas de detecção são objetivos apresentados em trabalhos que, geralmente, apresentam separações de catecolaminas como compostos modelos, buscam estabilidade mecânica, facilidade na fabricação e desvio eficaz de altas correntes de separação ⁽⁷⁾. A busca pela simplicidade do processo de fabricação, a produção de dispositivos multicanais de separação de alta qualidade e baixo custo generalizado, chama a atenção da comunidade científica ⁽⁸⁾.

Outros fatores limitantes como a geometria do dispositivo (razão de aspecto), rugosidade dos microcanais, fidelidade de replicação e limites de detecção, influenciam na escolha do modo de separação, método de detecção, na técnica de fabricação e material utilizado, mediante cada analito para análise ^(4,9,10,11,12).

Considerando os aspectos apresentados, os quais relacionam microanálise laboratorial e técnicas de microfabricação para construção dos microdispositivos analíticos, a importância de uma pesquisa específica, visando os modos de detecção e o conhecimento das técnicas de fabricação existentes, e suas possíveis contribuições para o avanço da microanálise, constitui o cerne de projetos mais amplos, nos quais novas microestruturas microcanais sejam factíveis, e o diagnóstico e análises farmacológicas possam avançar nas contribuições para a área clínica.

2. LITERATURA REFERENTE A FABRICAÇÃO DE DISPOSITIVOS PARA MICROANÁLISE CLÍNICA E LABORATORIAL.

Sistemas de microanálise total, também conhecidos como μ TAS, *lab-on-a-chip*, LOC's, microchips ou microdispositivos, são de fácil automação pois transformam informações químicas em sinais elétricos ou ópticos ⁽¹³⁾. Desde a introdução da micromanufatura no final da década de 1950, a fabricação de sistemas de microanálise total aumentou o interesse da área biomédica ⁽¹⁴⁾. O desenvolvimento de microsistemas combinado com funções elétricas e mecânicas, possibilita integrar várias etapas analíticas em um único dispositivo, com funções microfluídicas, de micropoços e microcanais e de elementos que interagem com os fluidos, tais como eletrodos, fotodetectores, sensores químicos, válvulas e bombas ⁽¹⁵⁾. A Figura 1 apresenta exemplos de dispositivos microanalíticos para as mais diversas funções.

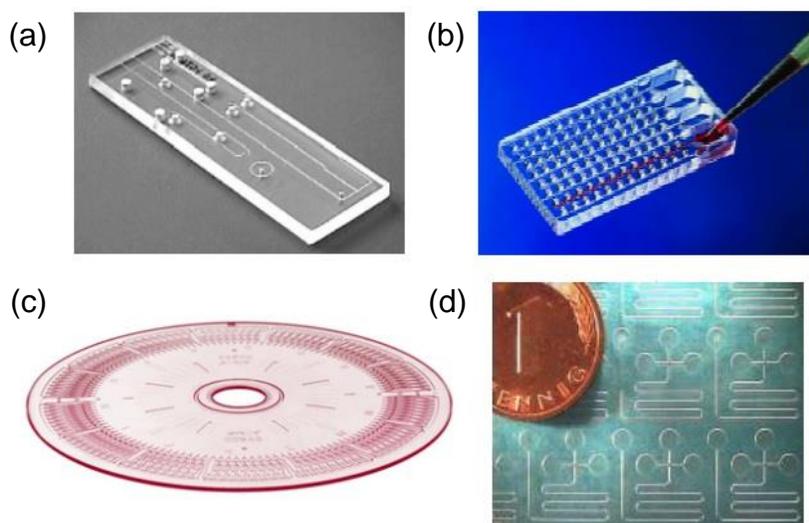


Figura 1. Exemplos de microdispositivos analíticos. (a) Circuito microfluídico de PMMA, (b) Placa de micropoços, (c) *Lab-on-chip* em formato de CD e (d) Sistema de eletroforese capilar ⁽¹⁵⁾.

Com o investimento em desenvolvimento de tecnologia microfluídica por empresas comerciais em meados da década de 1990, outros materiais como cerâmicas, metais e polímeros, além do vidro e silício, foram testados na fabricação dos dispositivos, utilizando-se de técnicas de fabricação de estampagem a quente,

moldagem por injeção, ablação a laser, litografia macia ou fotolitografia ⁽¹¹⁾. Além das técnicas de fabricação descritas anteriormente, são usadas também como técnicas alternativas, a impressão direta e a estampagem a frio ^(12, 13).

