

# EDITAL UNIVERSAL 2021 – CNPq

## PROJETO DE PESQUISA

### DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS GERADORES DE GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO ASSOCIADOS A BIOSENSORES PLASMÔNICOS PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DE DOENÇAS NEURO-DEGENERATIVAS

#### Equipe principal:

**Prof. Dr. Emerson Marcelo Girotto** (Coordenador)

Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá-Pr,

**Profa. Dra. Jaqueline de Carvalho Rinaldi** (Pesquisador)

Centro Universitário UniFatecie, Paranavaí-Pr.

**Prof. Dr. Alexandre Urbano** (Pesquisador)

Departamento de Física, Universidade Estadual de Londrina-Pr.

**Prof. Dr. Marcos Rogério Guilherme** (Pesquisador)

Faculdade de Eng. e Inovação Técnico Profissional (Feitep), Maringá-Pr.

**Prof. Dr. Marcos de Souza** (Pesquisador)

Departamento Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá-Pr.

#### Demais membros:

**Dr. Jean Halison de Oliveira** (Pesquisador)

Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá-Pr.

**MSc. Maiara Mitiko Taniguchi** (Aluno de Pós-Graduação)

Orientador: Prof. Emerson M. Girotto)

**MSc. Bento Pereira Cabral Júnior** (Aluno de Pós-Graduação)

Orientador: Prof. Emerson M. Girotto)

Setembro/2021

# Sumário

<b>1. RESUMO.....</b>	<b>4</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	7
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	7
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>9</b>
3.1. DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS .....	9
3.1.1. Confecção dos dispositivos microfluídicos em PDMS .....	9
3.1.2. Caracterizações dos coeficientes de concentração .....	10
3.1.3. Simulação computacional - COMSOL Multiphysics®.....	11
3.2. PLATAFORMA PLASMÔNICA .....	12
3.2.1. Nanofabricação e caracterização da plataforma plasmônica baseada em arranjos de nanoburacos.....	12
3.2.2. Biosensor SPR baseado em arranjo de nanoburacos acoplado ao dispositivo microfluídico gerador de gradiente de concentração.....	14
3.3. BIOSENSOR PARA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	16
3.3.1. Imobilização da proteína $\beta$ -amilóide.....	17
<b>4. EQUIPE DE TRABALHO E JUSTIFICATIVA DE ESCOLHA .....</b>	<b>18</b>
<b>5. PARCERIAS INSTITUCIONAIS NO BRASIL E NO EXTERIOR .....</b>	<b>21</b>
<b>6. RESULTADOS ESPERADOS .....</b>	<b>22</b>
<b>7. RELEVÂNCIA E IMPACTO DO PROJETO PARA O DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO, TECNOLÓGICO E DE INOVAÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>8. ATIVIDADES DE PESQUISA MAIS RELEVANTES E PRODUÇÃO GERADA, RELACIONADAS AO TEMA.....</b>	<b>25</b>
8.1. PROJETO DE PESQUISA NÚMERO 1 .....	25
8.1.1. Dados.....	25
8.1.2. Indicadores de produção.....	25
8.2. PROJETO DE PESQUISA NÚMERO 2 .....	28
8.2.1. Dados.....	28
8.2.2. Indicadores de produção.....	28
8.3. PROJETO DE PESQUISA NÚMERO 3 .....	30
8.3.1. Dados.....	30
8.3.2. Indicadores de produção.....	30
8.4. PROJETO DE PESQUISA NÚMERO 4 .....	32
8.4.1. Dados.....	32
8.4.2. Indicadores de produção.....	32

<b>9. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>36</b>
9.1. DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO GERADOR DE GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO BIOMOLECULAR .....	37
9.1.1. Fenômenos de Transporte .....	37
9.1.2. Tipos de escoamentos e o número de Reynolds .....	40
9.1.3. Modelo matemático para construção de sistemas de diluição em série.....	41
9.1.4. Identificação do tipo de processo de mistura em sistemas binários .....	46
9.2. RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIE (SPR).....	49
9.2.1. Biosensores SPR convencionais.....	52
9.2.2. Fenômeno SPR em nanoburacos e arranjos de nanoburacos.....	54
9.2.3. Biosensores SPR baseados em arranjos de nanoburacos .....	56
9.2.4. Biosensores SPR baseados em arranjos hexagonais.....	58
9.3. BIOSENSORES NA DETECÇÃO DA PROTEÍNA $\beta$ -AMILÓIDE .....	59
<b>10. CRONOGRAMA DETALHADO (36 MESES) .....</b>	<b>61</b>
<b>11. BIBLIOGRAFIA CITADA (INCLUINDO DOI) .....</b>	<b>62</b>

# 1. RESUMO

O desenvolvimento tecnológico caminha para a miniaturização de algumas tecnologias, não apenas por interesses econômicos, mas também pela portabilidade e sustentabilidade, assim como pela pressão logística e operacionalidade. Neste contexto, em termos gerais, esse projeto prevê avanços na produção de sistemas laboratoriais para geração de curvas de calibrações automáticas por meio de dispositivos microfluídicos com aplicabilidade em biosensores baseados em ressonância de plasmons de superfície (SPR).

Um dispositivo microfluídico gerador de gradiente de concentração é uma ferramenta de automatização muito atraente na substituição de um operador que elabora curvas de calibração, eliminando assim erros experimentais, principalmente na manipulação de soluções com baixas concentrações. Esse projeto prevê o desenvolvimento de um dispositivo gerador de gradiente de concentração não linear com duas entradas de fluxo, sendo uma para a solução concentrada do analito e outra para o diluente e 5 (ou mais) saídas de soluções com diferentes concentrações (a seguir denominado  $\delta$ -2x5-Y). A arquitetura dos microcanais, assim como o *design* para mistura de fluxos na geração de correntes de diferentes concentrações, serão construídos com base em cálculos matemáticos análogos a sistemas de circuitos elétricos (vide fundamentação teórica na p. 36). As concentrações de analitos nas soluções de saída do dispositivo serão caracterizadas por técnicas como espectroscopia de fluorescência e ultravioleta-visível (UV-Vis), as quais tem demonstrado capacidade em detectar um gradiente de concentração com perfil sigmoidal. O dispositivo microfluídico  $\delta$ -2x5-Y será acoplado a um sistema de biosensoriamento óptico SPR baseado em um conjunto de arranjos de nanoburacos confeccionados em um filme fino de ouro, que detectará e quantificará a biomolécula de interesse (ou marcador) que, em um primeiro momento, será a(s) biomolécula(s) relacionada(as) à doença de Alzheimer. Além disso, serão avaliadas diferentes formas e distribuições geométricas dos arranjos a fim de obter resultados mais confiáveis com respostas mais precisas. As medidas ópticas serão realizadas através da captação de imagens de luz transmitida pelos arranjos de nanoburacos conforme estes forem expostos aos fluxos de saída do dispositivo, um método já utilizado em nosso laboratório. Nessa configuração, após a otimização de parâmetros, o sistema

integrado deverá ser capaz de gerar uma curva de calibração de 5 pontos. Essa curva deverá ser usada para quantificar a concentração de uma biomolécula-teste (nesse caso usa-se frequentemente a albumina do soro bovino (BSA)) em uma amostra com concentração pseudo-desconhecida.

Sobre a Doença de Alzheimer (DA), pode-se afirmar que é a terceira causa de morte nos países desenvolvidos, perdendo apenas para câncer e doenças cardiovasculares. Os números alarmantes com relação à previsão de novos casos de DA nos próximos anos mostram a necessidade de diagnosticar essa demência precocemente e, conseqüentemente, possibilitar: a) um tratamento mais eficiente, b) o retardo da evolução da doença, c) a melhora da qualidade de vida dos portadores dessa condição. De acordo com resultados obtidos em nosso laboratório no que diz respeito à detecção de marcadores de câncer em baixíssimas concentrações, podemos afirmar que os biosensores baseados em SPR são uma alternativa promissora para a detecção da DA ainda em fase inicial. A alta sensibilidade desses dispositivos possibilita identificar a presença de proteínas em concentrações muito baixas. Nesse sentido, esperamos contribuir para o início do desenvolvimento de trabalhos utilizando um dispositivo SPR baseado em arranjos de nanoburacos (elemento acoplador) para a detecção da proteína  $\beta$ -amilóide (que é o principal biomarcador da DA). Vale a pena destacar também que a plataforma sensorial proposta nesse projeto estará associada a um módulo de diluição microfluídico inovador. Um complexo sistema de microcanais será usado para produzir soluções diluídas, a partir de uma solução padrão concentrada e do meio diluente. Dessa forma, poderá ser obtida uma curva de calibração de forma automatizada a partir de uma única injeção de soluções, sem necessidade de manipulação experimental. Assim, é esperado principalmente uma redução em erros experimentais. Além disso, a curva poderá ser obtida ao mesmo tempo que o sinal do antígeno ( $\beta$ -amilóide no caso da DA) é registrado. Portanto, além de diminuir o tempo e erros de manipulação, tal configuração deve excluir efeitos de flutuações elétricas (na fonte de luz e no detector), as quais podem ocorrer entre o momento do registro dos sinais para a curva de calibração e a amostra devido ao espaço temporal entre as medidas. Vale ressaltar ainda que a utilização de um sistema microfluídico tem outras importantes características tais como: uso

reduzido de reagentes, pequena quantidade de rejeitos, possibilidade de miniaturização, aumento na velocidade de análise, entre outros.

Enfim, além do desenvolvimento de uma plataforma biosensora inovadora como um todo, o projeto propõe corroborar com o atual estado-da-arte (incrementando) e possui potencial para aplicação comercial e registro de patente de propriedade intelectual, além de outros impactos e resultados esperados como discutidos nas seções 6 e 7.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar dispositivos microfluídicos geradores de gradientes de concentração específicos e reprodutíveis para moléculas com alta massa molecular e/ou baixo coeficiente de difusão, aplicados a quantificação de biomoléculas por meio de biosensoriamento SPR baseado em arranjos de nanoburacos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Confeccionar diferentes configurações para um dispositivo de diluição em série;
- ✓ Identificar pelo modelo matemático os coeficientes de concentração dos dispositivos propostos;
- ✓ Caracterizar experimentalmente a formação dos coeficientes de concentração dos dispositivos propostos;
- ✓ Caracterizar a formação dos coeficientes de concentração dos dispositivos propostos por simulações computacionais;
- ✓ Identificar efeitos no processo de diluição decorrentes das configurações das câmaras de mistura;
- ✓ Apresentar uma descrição matemática de reprodutibilidade do dispositivo proposto;
- ✓ Fabricar filmes finos de ouro sobre placas de vidro através de técnicas de deposição de metais;
- ✓ Perfurar os filmes finos de ouro com diferentes formas e distribuições geométricas de arranjos;
- ✓ Caracterizar as plataformas metálicas através de microscopias ópticas;
- ✓ Caracterizar as plataformas metálicas quanto a sensibilidade frente a biomoléculas padrão como a BSA (albumina de soro bovino);
- ✓ Acoplar o dispositivo microfluídico gerador de gradiente de concentração a plataforma plasmônica para um bioensaio de detecção;
- ✓ Realizar a imobilização de bioreceptor da proteína  $\beta$ -amilóide (marcador da Doença de Alzheimer) sobre arranjos de nanoburacos;
- ✓ Executar a detecção e quantificação das proteínas  $\beta$ -amilóide a partir de uma amostra com concentração desconhecida;

- ✓ Validar ou certificar as leituras do biosensor através da comparação com resultados de análises clínicas convencionais em mesma amostragem;
  - ✓ Avaliar a aplicação do sistema para o estudo de biomoléculas utilizadas como marcadores de outras doenças neuro-degenerativas (ex: doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica familiar, doença de Huntington, etc.).
- .



### 3. METODOLOGIA

Vale destacar nesse ponto que toda a infraestrutura necessária para o desenvolvimento desse projeto encontra-se na instituição executora. Equipamentos de grande porte, como por exemplo microscópios eletrônicos (FEI, FIB) encontram-se em nossa Central Analítica (Comcap-UEM), e os demais de pequeno e médio porte encontram-se em nossos próprios laboratórios ou laboratório locais do Departamento de Química.

#### 3.1. DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS

##### 3.1.1. Confeção dos dispositivos microfluídicos em PDMS

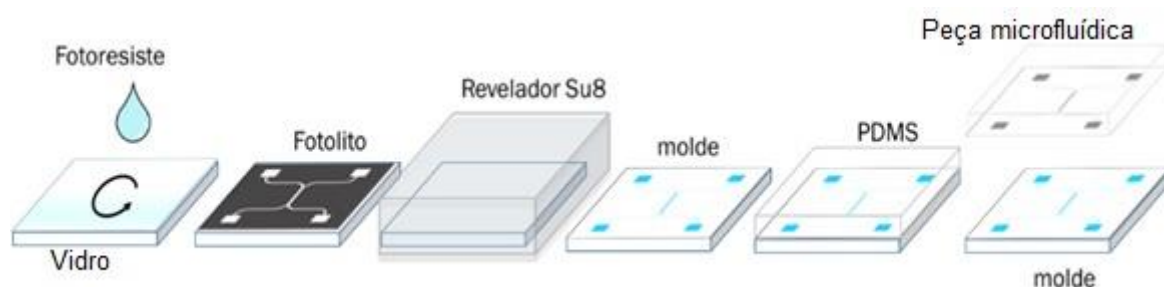
Os dispositivos microfluídicos serão confeccionados por meio da técnica *soft-lithography*, ou litografia macia. Os materiais a serem utilizados para a confecção do dispositivo microfluídico estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Materiais a serem utilizados no processo de construção do sistema microfluídico.

<b>Materiais</b>	<b>Marca</b>
Lâminas de vidro	-
Ácido sulfúrico	-
Peróxido de hidrogênio	-
Fotorresiste SU-8	Microchem®
Fotorrevelador SU-8	Microchem®
Polidimetilsiloxano (PDMS) e agente de cura	Sylgard 184®
Albumina de soro bovino (BSA)	Sigma Aldrich

As lâminas de vidro (dimensões adequadas a cada configuração de dispositivo) serão limpas em solução piranha (3:1; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e recobertas com fotoresiste (SU-100, Microchem®) utilizando um *spin coater* (Spincoating Systems, G3P-8), programado para rotacionar a 500 rpm por 5 s e acelerar por 8 s até 2000 rpm e, permanecer com essa rotação constante por mais 25 s. Os substratos serão então aquecidos por 6 minutos a 65 °C e por 25 minutos a 95 °C, respectivamente. As

fotomáscaras (fotolitos) com as configurações dos dispositivos serão confeccionadas no software AutoCAD® e impressas em politereftalato de etileno (PET) e em seguida serão ajustadas sobre o substrato com o fotoresiste. Será utilizada uma fotocolimadora ultravioleta (Tamarack Scientific, 2110CP) para fotografar os substratos com a fotomáscara em um período de 18,5 s a uma potência de 1000 W, demarcando assim as regiões por onde ocorre a transmissão da radiação no fotolito. Os substratos serão então revelados com o fotorevelador SU-8® (solução a base de lactato de etila) para extração do fotoresiste não fotopolimerizado. As peças microfluídicas serão enfim confeccionadas com uma mistura de polidimetilsiloxano (PDMS, Sylgard 184®) e o agente de cura na proporção de 10:1. As misturas serão desareadas por 30 min sob vácuo, despejadas sobre o molde positivo e curadas sob aquecimento a 95 °C por 2 h. A Figura 1 ilustra o processo de confecção de uma peça microfluídica de PDMS.



**Figura 1.** Esquema ilustrativo do processo de fabricação de uma peça microfluídica de PDMS.

### 3.1.2. Caracterizações dos coeficientes de concentração

Neste ponto é importante lembrar que temos dois tipos de sistemas microfluídicos: O primeiro utiliza uma peça microfluídica em PDMS acoplada a lâminas de vidro para produção do gerador de gradiente de concentração, e o outro utiliza uma peça microfluídica acoplada a lâminas de vidro contendo arranjos de nanoburacos de ouro para produção do biosensor plasmônico. Na caracterização e utilização do gerador de gradiente de concentração, utilizaremos uma bomba de seringa (Harvard Apparatus 11 Plus) para a injeção das soluções nos canais 1 e 2 (analito e diluente) sob velocidades ( $Q$ ) pré-estabelecidas (0,125 a 1,2 mL h<sup>-1</sup>). As

soluções misturadas coletadas nos canais de saída do dispositivo serão quantificadas por técnicas espectroscópicas.

A verificação da formação do gradiente de concentração, bem como a completa homogeneidade ao longo da secção de um canal, será verificada a partir de imagens obtidas utilizando um microscópio de fluorescência (TNI-06T-PL) com uma lente objetiva de ampliação de 4x, sob injeção de fluoresceína ( $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, 331,3 g mol<sup>-1</sup>, D (coef. Difusão) =  $5,0 \text{ E}^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). As imagens registradas serão manipuladas no *software* ImageJ®, as quais auxiliarão na interpretação do comportamento do soluto, tanto nas câmaras de misturas (tipo T e Y ou, *splitter* e *combiner*) quanto na determinação dos coeficientes de concentração. A quantificação das concentrações das amostras do soluto albumina de soro bovino (BSA, 300 µg mL<sup>-1</sup>, 66 kDa; D =  $5,9 \text{ E}^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) coletadas nos canais de saídas dos dispositivos serão realizadas monitorando a emissão fluorescente da BSA no comprimento de onda de 350 nm em um espectrofluorímetro (Varian, Cary-Eclipse). Para a quantificação da concentração de solutos-corante como azul de metileno ( $10 \text{ µg mL}^{-1}$ , 319,8 g mol<sup>-1</sup>, D =  $8,3 \text{ E}^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) e rosa de bengala ( $10 \text{ µg mL}^{-1}$ , 973,7 g mol<sup>-1</sup>; D =  $4,8 \text{ E}^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ), serão monitoradas as absorções máximas em 658 nm e 549 nm, respectivamente, por meio de um espectrofotômetro UV-Vis (Ocean Optics, USB2000).

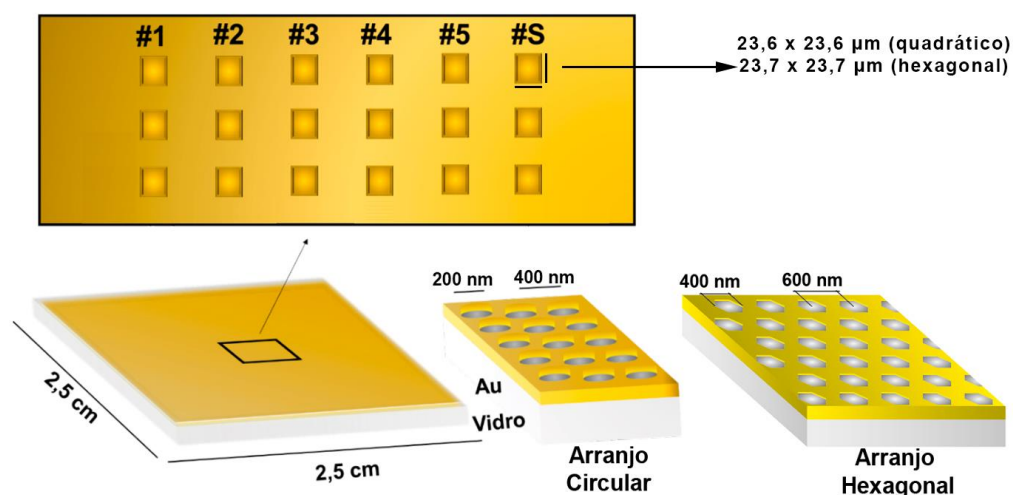
### 3.1.3. Simulação computacional - COMSOL Multiphysics®

As simulações computacionais serão realizadas utilizando modelos do tipo *Computational Fluid Dynamics* (CFD) por meio de métodos de elementos finitos e da teoria do contínuo, estabelecendo as condições de contorno programadas pelo usuário<sup>32,121–123</sup>. A partir do *software* COMSOL Multiphysics®, o dispositivo gerador de gradiente de concentração desenvolvido ( $\delta$ -2x5-Y) será simulado pelos modelos que descrevem a conservação de movimento do sistema em fluxo laminar pela equação de Navier-Stokes (Equação 4, vide p. 39) e pelo modelo de *Transport of diluted species* regidos pelas equações de continuidade para conservação de massa para sistemas incompressíveis, apresentando uma única fase e em estado estacionário<sup>11</sup>. A equação da Lei de Fick (Equação 18, vide p. 47) será utilizada para expressar o fluxo mássico, ou seja, a soma entre o transporte de massa convectivo e difusivo<sup>63</sup>.