É de fundamental importância para cada analito, escolher o método de análise, modo de detecção, técnica de fabricação e material usado. A incompatibilidade do material com o analito e a deformação geométrica no processo de microfabricação, geram prejuízo na resposta final da análise ⁽¹¹⁾. A opacidade em comprimento de onda visível, utilizando como material o silício, e a instabilidade em diferentes temperaturas promovem desvantagem para o microsistema de análise ⁽¹⁵⁾. O silício foi o substrato pioneiro na construção de circuitos integrados, porém, devido ao seu alto custo e propriedades físicas, químicas e elétricas limitadas, foi substituído pelo quartzo e o vidro ^(13, 16).

É importante considerar a escolha do material usado na fabricação dos μ TAS, já que o analito pode interagir com o material utilizado, sendo adsorvido ou absorvido nas paredes do canal. Além dos materiais de primeira escolha na indústria microeletrônica, como silício, vidro ou quartzo, mais recentemente a utilização de polímeros como substrato vem sendo usado para a aplicação de μ TAS, como o polimetacrilato de metila (PMMA), policarbonato (PC), copolímero de olefina cíclica (COC), politereftalato de etileno (PET), poliuretana, polidimetilsiloxano (PDMS). O propósito na aplicação destes materiais é a busca por propriedades elastoméricas, transparência ótica, permeabilidade gasosa, biocompatibilidade, fácil moldagem, manuseio e selagem, relativa alta resistência química, baixo custo de fabricação com boa resolução dos microcanais ⁽¹⁶⁾.

Um comparativo feito entre vidro, PDMS e PET, utilizando fotolitografia, réplica de molde e impressão direta respectivamente, revelou que o PDMS apresenta baixa dissipação de calor em comparação ao vidro, o PET exibe menor fluxo eletro osmótico (EOF) entre todos os substratos, sendo estes dispositivos úteis em separações em que o EOF não precisa ser suprida com aplicações biológicas e DNA, contornando a necessidade de revestimento dos canais. Porém, o PET apresenta baixa eficiência de separação, baixa resolução e comprimento de injeção ⁽¹³⁾. A variância foi suprida pelo revestimento do canal em vidro e PDMS. Em PET a rugosidade da parede do canal é

responsável pelo baixo desempenho, representando um desafio como a mobilidade eletroforética ⁽¹⁴⁾.

3. INTERAÇÃO ENTRE MICROANÁLISE E ENGENHARIA DE FABRICAÇÃO

Dispositivos com geometrias em escala micrométrica surgiram com o propósito de facilitar o acesso a fenômenos físicos e biológicos que dificilmente ocorreriam em condições convencionais, como por exemplo, a propriedade de capilaridade que em microcanais ocorrem de forma natural e sem a aplicação de pressão para forçar o escoamento de microfluidos ⁽¹⁷⁾. Contudo, com o avanço destes dispositivos, houve também a necessidade do surgimento de processos de fabricação para tornar possível a manufatura de sistemas multicanais com geometrias em escala reduzida e até mesmo complexas em alguns casos ⁽¹⁸⁾.

Sistemas de microanálise total dependem das interações líquido-superfície para garantir a eficiência durante sua aplicação, as quais são influenciadas pela rugosidade. Ao produzir características geométricas específicas em superfícies rugosas, o regime de escoamento de microfluidos pode ser aprimorado. Como exemplo, com a redução da área de contato, as forças de adesão são minimizadas ⁽¹⁹⁾.

Algumas técnicas de microfabricação têm sido utilizadas para produzir superfícies rugosas como a deposição galvânica sem eletricidade, a qual reveste um substrato de metal com uma camada de textura de um segundo metal ⁽²⁰⁾. Contudo, para prover canais com diferentes molhabilidades, a remoção mecânica da cobertura superficial é necessária ⁽²⁰⁾.

Estabelecendo uma relação com a produção de micromoldes, seria mais interessante gerar uma superfície rugosa diretamente na peça, sem a necessidade de outras etapas de fabricação, simplificando a manufatura, reduzindo horas de trabalho e custos de produção. Além disso, o processo de manufatura utilizado deveria ser capaz de reproduzir geometrias complexas, seguindo as inovações geométricas dos microdispositivos ⁽²¹⁾.