## 3.2. PLATAFORMA PLASMÔNICA

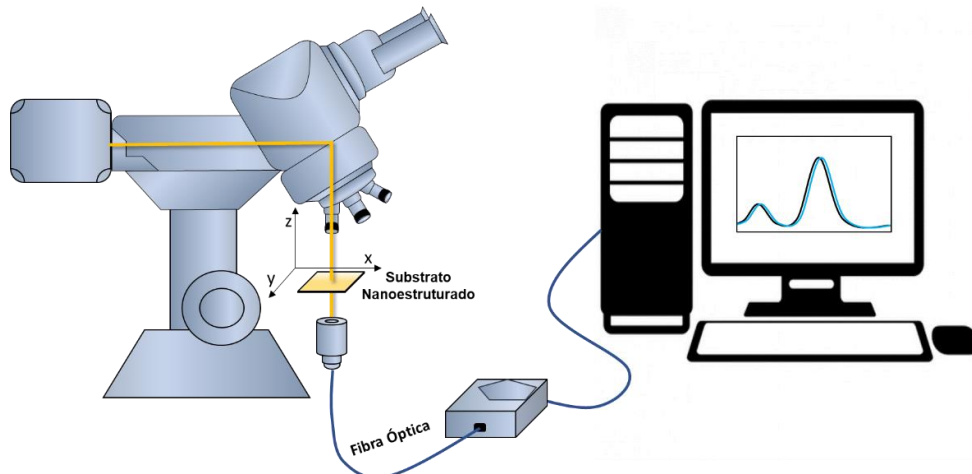
### 3.2.1. Nanofabricação e caracterização da plataforma plasmônica baseada em arranjos de nanoburacos

Será construída uma matriz de 3x6 arranjos de nanoburacos (18 no total) idênticos utilizando feixe de íons focados (microscópio FEI Scion equipado com FIB, instalado na instituição executora, Central Analítica) pela ação de uma fonte de íons gálio sobre um filme de ouro com 100 nm de espessura depositado sobre uma lâmina de vidro comum. Esses arranjos serão alinhados em distribuições quadráticas para o preparo de plataformas plasmônicas convencionais e também será realizado o estudo de arranjos com estruturas hexagonais objetivando sensores com diferentes respostas plasmônicas e sensibilidades mediante a presença do analito de interesse. Os arranjos serão numerados como #1, #2, #3, #4, #5 e #S (para o dispositivo  $\delta$ -2x5-Y onde #S é reservado para o analito-alvo). A potência do feixe para furar o filme de ouro será ajustada em 30 keV com uma taxa de *milling* de  $1,6 \text{ nm s}^{-1}$  e corrente de 300 nA. Cada arranjo será disposto a 300  $\mu\text{m}$  entre si sendo que, para a distribuição quadrática, cada arranjo possui uma configuração de 60 x 60 buracos circulares com diâmetro de 200 nm sob uma distância de 400 nm (periodicidade) entre os buracos (dimensão 23,6 x 23,6  $\mu\text{m}$ ). Para os substratos plasmônicos com distribuições hexagonais, os arranjos possuem configurações periódicas de buracos hexagonais de 400 nm ponta a ponta, com periodicidade de 600 nm, alinhados aos arranjos inferiores em um ângulo de 60°, garantindo uma distribuição periódica. A Figura 2 ilustra as configurações dos arranjos de nanoburacos, bem como as identificações adotadas para cada conjunto de arranjo. O substrato será caracterizado por imagens obtidas em um microscópio eletrônico de varredura, (MEV FEI Quanta, instalado na instituição executora, Central Analítica) e as dimensões dos arranjos (diâmetro e periodicidade dos buracos) serão determinadas com auxílio do *software* Image-Pro Plus®.



**Figura 2.** Ilustração da plataforma plasmônica contendo os respectivos dezoito arranjos de nanoburacos e suas dimensões geométricas.

A caracterização óptica dos modos SPs dos arranjos nanoestruturados será realizada conforme esquema ilustrado na Figura 3. Um feixe de luz branca (lâmpada de halogênio, 250 W) será colimado por meio de um espelho côncavo e uma lente objetiva (50 x) de maneira a atingir individualmente um arranjo de nanoburacos por vez. O substrato será posicionado em uma mesa xyz e exposto a um meio dielétrico de índice de refração 1,3327 (água milli-Q, 25 °C). A radiação transmitida (EOT=*extraordinary optical transmission*) por cada arranjo será coletada por uma fibra óptica conectada a um espectrofotômetro UV-Vis (Ocean Optics, USB2000) que, por sua vez, realizará o processamento dos espectros de transmissão no *software* Ocean Optics. Um dos arranjos será exposto a diferentes soluções de D-(+)-glucose com índices de refração que variarão entre 1,3361 a 1,4035. Os índices de refração serão determinados com auxílio de um refratômetro digital portátil (Atago, 3850 PAL-RI). Os espectros de transmissão serão registrados e a sensibilidade ( $\text{nm RIU}^{-1}$ ) será determinada ao correlacionar o deslocamento da banda EOT vs. índice de refração.



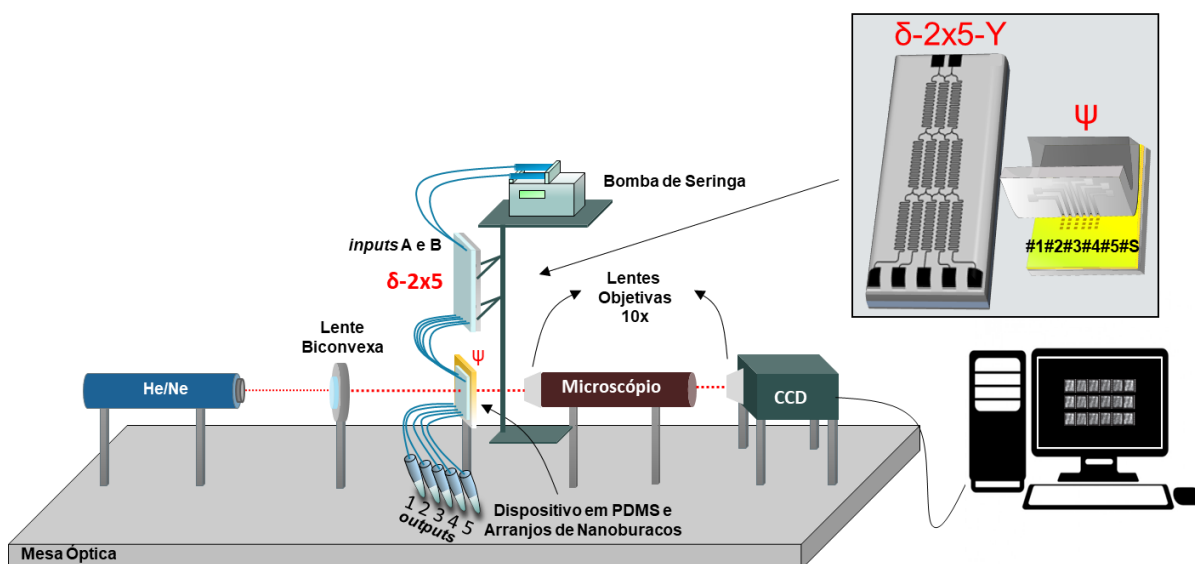
**Figura 3.** Esquema do *setup* experimental utilizado para a caracterização da EOT de cada arranjo.

### 3.2.2. Biosensor SPR baseado em arranjo de nanoburacos acoplado ao dispositivo microfluídico gerador de gradiente de concentração

Para a realização do bioensaio de quantificação de uma amostra pseudo-desconhecida de BSA no biosensor SPR baseado em arranjos de nanoburacos será necessário realizar o acoplamento entre os dois sistemas microfluídicos (o gerador do gradiente de concentração e o biosensor plasmônico). O dispositivo microfluídico  $\delta$ -2x5-Y, responsável pela geração do gradiente de concentração, será acoplado ao dispositivo microfluídico  $\psi$  (biosensor composto da peça de PDMS acoplada à plataforma plasmônica), de maneira a orientar os fluxos de saída sobre os conjuntos de arranjos nanoestruturados. A Figura 4 ilustra o *setup* experimental do bioensaio, assim como uma representação dos dispositivos  $\delta$ -2x5-Y e  $\psi$  no sistema integrado.

O método de aquisição de imagem será utilizado para monitorar os eventos bioquímicos sobre a superfície do biosensor SPR. A técnica consiste em monitorar a quantidade de EOT dos arranjos de nanoburacos ao passo que os eventos bioquímicos sobre a superfície do biosensor alterarem o índice de refração local. Para obter a EOT dos arranjos, um laser monocromático de He/Ne de 30 mW (CVI Melles Griot, 23-LHP-991-230) com emissão em 632,8 nm será posicionado sobre uma mesa óptica (CVI Melles Griot) e direcionado ao respectivo arranjo de nanoburacos. É importante destacar que o comprimento de onda em 632,8 nm é adequado para a geração de modos SPs nos arranjos de nanoburacos nas

dimensões confeccionadas<sup>100</sup>. Entre o substrato de ouro nanoestruturado e a fonte de radiação, será posicionada uma lente biconvexa (raios de curvatura  $R_1 = R_2 = 50$  mm) para ampliar a região de incidência do laser e um filtro (*beansplitter*,  $R = T = 50\%$ ) para diminuir a intensidade da radiação incidida ao substrato. A radiação transmitida pelo arranjo nanoestruturado será então magnificada por um microscópio óptico com uma lente objetiva de 10x e coletada por uma câmera CCD (Roper Scientific, coolsnapk4) também acoplada a uma lente objetiva de 10x.



**Figura 4.** Esquema do setup experimental para a realização do bioensaio de quantificação do analito-alvo pelo método de aquisição de imagens.

O reconhecimento biológico do analito BSA será realizado após a preparação da superfície do biosensor para reconhecimento da BSA. A modificação bioquímica será efetuada seguindo um procedimento amplamente reportado para a imobilização da BSA sobre a superfície de substratos de ouro<sup>124,125</sup>. Inicialmente, é injetado água milli-Q nos *inlets* A e B do dispositivo  $\delta$ -2x5-Y sob  $Q_A = Q_B = 1,000$  mL  $h^{-1}$  durante 30 min para purgar o sistema. Após 20 min de repouso, 75 imagens dos arranjos de nanoburacos serão registradas. Na sequência, serão injetadas soluções de ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA; 0,50 mmol  $L^{-1}$ ; 98%, Sigma-Aldrich) em álcool etílico a  $Q_A = Q_B = 0,500$  mL  $h^{-1}$  por 6h, e então uma mistura aquosa de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC; 0,1 mol.  $L^{-1}$ , 98%, Sigma-Aldrich) e N-hidroxisuccinimida (NHS; 0,1 mol  $L^{-1}$ ; 98%, Sigma-Aldrich) a  $Q_A = Q_B = 0,500$  mL  $h^{-1}$  durante 4h. Para a detecção e quantificação da proteína será injetado ao *inlet* A uma solução de BSA (300  $\mu g$   $mL^{-1}$ ) em tampão fosfato ((PBS,

pH 7,45; NaCl, 95,5%; KCl 99%; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 98%) e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 99%; ambos Sigma-Aldrich), enquanto que no *inlet* B será injetado somente PBS, ambos a  $Q_A = Q_B = 0,125 \text{ mL h}^{-1}$  durante 40h. As saídas do dispositivo  $\delta$ -2x5-Y, conectadas ao dispositivo  $\psi$ , passarão sobre os conjuntos de arranjos de #1 à #5 e serão utilizadas para obter a curva de calibração (concentrações conhecidas de solução padrão de BSA). No último conjunto de arranjos (#S) uma amostra de BSA pseudo-desconhecida ( $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) será injetada a  $Q_s = 0,125 \text{ mL h}^{-1}$  por 40h. Por fim, todas imagens serão processadas utilizando o *software* ImageJ<sup>®</sup> coletando a média de intensidade transmitida para cada arranjo de nanoburacos.

### 3.3. BIOSENSOR PARA DOENÇA DE ALZHEIMER

A metodologia para o desenvolvimento do biosensor capaz de detectar a proteína  $\beta$ -amilóide será realizada em duas etapas. A primeira consiste na produção do dispositivo microfluídico para geração de gradiente de concentração (descrito na seção anterior) e a segunda na detecção e quantificação da proteína  $\beta$ -amilóide utilizando a técnica de SPR gerada em filmes de ouro contendo arranjos de nanoburacos.

Os materiais a serem utilizados na etapa de detecção e quantificação da biomolécula estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Materiais a serem utilizados para a detecção da proteína  $\beta$ -amilóide por meio da técnica SPR.

<b>Materiais</b>	<b>Fabricante</b>
Tampão de Fosfato (PBS)	-
Albumina de soro bovino (BSA)	Sigma-Aldrich
11-mercaptop-1-undecanoico (MUA)	Sigma-Aldrich
N-hidroxissuccinimida (NHS)	Sigma-Aldrich
N-ethyl-N-(diethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)	Sigma-Aldrich
Anticorpo $\beta$ -amilóide 1–42	Millipore
Anticorpo $\beta$ -amilóide 1–40	Abcam
Antígeno $\beta$ -amilóide 1–42	Abcam
Antígeno $\beta$ -amilóide 1–40	Anaspec



### 3.3.1. Imobilização da proteína $\beta$ -amilóide

Para detectar a presença, bem como para quantificar a proteína  $\beta$ -amilóide, é necessário que haja a imobilização desse marcador sobre a superfície dos nanoburacos de ouro e por esse motivo algumas modificações na superfície dos arranjos serão realizadas. Uma solução de MUA será injetada em bomba de fluxo para percorrer sobre os arranjos de nanoburacos durante 24 horas. Em seguida, uma solução 0,7 mol/L de EDC/NHS será injetada no dispositivo durante 2 horas a fim de converter grupos carboxila de MUA em ésteres de NHS. Após tais modificações, a superfície de nanoburacos estará apta a receber os anticorpos  $\beta$ -amilóide 1-40 e 1-42. Assim, uma solução de cada anticorpo da proteína  $\beta$ -amilóide (50  $\mu$ g/mL em tampão fosfato, PBS) será injetada no sistema (com velocidade a ser estudada). Após a imobilização dos anticorpos por meio dos grupos amina, a superfície estará pronta para receber os antígenos A $\beta$  1-40 e A $\beta$  1-42. As soluções dos antígenos A $\beta$  1-40 e A $\beta$  1-42 serão preparadas em tampão fosfato e posteriormente injetadas no dispositivo microfluídico de diluição (com velocidade a ser estudada). O sistema de diluição será composto por dois canais de entrada em que uma entrada é destinada para a injeção do antígeno e a outra entrada para o tampão fosfato que, após percorrer todo o sistema microfluídico, produzirão cinco concentrações distintas. Com a formação do gradiente de concentração conhecido será possível inserir uma solução do antígeno com concentração desconhecida pelo canal reservado para injeção da amostra. Por fim, soluções de concentração desconhecida dos antígenos A $\beta$  1-40 e A $\beta$  1-42 serão injetadas sobre a superfície de ouro contendo o anticorpo imobilizado. Todo o processo de modificação da superfície bem como a imobilização do anticorpo e antígeno terão imagens de transmissão registradas para posterior quantificação. Para certificação ou validação dos valores de concentração das amostras desconhecidas, determinados pelos biosensores, serão realizados ensaios utilizando métodos convencionais como ELISA, sendo a responsável por essa etapa do trabalho a Profa. Jaqueline de Carvalho Rinaldi.

## 4. EQUIPE DE TRABALHO E JUSTIFICATIVA DE ESCOLHA

A equipe principal de trabalho, ou seja, aquela requerida pelo Edital Universal (mínimo de 5 doutores com vínculo empregatício, incluindo o coordenador), conta com docentes de 4 (três) instituições de ensino distintas. A UEM (Univ. Estadual de Maringá-Pr), executora, a UEL (Univ. Estadual de Londrina-Pr, a Feitep (Maringá-Pr) e o Centro Universitário UniFatecie (Paranavaí-Pr). A seguir, descreveremos de modo breve a *expertise* e a atuação de cada membro da equipe principal no tema do projeto proposto. O restante da equipe conta com 1 doutor que teve sua tese defendida em tema relacionado a esse projeto e por 2 alunos doutorandos cujos temas da tese estão relacionados com a presente proposta de trabalho.

Profa. Dra. Jaqueline de Carvalho Rinaldi: Atualmente é docente do quadro colaborador do Programa de pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia da UEM/Maringá (desde 2019) e também do Centro Universitário Fatecie/Paranavaí-Pr (desde 2018). Suas principais áreas de atuação são biologia celular, biologia tecidual e patologia oral. Em projetos de pesquisa, tem experiência com os temas de carcinogênese hormonal, células-tronco adultas e proliferação/diferenciação celular. Possui domínio técnico em RT-PCR, ELISA, zimografia, *western blotting*, imuno-histoquímica, modelos de estudo in vivo e in vitro. Sua atuação no projeto justifica-se pela necessidade de um profissional qualificado e treinado em diferentes técnicas de análise relacionadas a imunoenaios como por exemplo ELISA, que serão necessárias para a confirmação ou validação do biosensor a ser desenvolvido na presente proposta. O biosensor será usado para determinar concentrações muito pequenas dos marcadores das doenças neurodegenerativas e os resultados precisam ser confrontados utilizando a técnica ELISA. A Profa. Jaqueline, como atua também no Departamento de Biociências e Fisiopatologia da UEM, tem livre acesso à infraestrutura necessária para os ensaios supracitados. Portanto, sua participação no projeto é estritamente necessária.

Prof. Dr. Alexandre Urbano: É docente do Departamento de Física da Universidade Estadual de Londrina-Pr desde 2005 e tem colaborado com nosso grupo de pesquisa desde 2017. O Prof. Alexandre possui um laboratório plenamente equipado com os equipamentos necessários para deposição de filmes

finos e possui *expertise* na área de deposição de películas e superfícies sendo o responsável pela fabricação das plataformas metálicas, ou seja, pela deposição e otimização dos filmes finos de ouro a serem empregados na confecção dos biosensores. Os filmes serão depositados pela técnica "*Radio Frequency Magnetron Sputtering*" a partir de alvos de ouro em atmosfera de argônio ultra puro sobre películas de vidro previamente preparadas pela deposição de um filme fino (5 nm) de cromo.

Prof. Dr. Marcos Rogério Guilherme: É docente da Faculdade de Engenharia e Inovação Técnico-profissional, Feitep, (Maringá-Pr) desde 2018 lecionando nas disciplinas Físico-Química, Termodinâmica, Eletroquímica, Ciências e Tecnologia dos Materiais e Química e Bioquímica de Alimentos. É Líder do grupo de pesquisa Compostos Bioativos, Alimentos Funcionais e Nutracêuticos possuindo experiência na área de Microscopia (FIB, FEM, MEV e AFM), Química de Materiais, com ênfase em Química de Polímeros, atuando principalmente nos seguintes temas: síntese de nanocompósitos para aplicações diversas, síntese de hidrogéis biocompatíveis para formulações farmacêuticas, síntese de nano e micropartículas de proteínas para aplicação em vacinas orais, síntese de hidrogéis superabsorventes à base polímeros naturais para agricultura e liberação modificada de drogas. Sua principal *expertise* exigida no presente projeto é a operação do microscópio FIB (*Focused Ion Beam*) usado na fabricação dos nanoburacos nos filmes finos de ouro.

Prof. Dr. Marcos de Souza: Docente do Departamento de Engenharia Química da UEM (desde 2012), o Prof. Marcos já vem colaborando com nossas pesquisas atuando na etapa de Simulação Computacional de Fluidodinâmica, modelando os sistemas microfluídicos que são utilizados nos sistemas biosensoriais. Tais *designs* e simulações computacionais são feitas através do software COMSOL *Multiphysics*. Elas mostram o comportamento da dinâmica dos fluídos, do processo de mistura e escoamento em diferentes condições de vazão, concentração e pressão. Esses estudos preliminares permitem encontrar os melhores parâmetros para a mistura dos fluídos em análise (solução contendo biomoléculas) sem a necessidade de realizar extensivos experimentos em bancada. Sua atuação no presente projeto é, portanto, muito importante para se diminuir a distância entre teoria e prática no desenvolvimento dos sistemas microfluídicos de diluição.

Dr. Jean Halison de Oliveira: Atualmente é docente do quadro colaborador do Departamento de Química da UEM. Tendo desenvolvido e defendido sua Tese de Doutorado em nosso laboratório, suas principais áreas de atuação são sensores plasmônicos, sensores eletroquímicos e caracterização de materiais. Possui ampla experiência no desenvolvimento e na caracterização de biosensores baseados em ressonância de plasmon de superfície (SPR) e SPR localizado (LSPR) gerados em nanoestruturas metálicas como: arranjos de nanoburacos fabricados em filmes finos de ouro, superfícies com grades de relevo (SRG) cobertas com filme fino de ouro e nanopartículas metálicas. Também possui experiência técnica na caracterização morfológica de materiais utilizando técnicas de microscopia como MEV, AFM, MET e FIB. Sua participação no projeto se justifica pela necessidade de um profissional treinado e qualificado para preparar e caracterizar os biosensores contendo arranjos de nanoburacos em filmes finos.