Microcanais gerados por microfresamento podem ser utilizados para ligação ou como componentes de uma variedade de dispositivos microfluídicos. A microfluídica é um campo emergente que tem dado origem a um grande número de desenvolvimentos

científicos ⁽²²⁾. Neste sentido, o microfresamento apresenta uma boa concordância na busca por controle micro geométrico da superfície e usinagem de materiais intangíveis por outras técnicas de microfabricação ⁽²⁰⁾.

No campo da microanálise clínica, um dos grandes problemas encontrados na fabricação destes microdispositivos é o controle do acabamento dos microcanais, visando a obtenção de superfícies com micro geometrias que favorecessem a capilaridade, molhabilidade e escoamento de microfluidos ⁽²³⁾. Sendo assim, estudos sobre o processo de fabricação por microfresamento foram intensificados. Apesar do processo de microfresamento ser interessante para a geração de microestruturas 3D complexas, pesquisas são necessárias para minimizar os efeitos da microestrutura do material da peça durante o corte em microescala ⁽²⁴⁾.

Para melhor compreensão, para a fabricação de micromoldes metálicos com estruturas micrométricas, a microestrutura do aço, por exemplo, afeta o processo de fabricação. Um aço com microestrutura bifásica tende a prejudicar o controle do acabamento da superfície dos microcanais, pois a ferramenta utilizada no microfresamento atravessa uma porção mais dura do material e em outro momento uma parte mais mole ou dúctil ⁽²⁵⁾.

Algumas pesquisas procuram propor soluções para este problema inerente a microusinagem de materiais com diferentes durezas em sua microestrutura. Como exemplo, poderia ser feito o uso de metais de microestrutura homogênea, sem variações de dureza ao longo do material. Para isso, experimentos de microfresamento em materiais de microestrutura homogênea e heterogênea foram conduzidos visando provar esta hipótese, revelando melhor controle do acabamento na microusinagem de aço com grãos ultrafinos ferríticos ⁽²⁶⁾.

Considerando estes aspectos, o uso de micromoldes metálicos seria uma alternativa viável para a produção seriada de dispositivos para microanálise laboratorial. A replicação do processo de fabricação via injeção de material polimérico, garante repetibilidade da geometria dos microcanais, e mais importante ainda, a repetibilidade da rugosidade destes microcanais.

Estudos voltados ao controle da formação de características específicas em superfícies microusinadas, visando regular o escoamento de micro ou nano fluídos, têm

sido realizados. A microgeometria das superfícies usinadas pode ser feito via adequação de parâmetros de corte no microfresamento, associado a parâmetros de rugosidade correlacionados para uma completa caracterização dos microcanais ⁽²⁷⁾.

Além disso, processos de manufatura aditiva associados a operações de microfresamento também vem sendo pesquisados. O objetivo é aplicar o conceito de manufatura híbrida à fabricação de microdispositivos, resolvendo problemas de anisotropia dos corpos de prova metálicos produzidos por mecanismos de deposição de material, aplicando combinações específicas de parâmetros de usinagem ⁽²⁸⁾.

Conforme apresentado, utilizar a técnica de fabricação por microfresamento para gerar as microestruturas e superfícies dos micromoldes tem se mostrado um caminho consistente com a redução de etapas de fabricação, controle da rugosidade e viabilidade de geometrias mais complexas que as atualmente existentes, principalmente quando a necessidade de novos sistemas multicanais com maior variedade geométrica é requerida. Custos podem ser reduzidos, pois a injeção de resinas poliméricas com auxílio de máquinas injetoras pode promover uma redução significativa de custos de produção via replicação por micromoldes, quando comparado com processos de microfabricação como a litografia, por exemplo.

Um exemplo dos possíveis avanços proporcionados pela técnica seria a própria fármaco-genômica, a qual vem evoluindo rapidamente entre o diagnóstico da doença e a terapia adaptada às características de um indivíduo ⁽²⁹⁾. A busca pela integração de várias plataformas para medir diversos biomarcadores simultaneamente, traz inovações na construção de matrizes de DNA/anticorpos, a fim de permitir que imuno ensaios e testes de ácidos nucleicos sejam realizados em um único dispositivo ou sistema multicanais ⁽²⁹⁾.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma revisão da literatura sobre microanálise clínica e processos de microfabricação foi realizado, visando vislumbrar a possibilidade de novas técnicas para a fabricação de dispositivos para microanálise clínica. Desta forma, considerando a argumentação científica e discussão anteriormente apresentadas, este trabalho apresenta as seguintes perspectivas:

- Sistemas de microanálise total são dispositivos eficientes para a realização de análises clínicas, ensaios farmacológicos, testes diagnósticos e segmentos de doenças, por intermédio do uso de placas multicanais com diferentes dimensões e distribuição de microcanais, conforme a necessidade da análise a ser realizada;
- A maioria das técnicas de fabricação empregadas para a fabricação de microdispositivos analíticos estão condicionados ou limitados ao tipo de material que pode ser trabalhado (metálico ou polimérico), geometria do dispositivo, capacidade de replicação, controle da rugosidade dos microcanais e qualidade final do produto;
- A técnica de microfabricação por microfresamento revelou eficiência na construção de dispositivos multicanais de maior complexidade geométrica, com possibilidade de replicação das placas por meio de micromoldes metálicos, assim como o controle da rugosidade dos microcanais;
- A aplicação do microfresamento, conciliado ao uso de materiais de microestrutura homogênea para confecção dos micromoldes, abre a possibilidade de fabricação de novos dispositivos, concebidos em estudos e projetos avançados na área de farmacologia, visando funções tecnológicas e laboratoriais além das atualmente existentes, como por exemplo, a construção de matrizes de DNA/anticorpos em um único sistema multicanais.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq) (processo 468609/2014-4) e a MMC Metal do Brasil (subsidiária Mitsubishi), pelo fomento à pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

01. ENGELMANN, K. Síntese de nanomarcadores luminescentes contendo íons terras raras para aplicação em testes de diagnóstico para a doença de Chagas. 2012, 140p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

02. HERRASTI SAINZ, Z.; RODRÍGUEZ VIEJO, J., 2015 “Superfícies nanoestruturadas para el desarrollo de biosensores electroquímicos e integración en un sistema de detección portable. 2015, 272P. Tese (Doutorado em Ciência dos Materiais) - Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Espanha.
03. NIKOLELI, G. P.; SIONTOROU, C. G.; NIKOLELIS, D. P.; SPYRIDOULA, B.; KARAPETIS, S.; TZAMTZIS, N. Biosensors Based on Microfluidic Devices Lab-on-a-Chip and Microfluidic Technology. Nanotechnology and Biosensors, Elsevier, p. 375-394, 2018.
04. SILVA, J. A. F. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. Química Nova, v. 26, n. 1, p. 56-64, 2003.
05. PONCE, J. A. L. Diseño Top-Down y primeros pasos de fabricación de un chip microfluídico como biosensor para el diagnóstico de virus del papiloma humano: desarrollo del mecanismo de manipulación analito. 2016, 49p. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas) – Instituto Potosino de Investigación Científica Y Tecnológica, A. C., San Luís Potosi, Mexico.
06. CERQUEIRA, M. R. F. Construção, caracterização e aplicação analítica de microdispositivos enzimáticos. 2016, 166p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de Juiz de Fora, Juiz de Fora.
07. SANTOS, M. S. F. Eletroforese capilar com derivatização eletroquímica de compostos neutros: novas aplicações, otimização e miniaturização do sistema em fluxo EC-CE-C4D. 2016, 138p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
08. GIMENEZ, T. D. Extração e amplificação de RNA do vírus da dengue em microchips de poliéster-toner (PeT). 2016, 69p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, Goiás.
09. GABRIEL, E. F. M. Avaliação do desempenho analítico de microssistemas eletroforéticos fabricados em poliéster-toner. 2012, 102p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
10. BRAGA, L. E. P. Fabricação de microssistemas eletroforéticos integrados com detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada. 2013, 94p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de

Química, Goiânia.