Alunos de doutorado: 1) Maiara Mitiko Taniguchi, tese em desenvolvimento: “Biosensor plasmônico baseado em arranjos de nanoburacos circulares para o diagnóstico precoce da proteína  $\beta$ -amilóide”; 2) Bento Pereira Cabral Júnior, tese em desenvolvimento: “Substratos plasmônicos de filmes finos metálicos produzidos por feixe de íons focados”.

## 5. PARCERIAS INSTITUCIONAIS NO BRASIL E NO EXTERIOR

Nosso grupo de pesquisa vem mantendo colaboração científica desde 2007 com o Prof. Dr. Alexandre G. Brolo, da University of Victoria, Victoria British Columbia, Canadá. Essa colaboração envolve o *design* e a caracterização de plataformas plasmônicas baseadas em arranjos de nanoburacos produzidos em filmes finos de ouro, e os frutos dessa colaboração podem ser verificados através dos diversos artigos publicados em colaboração com o Prof. Alexandre G. Brolo.

Este projeto de pesquisa contará também com a colaboração do Prof. Ph.D. Serge Cosnier do Département de Chimie Moléculaire UMR CNRS, Université Joseph Fourier, Grenoble, França, que esteve por duas vezes em nossa instituição nos últimos anos, ocasiões em que mantivemos contato e estabelecemos vínculos para futuras parcerias, com interesse no desenvolvimento de plataformas plasmônicas associadas a aptasensores e imunossensores. Vale destacar que já temos trabalhos publicados em parceria com o Prof. Serge Cosnier na linha de células a biocombustível, e o assunto do presente projeto é de interesse do Prof. Serge.

No âmbito do projeto INOMAT-INCT, contamos também com a parceria e disponibilidade da infraestrutura do laboratório dirigido pelo sub-coordenador da área de Microfabricação, Prof. Dr. Angelo Luiz Gobbi - Laboratório de Microfabricação-LNNano, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais – CNPEM, Campinas-SP, para realização de ensaios e treinamento de pessoal para o desenvolvimento de sistemas microfluídicos.

## 6. RESULTADOS ESPERADOS

Como todo projeto de pesquisa, esperamos contribuir de forma científica e intelectual da seguinte forma:

Formação de Recursos Humanos: Espera-se ampliar o acesso de usuários da UEM às técnicas de desenvolvimento de biosensores, bem como possibilitar um aumento qualitativo e quantitativo de dissertações/teses nos programas de pós-graduação em Química e áreas afins como Engenharia Química, Farmácia, Medicina e Física. Prevê-se a conclusão de, no mínimo, 2 teses de doutorado que já se encontram em andamento e o início de mais 2 orientações de doutorado. Há potencial também de início de 1 a 2 dissertações de mestrado no tema proposto, além de pelo menos 1 projeto de iniciação científica em cada ano de andamento do projeto.

Publicação de Artigos Científicos: Prevê-se que o projeto possui potencial para a elaboração de 5 a 8 artigos científicos durante o período de andamento da proposta.

Registro de Patentes: O projeto também possui potencial para o registro de pelo menos uma patente de processo ou metodologia no que diz respeito à análise de marcadores de Alzheimer ou outra doença neurodegenerativa de forma rápida e precoce (baixas concentrações).

Outros resultados esperados estão descritos na forma de “impactos esperados”, na próxima seção.

## 7. RELEVÂNCIA E IMPACTO DO PROJETO PARA O DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO, TECNOLÓGICO E DE INOVAÇÃO

Impactos Científicos: Este projeto visa contribuir para o estudo de sensores baseados no conceito de ressonância de plasmons de superfície (SPR) que possuem a capacidade de detectar biomoléculas com elevada sensibilidade e baixo limite de detecção (para baixas concentrações). A constante publicação de novos resultados e a demanda por sistemas mais sensíveis com relação a linha de pesquisa em sensores SPR, que explora a imobilização de biomoléculas sobre superfícies metálicas nanoestruturadas, empurra constantemente o atual estado da arte para os limites da *fronteira da ciência*. A metodologia a ser aplicada está entre as mais avançadas em termos de microfluídica, aplicações de materiais nanoestruturados e a tecnologia *lab-on-chip* (mais detalhes na seção Fundamentação Teórica, vide p. 36). A sofisticação dos métodos é inerente à elevada sensibilidade que, combinada com a simplicidade dos equipamentos e das medidas, torna a proposta promissora. Além de todos esses pontos positivos, vale destacar que nosso grupo de pesquisa tem tido êxito no desenvolvimento de dispositivos biosensoriais capazes de detectar concentrações muito mais baixas do que técnicas de análises convencionais. Ao final do projeto (ou até durante seu desenvolvimento) esperamos também apontar os caminhos para o desenvolvimento de biosensores para diagnosticar a presença de outros tipos de demência em pacientes em estágio inicial da doença possibilitando tratamento que leve a cura ou sobrevida dos pacientes. Portanto, temos ótimos motivos para acreditar que todos os resultados provenientes deste trabalho terão grande importância para o crescimento e consolidação das respectivas áreas da ciência e do interesse frente às prioridades estratégicas do Brasil (MCT).

Impactos Tecnológicos: Espera-se contribuir para o atual estado-da-arte no sentido de aprimorar processos de desenvolvimento de biosensores através da correlação das características geométricas do conjunto de nanoburacos (plataforma sensorial) com as propriedades ópticas e sensoriais do sistema analítico. O projeto também prevê, portanto, um aumento da capacitação tecnológica da instituição.

Impactos de Inovação: Este projeto propõe a associação de duas tecnologias distintas: a tecnologia de biosensoriamento por SPR e a tecnologia microfluídica, com o objetivo de automatizar o sistema de análise, levando ao desenvolvimento de biosensores eficazes, reprodutíveis e sensíveis o suficiente para detecção precoce da Doença de Alzheimer, o que dá a proposta um caráter inovador.

Impactos Sociais (internacionalização): Espera-se dar continuidade e aumentar a colaboração internacional com a *University of Victoria-British Columbia-Canadá* e com a *Université Joseph Fourier-Grenoble-França* aumentando assim a internacionalização de estudantes e professores da nossa instituição.

Impactos Sociais (qualidade de vida de pacientes): Espera-se contribuir de maneira significativa e direta nos esforços para reduzir o número de pacientes com a doença de Alzheimer que vem a óbito e/ou melhorar sua qualidade de vida através do diagnóstico precoce (facilitando assim o tratamento).

Impactos Econômicos (para o Sistema Único de Saúde-SUS): O desenvolvimento de técnicas de análise que permitam a detecção precoce da doença de Alzheimer certamente deverá não só diminuir o tempo de tratamento e aumentar a sobrevivência de pacientes como também reduzir a quantidade de pessoas dependentes do sistema único de saúde e/ou filas de espera.

Impacto Econômico (agregação de valores a tecnologia nacional ou patentes): Espera-se também desenvolver sistemas de análise, produtos ou metodologias que possuam viabilidade comercial e, portanto, tragam retorno à instituição executora e/ou ao órgão responsável pelo financiamento da pesquisa e/ou ao Brasil, além de trazer benefícios para o país no que diz respeito a agregar qualidade e valor a tecnologias nacionais.

Impactos Econômicos (exploração comercial): Com o desenvolvimento de uma tecnologia capaz de desenvolver biosensores para detecção de doenças neurodegenerativas, o projeto pode levar também à criação de *start-ups* ou *spin-offs* no sentido de desenvolver metodologias e/ou equipamentos de análise para exploração comercial de produtos ou serviços.



## 8. ATIVIDADES DE PESQUISA MAIS RELEVANTES E PRODUÇÃO GERADA, RELACIONADAS AO TEMA

### 8.1. PROJETO DE PESQUISA NÚMERO 1

#### 8.1.1. Dados

Título: Nanofotônica Aplicada ao Desenvolvimento de Biosensores para Diagnóstico Precoce de Câncer.

Coordenador: Emerson Marcelo Giroto

Órgão Financiador: CNPq (processo 568802/2008-0)

Período: 2008-2011

Financiamento: R\$ 421.940,00

Observação: projeto que deu início à linha de pesquisa sobre biosensores baseado em ressonância de plasmons de superfície.

#### 8.1.2. Indicadores de produção

##### 6.1.2.1. Artigos publicados

1) Monteiro, Johny P.; Ferreira, Jacqueline; Sabat, Ribal Georges; Rochon, Paul; Santos, Marcos José Leite; Giroto, Emerson M. *SPR based biosensor using surface relief grating in transmission mode*. **Sensors and Actuators. B, Chemical**, v. 174, p. 270-273, 2012.

Fator de impacto: 6.393

Número de citações: 24

**Contribuição desse trabalho para o estado da arte, resumidamente:** Nesse trabalho desenvolvemos uma das plataformas plasmônicas mais simples até então publicadas, usando grades de difração poliméricas que apresentam grande área superficial e, portanto, melhoram a sensibilidade frente aos eventos que acontecem na superfície ressonante dos plasmons, o que levou a uma maior sensibilidade da plataforma sensorial.

2) Carneiro, L. B.; Ferreira, J.; Santos, M. J. L.; Giroto, E. M. *A new approach to immobilize poly(vinyl alcohol) on poly(dimethylsiloxane) resulting in low protein adsorption*. **Applied Surface Science**, v. 257, p. 10514-10519, 2011.

Fator de impacto: 6.182

Número de citações: 17

**Contribuição desse trabalho para o estado da arte, resumidamente:** Nesse trabalho conseguimos dar um passo significativo no sentido de resolver os problemas de hidrofobicidade do PDMS - que é a cobertura mais usada nos biosensores microfluídicos ou plasmônicos – fazendo modificações químicas na superfície da peça.

3) Ferreira, Jacqueline; Santos, Marcos J. L.; Rahman, Mohammad M.; Brolo, Alexandre G.; Gordon, Reuven; Sinton, David; Giroto, E. M. *Attomolar Protein Detection Using in-Hole Surface Plasmon Resonance*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, p. 436-437, 2009.

Fator de impacto: 14.612

Número de citações: 112

**Contribuição desse trabalho para o estado da arte, resumidamente:** Nesse trabalho foi mostrado pela primeira vez que plataformas SPR baseadas em nanoburacos podem detectar concentrações na ordem de  $10^{-18}$  mol/litro (attomolar) utilizando o *hot-spot* do interior do nanoburaco.

4) Eftekhari, Fatemeh; Escobedo, Carlos; Ferreira, Jacqueline; Duan, Xiaobo; Giroto, E. M.; Brolo, Alexandre G.; Gordon, Reuven; Sinton, David . *Nanoholes As Nanochannels: Flow-through Plasmonic Sensing*. **Analytical Chemistry** (Washington), v. 81, p. 4308-4311, 2009.

Fator de impacto: 6.785

Número de citações: 239

**Contribuição desse trabalho para o estado da arte, resumidamente:** Nesse trabalho mostramos pela primeira vez que um fluxo contendo moléculas de interesse podem ser empurradas através dos nano-canais formados pelos nanoburacos de ouro, e serem analisadas explorando o *hot-spot* do interior dos nanoburacos.

### 8.1.2.2. Iniciação Científica, Dissertações e Teses concluídas

#### a) Iniciação Científica

1) Karina Ferreira. Detecção de proteína através de um substrato ativado por plasmons de superfície. 2010. Iniciação Científica. (Graduando em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Maringá, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Emerson Marcelo Giroto.

2) Andrey Petita Jacomini. Substratos plasmônicos de baixo custo: nanopartículas de ouro. 2011. Iniciação Científica. (Graduando em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Emerson Marcelo Giroto.

#### b) Dissertações

1) Leandro de Bispo Carneiro. Modificação da superfície de polidimetilsiloxano (PDMS) para aplicação em microfluídica e biosensores. 2011. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Orientador: Emerson Marcelo Giroto.

2) Johny Paulo Monteiro. Biosensor baseado em ressonância de plasmon de superfície gerado em nanoestruturas, aplicados para detecção precoce de câncer. 2011. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Emerson Marcelo Giroto.

#### c) Teses

1) Jacqueline Ferreira. Sensor de pH baseado em filmes de polímero conjugado e Sensor biológico baseado em filmes de ouro nanoestruturado. 2009. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Orientador: Emerson Marcelo Giroto.

### 8.1.2.3. Apresentação de trabalhos em congressos

1) Carneiro. L. B.; Ferreira K.; Santos, M. J. L.; Ferreira, J.; Girotto, E. M. Microfluídica Aplicada À Fabricação De Biosensores Baseados em SPR. In: 31a. Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Química, 2010, Águas De Lindóia. São Paulo: BQ, 2010. V. 1.

2) Monteiro J. P.; Carneiro. L. B.; Ferreira K.; Ferreira, J.; Girotto, E. M. Biosensor Baseado em Ressonância de Plasmon de Superfície Gerado em Nanoestruturas. In: 31a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia. São Paulo: SBQ, 2010. v. 1. p. 1.

## 8.2. PROJETO DE PESQUISA NÚMERO 2

### 8.2.1. Dados

Título: Detecção de Agentes de Imunomodulação Utilizando Biosensores Baseados em Ressonância de Plasmons de Superfície

Coordenador: Emerson Marcelo Girotto

Período: 2011-2013

Órgão Financiador: CNPQ (processo 473213/2011-7)

Financiamento: R\$ 48.759,19

### 8.2.2. Indicadores de produção

#### 8.2.2.1. Artigos publicados

1) Monteiro, Johny Paulo; Predabon, Sheila Maria; Da Silva, Cleiser Thiago Pereira; Radovanovic, Eduardo; Girotto, E. M. Plasmonic device based on a PAAm hydrogel/gold nanoparticles composite. **Journal of Applied Polymer Science** (Print), v. 132, 2015.

Fator de impacto: 2.520

Número de citações: 7

**Contribuição desse trabalho para o estado da arte, resumidamente:** Nesse trabalho desenvolvemos uma plataforma plasmônica inovadora através do intumescimento de um hidrogel com nanopartículas de ouro, onde foi possível detectar concentrações muito baixas de albumina de soro bovino, por exemplo, na ordem de 10 nanogramas/mL.

2) Silva, C. P. T.; Monteiro J. P.; Radovanovic, Eduardo; Girotto, E.M. Unprecedented high plasmonic sensitivity of substrates based on gold nanoparticles. **Sensors and Actuators. B, Chemical**, v. 191, p. 152, 2014.

Fator de impacto: 6.393

Número de citações: 20

**Contribuição desse trabalho para o estado da arte, resumidamente:** Nesse trabalho inovador e totalmente inédito mostramos que o óxido de grafeno (GO) pode intensificar a sensibilidade de biosensores plasmônicos a base de nanopartículas de ouro – a sensibilidade de biosensores a base de nanopartículas de ouro que é geralmente em torno de 80 nM/UIR atingiu 460 nm/UIR em ensaios reprodutíveis com auxílio do GO.

3) Monteiro, Johny P.; Carneiro, Leandro B.; Rahman, Mohammad M.; Brolo, Alexandre G.; Santos, Marcos J.L.; Ferreira, Jacqueline; Girotto, E. M. Effect of periodicity on the performance of surface plasmon resonance sensors based on subwavelength nanohole arrays. **Sensors and Actuators. B, Chemical**, v. 178, p. 366-370, 2013.

Fator de impacto: 6.393

Número de citações: 35

**Contribuição desse trabalho para o estado da arte, resumidamente:** Esse trabalho foi um marco no estado da arte sobre plataformas plasmônicas baseadas em conjuntos de nanoburacos, pois foi mostrado os melhores parâmetros geométricos que levam a uma maior sensibilidade para esse tipo de plataforma sensorial.

#### 8.2.2.2. Iniciação Científica, Dissertações e Teses concluídas

##### a) Iniciação Científica

1) Italo Mikihiro Shimabukuro. Desenvolvimento e caracterização de uma cela eletroquímica plasmônica. 2013. Iniciação Científica. (Graduando em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Emerson Marcelo Girotto.

## b) Dissertações

1) Cleiser Thiago. Nanopartículas de Ouro para Substratos Plasmônicos. 2013. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Emerson Marcelo Giroto.

2) Jean Halison de Oliveira. Sensores Baseados em Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada Utilizando Óxido de Grafeno e Nanopartículas de Prata. 2015. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, . Orientador: Emerson Marcelo Giroto.

## 8.3. PROJETO DE PESQUISA NÚMERO 3

### 8.3.1. Dados

Título: Biosensores Baseados em Ressonância de Plasmons de Superfície para Detecção Precoce de Câncer de Ovário e de Próstata

Coordenador: Emerson Marcelo Giroto

Período: 2013-2018

Órgão Financiador: Fundação Araucária do Estado do Paraná (processo 209/2014)

Financiamento: R\$ 25.000,00

### 8.3.2. Indicadores de produção

#### 8.3.2.1. Artigos publicados

1) Monteiro, Johny Paulo; De Oliveira, Jean Halison; Radovanovic, E.; Brolo, Alexandre Guimarães; Giroto, E. M. *Microfluidic Plasmonic Biosensor for Breast Cancer Antigen Detection*. **Plasmonics** (Norwell, Mass.), v. 11, p. 45-51, 2016

Fator de impacto: 2.335

Número de citações: 29

**Contribuição desse trabalho para o estado da arte, resumidamente:** Nesse trabalho foi detectado o marcador de câncer de mama em uma concentração de 30 ng/mL utilizando um biosensor plasmônico baseado em uma plataforma contendo um conjunto de nanoburacos de ouro. Vale a pena destacar que a concentração desse marcador em pacientes com câncer de mama é entre 15 e 75 ng/mL, o que evidencia o potencial uso desse biosensor como método de detecção do câncer de mama.

2) Monteiro, Johny P; Predabon, Sheila M; Bonafé, Elton G; Martins, Alessandro F; Brolo, Alexandre G; Radovanovic, Eduardo; Girotto, E. M. *SPR platform based on image acquisition for HER2 antigen detection*. **Nanotechnology** (Bristol. Print), v. 28, p. 045206, 2017.

Fator de impacto: 3.551

Número de citações: 9

**Contribuição desse trabalho para o estado da arte, resumidamente:** Esse trabalho corresponde a uma evolução do trabalho anterior. Desta vez, utilizamos o método de aquisição de imagens da luz que atravessa o conjunto de nanoburacos de ouro como parâmetro sensível. A concentração detectada foi 10x menor, isto é, 3 ng/mL - essa concentração está dentro da normalidade (em indivíduos normais), assim, o biosensor desenvolvido pode reconhecer uma *overexpression* (termo usado para indicar que o nível do marcador está além do normal) e, então, usá-lo no diagnóstico precoce da doença.

#### 8.3.2.2. Iniciação Científica, Dissertações e Teses concluídas

##### a) Iniciação Científica

1) Mariana Souza de Oliveira. Estudo de ancoramento de nanobastões de ouro em folhas de óxido de grafeno na detecção de biomoléculas por sistemas de análise por injeção em fluxo. 2016. Iniciação Científica. (Graduando em Química) - Departamento de Química UEM, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Emerson Marcelo Girotto.

##### b) Dissertações

1) Maria Gabriela Verderio Fressati. Biofuncionalização de nanopartículas metálicas para detecções eletroquímica e ressonância de plasmon de superfície simultâneas de biomoléculas. 2018. Dissertação (Mestrado em Pós-Graduação em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Maringá, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Emerson Marcelo Girotto.

2) Bento Pereira Cabral Júnior. Nanolitografia com esferas de poliestireno para a obtenção de biosensores plasmônicos. 2018. Dissertação (Mestrado em Pós-Graduação em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Maringá, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Emerson Marcelo Girotto.

### c) Teses

1) Jhonny Paulo Monteiro. Biosensores baseados em ressonância de plasmons de superfície utilizando arranjos de nanoburacos, superfícies com grades de relevo e compósito de hidrogel/nanopartículas de ouro. 2015. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Emerson Marcelo Giroto.

2) Sheila Predabon. Detecção de citocina TNF- $\alpha$  utilizando biosensor plasmônico empregando o método de aquisição de imagens. 2016. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Maringá. Orientador: Emerson Marcelo Giroto.

### 8.3.2.3. Apresentação de trabalhos em congressos

1) Giroto, Emerson Marcelo; Oliveira, J. H. Nanostructured Plasmonic Sensor Based on Silver-Modified Graphene Oxide. In: Fourth International Conference On Multifunctional, Hybrid And Nanomaterials (Hybrid Materials 2015), 2015, Sitges, Spain. Hyma 2015 Abstracts, 2015.