11. BECKER, H.; LOCASCIO, L. E. Polymer microfluidic devices. *Talanta*, v. 56, n. p.267-287, 2002.
12. JUNIOR, S. Sistemas microfluídicos em vidro, silício e Pdms. 2014, 146p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica, Campinas.
13. COLTRO, W. K. T.; PICCIN, E.; CARRILHO, E.; JESUS, D. P.; SILVA, J. A. F.; SILVA, H. D. T.; LAGO, C. L. Microssistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. *Química Nova*, v. 30, n. 8, p. 1986-2000, 2007.
14. MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M. Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing, *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 30, n. 3, p. 740-744, 1990.
15. ABGRALL, P.; GUE, A. M. Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem - a review. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, v. 17, n. 5, p. R15, 2007.
16. CAMPOS, R. P. S. Modificação de poli (dimetilsiloxano) para aplicações em micro sistemas de análise total. 2012, 89p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas.
17. SAISORN, S.; KAEW-ON J.; WONGWISES S. An experimental investigation of flow boiling heat transfer of R-134a in horizontal and vertical mini-channels. *Experimental Thermal and Fluid Science*, v. 46, p. 232-244, 2013.
18. CÂMARA, M. A.; CAMPOS RUBIO, J. C.; ABRÃO, A. M.; DAVIM, J. P. State of the art on micromilling of materials, a Review. *Journal of Materials Science and Technology*, v. 28, p. 673-685, 2012.
19. TAS, N.; SONNENBERG, T.; HANSEN, H.; LEGTENBERG, R.; ELWENSPOEK, M. Stiction in surface micromachining. *Journal Micromechanics and Microengineering*, v. 6, p. 385-397, 1996.
20. ASSIS, C. L. F. Fabricação de micro dissipadores de calor bio-inspirados por microfresamento. 2015, 52p. Relatório (Pós-doutorado em Engenharia de Produção) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brasil.

21. JENSEN, K. F. Microreaction engineering – is small better? *Chemical Engineering Science*, v. 56, p. 293-303, 2001.
22. PAPAUTSKY, I.; BRAZZLE, J.; SWERDLOW, H.; FRAZIER, A. B. A low-temperature IC-Compatible process for fabricating surface-micromachined metallic microchannels. *Journal of Microelectromechanical Systems* v. 7, p. 267-273, 1998.
23. LARMOUR, I. A., BELL S. E. J.; SAUNDERS G. C. Remarkably simple fabrication of superhydrophobic surfaces using electroless galvanic deposition. *Angewandte Chemie*, v. 46, p. 1710-1712, 2007.
24. MIAN, A.J.; DRIVER N.; MATIVENGA, P.T. Micromachining of coarse-grained multi-phase material. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part B: Journal of Engineering Manufacture*, v. 223, p. 377- 385, 2009.
25. ASSIS, C.L.F.; JASINEVICIUS, R.G; Rodrigues, A.R. Micro end-milling of channels using ultrafine-grained low-carbon steel. *International Journal Advanced Manufacture Technology*, v. 77, p. 1155-1165, 2015.
26. ASSIS, C.L.F. Microfresamento de aços com grãos ultrafinos. 2013, 82p.Tese (Doutorado em Manufatura) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.
27. ASSIS, C. L. F.; AZEVEDO, R. B. ; AZEVEDO, R. B. ;COELHO, R. T. Adequacy of roughness parameters to micro-endmilled channels surface evaluation. *Anais do EUSPEN's 18th International Conference & Exhibition, 2018, Venice (Italy)*. Northampton: Twenty10, 2018. p. 95-96.
28. COELHO, R. T.; AZEVEDO, R. B. ;ASSIS, C. L. F. An investigation of anisotropy on AISI 316L obtained by additive manufacturing (AM) measuring surface roughness after micro-endmilling operations. In: *EUSPEN's 18th International Conference & Exhibition, 2018, Venice (Italy)*. Northampton: Twenty10, 2018. p. 357-358.
29. BARRA, G.B.; CAIXETA, M. C. S. A. S. B.; COSTA, P. G. G.; SOUZA, C. F.; VELASCO, L. F. R. Diagnóstico molecular–passado, presente e futuro. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v. 43, n. 3, p. 254-260, 2011.

**STUDY OF MICROFABRICATION TECHNIQUES FOR THE MANUFACTURE OF
TOTAL MICROANALYSIS SYSTEMS BY REPLICATION IN METAL MICROMOLDS:
AN INTERACTION BETWEEN LABORATORY ANALYSIS AND MANUFACTURING
ENGINEERING**

ABSTRACT

Total microanalysis systems (μ TAS) are microfluidic devices able to perform chemical reactions at microscale, important in the detection for prevention and treatments of various pathologies. This paper presents a review of the literature on clinical microanalysis, related to the possibility of manufacturing microfluidic devices through replication in metallic micromolds. The use of micro-machining processes, in particular micromilling, would favour the production of complex micromolds with high aspect ratio. Based on the study of academic papers, it is feasible to develop new multi-channel microstructures for laboratory microanalysis, applying micromilling processes in the production of polymer devices by replication in micromolds, with control of the finishing for the flow of micro or nanofluids, geometric complexity and possibility of production optimization.

Keywords: Clinical microanalysis, Microfabrication, Micromilling, Micromolds.