## 8.4. PROJETO DE PESQUISA NÚMERO 4

### 8.4.1. Dados

Título Geral: Inomat-INCT, Instituto Nacional de Materiais Funcionais Complexos

Período: 2018 – Atual

Coordenador Geral: Prof. Dr. Fernando Galembeck

Título do sub-projeto individual: Biosensores baseados em ressonância de plasmons de superfície. Coordenador: Emerson Marcelo Giroto

Área: Microfabricação (sub-coordenador: Prof. Dr. Angelo Gobbi)

Órgão Financiador: CNPq 573644/2008-0

Financiamento: Geral não divulgado (para esse sub-projeto: R\$21.682,82)

### 8.4.2. Indicadores de produção

#### 8.4.2.1. Artigos publicados

1) Fressatti, Maria; Cabral Jr., Bento; De Oliveira, Jean; Buzzetti, Paulo; Radovanovic, Eduardo; Monteiro, Johny; Giroto, E. M. *Device for Streptavidin*



*Detection Using LSPR and Electrochemical Transductions on the same Platform. Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 32, p. 777-785, 2021.

Fator de impacto:1.399

Número de citações: 0

**Contribuição desse trabalho para o estado da arte, resumidamente:** Nesse trabalho mostramos de forma inovadora a associação de duas técnicas de análise com o mesmo objetivo – desenvolvemos um biosensor plasmônico utilizando um substrato condutor (ITO) com nanopartículas de ouro e o utilizamos para monitorar a resposta óptica (plasmons de superfície) e a resposta eletroquímica (através de impedância).

2) De Oliveira, Jean; Monteiro, Johny; Buzzetti, Paulo; Cabral Júnior, Bento; Radovanovic, Eduardo; Giroto, E. M. *New Strategy for Streptavidin Detection Using AuNRs/PAAm Hydrogel Composites. Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 31, p. 1771-1777, 2020.

Fator de impacto:1.399

Número de citações: 1

**Contribuição desse trabalho para o estado da arte, resumidamente:** Nesse trabalho utilizamos novamente um hidrogel intumescido com nanoestruturas de ouro, dessa vez, nanobastões e foi possível alcançar sensibilidades relativamente boas de cerca de 226 nm/UIR na detecção da biomolécula estreptavidina.

3) Predabon, Sheila M.; Buzzetti, Paulo H. M.; Visentainer, Jeane E. L.; Visentainer, Jesui V.; Radovanovic, Eduardo; Monteiro, Johny P.; Giroto, E. M. *Detection of tumor necrosis factor-alpha cytokine from the blood serum of a rat infected with Pb18 by a gold nanohole array-based plasmonic biosensor. Journal of Nanophotonics*, v. 14, p. 1, 2020.

Fator de impacto:1.415

Número de citações: 0

**Contribuição desse trabalho para o estado da arte, resumidamente:** Nesse trabalho conseguimos detectar a citocina TNF-alfa na faixa de picogramas utilizando um biosensor baseado em um conjunto de nanoburacos de ouro – a TNF-alfa é um marcador comum de doenças como artrite reumatoide, doença de Crohn ou doença de Chagas, e foi possível detectá-la em amostras reais, ou seja, em amostras de plasma sanguíneo de ratos com o apoio de parcerias da área da saúde.

4) Cabral Júnior, Bento Pereira; Oliveira, Jean Halison De; Buzzetti, Paulo Henrique Maciel; Fressatti, Maria Gabriela Verderio; Monteiro, Johny Paulo; Amorin, Luís Henrique Cardozo; Urbano, Alexandre; Radovanovic, Eduardo; Giroto, E. M. *Cost-effective plasmonic device for label-free streptavidin detection*. **Materials Letters**, v. 227, p. 243-246, 2018.

Fator de impacto: 3.204

Número de citações: 2

**Contribuição desse trabalho para o estado da arte, resumidamente:** Nesse trabalho foi dado um passo na direção da produção de biosensores de baixo custo de produção utilizando a técnica de nanolitografia por esferas de polietileno – os substratos apresentaram sensibilidade na ordem de 380 nm/UIR.

#### 8.4.2.2. Iniciação Científica, Dissertações e Teses Concluídas

##### a) Iniciação Científica

1) Nayara de Souza Mendes. Sistema microfluídico confeccionado em polidimetilsiloxano para formação controlada de gradiente de concentração para moléculas com alta massa molecular. 2018. Iniciação Científica. (Graduando em Química) - Departamento de Química UEM, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Emerson Marcelo Giroto.

##### c) Teses

1) Jean Halison de Oliveira. Biosensores baseados em nanoestruturas e metamateriais para detecção de biomoléculas via SPR e LSPR. 2019. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Orientador: Emerson Marcelo Giroto.

2) Paulo Henrique Maciel Buzzetti. Gerador de gradiente de concentração biomolecular para biosensores e eletrossíntese de mediadores redox para bioânodos em biocélulas. 2019. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Orientador: Emerson Marcelo Giroto.

#### 8.4.2.3. Apresentação de trabalhos em congressos

1) Giroto, E.M.; Buzzetti, Paulo Henrique Maciel; Oliveira, J. H.; Cabral Júnior, Bento Pereira; Fressatti, Maria Gabriela Verderio; Monteiro, Johny P. Dispositivo Lab-On-a-Chip Microfluídico em PDMS Gerador de um Gradiente de Concentração Definido e Reprodutível. In: XXXII Semana De Química: Identidade Química, 2018, Maringá.

2) Giroto, E.M.; Oliveira, J. H.; Buzzetti, Paulo Henrique Maciel; Cabral Júnior, Bento Pereira; Fressatti, Maria Gabriela Verderio; Monteiro, Johny P. Dispositivo Lab-On-A-Chip Microfluidico 2x6-Y Em PDMS Gerador de Gradiente de Concentração Definido e Reprodutível. In: I Workshop Paranaense Sobre Nanomateriais e Materiais Funcionais, 2018, Londrina- Pr.

3) Giroto, E.M.; Cabral Júnior, Bento Pereira; Oliveira, J. H.; Fressatti, Maria Gabriela Verderio; Buzzetti, Paulo Henrique Maciel. Construção de Plataformas Plasmônicas Através de Nanolitografia com Esferas de Poliestireno. In: XXXI Semana Da Química Da UEM & I Simpósio De Pós-Graduação Em Química, 2018.

#### 8.4.2.4. Iniciação Científica, Dissertações e Teses Concluídas em andamento

##### a) Teses

1) Bento Pereira Cabral Júnior. Substratos plasmônicos em filmes finos metálicos produzidos por feixe de íons focados. Início: 2018. Tese (Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Orientador: Emerson M. Giroto).

2) Maiara Mitiko Taniguchi. Desenvolvimento de biosensor plasmônico para detecção da doença de Alzheimer. Início: 2018. Tese (Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Química) - Departamento de Química UEM, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Orientador: Emerson M. Giroto).

## 9. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Um dos grandes interesses científicos é o desenvolvimento de tecnologias portáteis, de fácil operação e eficientes ao que se propõe executar. Dispositivos miniaturizados de sensoriamento, sobretudo em análises clínicas, como biosensores, são exemplos de tecnologias que se destacaram nas últimas décadas devido às suas significativas contribuições sociais e econômicas.

Em particular, sistemas capazes de construir curvas de calibrações automáticas, como dispositivos microfluídicos geradores de gradientes de concentração, são de grande interesse pois dispensam a manipulação por um operador. Isso elimina erros experimentais associados aos procedimentos usuais e dispensa recalibrações recorrentes, quando atribuído uma modelagem matemática ao sistema. A microfluídica é a ciência da manipulação de fluídos na escala volumétrica entre  $10^{-9}$  a  $10^{-18}$  L em canais com dimensões micrométricas que compõem um dispositivo microfluídico<sup>1</sup>. Com o controle dos fenômenos associados ao transporte de fluídos em dimensões pequenas, os dispositivos microfluídicos são úteis na criação de sistemas miniaturizados, construção de gradientes de concentração, reatores, entre outras configurações com variadas aplicações práticas<sup>2</sup>. As vantagens em associar os dispositivos microfluídicos a um segundo sistema laboratorial são o baixo consumo de reagentes, a baixa produção de rejeitos, a possibilidade de automatização e o baixo custo de fabricação<sup>1,3</sup>. Eles são especialmente atraentes quando aplicados em sistemas de biosensoriamento, tal como biosensores baseados em ressonância de plasmon de superfície (SPR), pois podem agregar ao sistema não apenas a capacidade de detecção, mas também de quantificação de bioespécies.

Biosensores SPR são dispositivos capazes de monitorar eventos bioquímicos na interface condutor/dielétrico com alta sensibilidade explorando a ressonância de plasmon de superfície<sup>4</sup>. A variação do índice de refração na interface, a qual pode ser desencadeada pela imobilização de uma espécie orgânica tal como um antígeno biológico, ocasiona mudanças ópticas relacionadas com o efeito SPR e que são passíveis de monitoramento. Dessa forma, a associação desse sistema óptico de detecção com sistemas microfluídicos geradores de gradiente de concentração pode tornar o dispositivo integrado uma opção bastante atraente para detecção e quantificação de espécies úteis no

prognóstico de doenças como câncer (como já temos feito em nosso laboratório) e doenças neuro-degenerativas, como a doença de Alzheimer, por exemplo<sup>5</sup>.

A seguir, apresentamos uma breve fundamentação teórica sobre o trabalho proposto nesse projeto de pesquisa.

## **9.1. DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO GERADOR DE GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO BIOMOLECULAR**

O desenvolvimento de um dispositivo capaz de gerar um gradiente de concentração eficiente e reprodutível exige uma compreensão mínima em comportamento mecânico-fluídico, bem como em processos de transferência de massa e quantidade de movimento envolvidos em sistemas binários. Logo, se faz necessário a apresentação de conceitos matemáticos gerais de fenômenos de transporte, e também dos parâmetros normalmente reportados para a caracterização dos tipos de escoamentos envolvidos em um determinado sistema microfluídico.

### **9.1.1. Fenômenos de Transporte**

Inicialmente, a primeira consideração importante a ser apresentada é a generalização a um comportamento específico da matéria como um ponto de características definidas. Guardadas as infiridades de partículas existentes, a simplificação facilita a quantificação de fenômenos associados aos transportes de massa, energia e quantidade de movimento dessas partículas<sup>9</sup>. Essa conjectura é chamada de hipótese do contínuo. A hipótese assume um meio material como uma distribuição contínua e tridimensional<sup>10</sup>. O principal objetivo é a definição das propriedades dos fluídos como massa específica, velocidade, temperatura, concentração, entre outros.

A segunda consideração a ser assumida é de que qualquer transporte envolvendo matéria ocorre somente devido a uma diferença de potencial desenvolvido entre dois instantes, sendo esse potencial gerado naturalmente ou por um agente externo. Em fluídos, esse potencial pode ser desenvolvido por meio de uma diferença de concentração, tensão de cisalhamento, diferença de temperatura, pressão, entre outros<sup>1</sup>. Todos esses fenômenos são englobados nas descrições matemáticas de transferências de energia, quantidade de movimento e de massa<sup>2</sup>.

Os fenômenos de transferência são descritos por equações constitutivas e equações de conservação. As equações constitutivas não são propriamente leis fundamentais, mas sim provenientes de equações empíricas que portam unicamente como princípio a segunda lei da termodinâmica, ou seja, associam-se propriedades moleculares às propriedades macroscópicas por meio da hipótese do contínuo. As equações de conservação são consideradas leis fundamentais capazes de descrever a evolução temporal das variáveis envolvidas nos fenômenos de transferência<sup>9,10,11</sup>.

Cada fenômeno de transferência pode ser associado a uma equação constitutiva específica. A equação ou lei constitutiva para a quantidade de movimento foi atribuída a partir de experimentos de Newton que estabeleceram a relação entre uma taxa de deformação a uma tensão tangencial aplicada. Já a lei constitutiva para o transporte de energia ou calor, Lei de Fourier, relaciona o gradiente de temperatura ao fluxo de calor por condução. E por fim temos a Lei de Fick, que em transferência de massa relaciona o gradiente de concentração espacial de uma espécie contida em um fluido com a taxa do mesmo soluto no espaço<sup>9,10,11</sup>. As Equações 1, 2 e 3 expressam as equações constitutivas para transportes de quantidade de movimento, energia/calor e massa, respectivamente.

$$T = \left[ -p + \frac{2}{3} \rho \nu (\nabla v) \right] I + 2\rho\nu D \quad \text{Equação 1}$$

$$q = -\rho c_p \alpha \nabla T \quad \text{Equação 2}$$

$$j = -\rho D_{AB} \nabla C_A \quad \text{Equação 3}$$

Os termos representados nas equações 1 – 3 são:

$I$ – vetor fluxo específico de massa ( $\text{kg}_A \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );	$C_p$ – calor específico a pressão constante ( $\text{J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$ );
$\rho$ – massa específica ( $\text{kg m}^{-3}$ );	$\alpha$ – difusividade térmica ( $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ );
$D_{AB}$ – difusividade molecular do soluto A no solvente B ( $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ );	$\nabla T$ – vetor gradiente de temperatura ( $\text{K m}^{-1}$ );
$\nabla C_A$ – vetor gradiente da concentração do soluto A ( $\text{kg}_A \text{ kg}^{-1} \text{ m}^{-1}$ );	$T$ – tensor de tensões (Pa);
$q$ – vetor fluxo difusivo específico de calor ( $\text{J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );	$\nu$ – viscosidade cinemática ( $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ );
	$\nabla v$ – divergente da velocidade ( $\text{s}^{-1}$ );
	$D$ – tensor taxa de deformação ( $\text{s}^{-1}$ ).

As equações constitutivas para transferência de quantidade de movimento, energia e massa são práticas nas resoluções de muitos problemas, no entanto, alguns

destes problemas demandam a inserção de grandezas intensivas como espaço e tempo. Para a descrição dos fenômenos de transferência no espaço e tempo se torna prático a aplicação de equações diferenciais parciais. Para a resolução diferencial parcial dos fenômenos de transporte é necessário assumir que o escoamento é incompressível, ou seja, sem deformação volumétrica ( $\Delta V = 0$ ), e que a massa específica de cada partícula permanece constante em função do tempo. Como consequência apresenta-se a equação de Navier-Stokes para descrição da conservação da quantidade de movimento no espaço e tempo. A equação de conservação de energia foi desenvolvida a partir da Lei de Fourier e a equação de transferência de massa a partir da Lei de Fick. As equações 4, 5 e 6 descrevem as resoluções diferenciais parciais dos fenômenos de transporte respectivamente como descritos<sup>12,13</sup>.

$$\rho \frac{\partial v}{\partial t} + = - \rho v \nabla v - \nabla p + \mu \nabla^2 v \quad \text{Equação 4}$$

$$\frac{\partial T}{\partial t} + = - (v \nabla) T - \alpha \nabla^2 T \quad \text{Equação 5}$$

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} + = D_{AB} \nabla^2 C_A - (v \nabla) C_A \quad \text{Equação 6}$$

Com base nas soluções dos fenômenos em conjunto é possível estimar com uma margem considerável de veracidade, dados como pressão, velocidade e variação de concentração de um sistema sob condições de contorno. Efetivamente, as equações supracitadas são o suporte matemático de grande parte dos *softwares* utilizados para a realização de simulações computacionais das mais variadas complexidades. Em contextos mais simples, como uma mistura binária entre dois fluídos unidos por um *combiner*<sup>\*</sup>, Chen et al.<sup>14</sup> fizeram uso do software COMSOL Multiphysics<sup>®</sup> para acompanhar cada instante do desenvolvimento de uma mistura ao longo de um caminho<sup>14</sup>. As equações constitutivas e conservativas não são apenas eficientes em estimar a pressão, volume e concentração das espécies ao fim de uma mistura, mas também obter leituras espaciais e temporais a cada ponto do arranjo<sup>15,16</sup>. De maneira análoga, muitos trabalhos utilizam as simulações para o desenvolvimento de micromisturadores antes de aplicações experimentais, desta maneira são poupados materiais, bem como tempo de pesquisa<sup>15,17,18,19</sup>.

---

\* *Combiner*. Termo dirigido para a secção de um sistema microfluidico responsável pela conexão entre duas linhas anteriormente não conectadas.

### 9.1.2. Tipos de escoamentos e o número de Reynolds

As descrições matemáticas anteriormente citadas descrevem os fenômenos de transferência, no entanto, não são normalmente utilizadas para classificar o regime de escoamento. Identificar qual o escoamento regido por um sistema é de fundamental importância para a associação dos diferentes fenômenos observados. Neste cenário, o número de Reynolds ( $R_e$ ) apresenta-se como o indicador mais reportado na literatura para a classificação de tipos de escoamentos fluídicos<sup>11,20,21,22,23</sup>. O professor de engenharia Osborne Reynolds (1842 – 1912) da Universidade de Manchester estudou a transição laminar/turbulenta de fluxos descendentes e postulou que o produto da densidade do fluido ( $\rho$ ), velocidade de escoamento ( $U$ ) e diâmetro hidráulico do duto ( $D_h$ ) pela viscosidade do fluido ( $\mu$ ),  $R_e = \frac{\rho U D_h}{\mu}$ , indicam o comportamento do escoamento. Sendo classificados em três categorias<sup>24</sup>:

- Escoamento laminar com ondulações mínimas,  $R_e < 20$ ;
- Escoamento laminar com ondulações pronunciadas,  $20 < R_e < 2000$ ;
- Escoamento turbulento,  $R_e > 2000$ .

O número de Reynolds relaciona a razão entre as forças inerciais e forças viscosas. Particularmente em sistemas microfluídicos, onde as escalas são consideravelmente pequenas, normalmente o fluxo é laminar governado predominantemente por forças viscosas<sup>25,26,27,28</sup>.

Sistemas microfluídicos são linhas de canais com paredes imóveis que orientam o fluxo do fluido. Sob a ótica dessa observação Jean Louis Poiseuille e Gotthilf Hagen, paralelamente estabeleceram o entendimento a seguir. Considere um cilindro como canal de escoamento na presença de um fluxo laminar ( $R_e < 20$ ). Após estabelecido o equilíbrio do escoamento o sistema pode ser considerado estável por não haver aceleração do escoamento e então a equação de Navier-Stokes é resumida a  $\nabla p = \mu \nabla^2 v$ . Se aplicadas condições de contorno onde  $v = 0$  e relacionado o gerador de pressão  $\nabla p$  a seção do canal cilíndrico ( $\pi r^2$ ), a equação assume  $Q = \frac{\pi r^4}{8\mu} - \frac{dp}{dx}$ . Em sistemas microfluídicos geralmente  $L/r \gg 1$  e  $L/r \gg R_e$ , sendo  $L$  o comprimento do canal; então pode-se fazer a aproximação  $-\frac{dp}{dx} = \frac{\Delta p}{L}$ , e por fim, ser representada por meio da Equação 7<sup>29,30,31</sup>. Note que o fluido Poiseuille considera que a injeção deve advir de um  $\Delta p$ , ou seja, uma força externa deve ser responsável pela geração da taxa de injeção ou fluxo  $Q$  (ou velocidade).



$$Q = \frac{\pi r^4}{8\mu} \frac{\Delta p}{L} \quad \text{Equação 7}$$

Não por coincidência a Equação 7 (Lei de Hagen-Poiseuille) é idêntica à Lei de Ohm ( $V = I R$ ) aplicada a sistemas elétricos<sup>32</sup>. Logo, a equação pode ser reescrita de forma análoga à Lei de Ohm:

$$\Delta p = Q R_H \quad \text{Equação 8}$$

Onde  $\Delta p$  é equivalente a  $V$  (*voltagem ou força governante*),  $R_H$  seria um termo equivalente a  $R$  (*resistência ou impedimento a transporte*) e  $Q$  equivalente a  $I$  (*corrente ou quantidade de portadores*). A Equação 8 surge como uma das ferramentas mais úteis para o estudo de sistemas microfluídicos, sobretudo na descrição de processos de diluição em série<sup>26,33,34,35</sup>.

### 9.1.3. Modelo matemático para construção de sistemas de diluição em série

Neste instante faz-se necessário uma explanação de como pode ser aplicado de maneira eficiente a Lei de Hagen-Poiseuille na construção de sistemas geradores de gradiente de concentração a partir de diluições em série. A analogia a sistemas elétricos torna mais intuitiva a interpretação de um sistema microfluídico de diluição em série considerando-o como uma malha de um circuito elétrico. Dessa maneira, a Primeira Lei de Kirchhoff, onde é afirmado que a soma das correntes elétricas originadas de um nó  $\underline{Q}$  é igual à soma das correntes que chegam até o mesmo nó  $\underline{Q}$ <sup>36,37</sup>, pode ser reinterpretada a sistemas microfluídicos, onde se entende que o volume de fluído originado de um nó  $\underline{Q}$  é igual à soma dos volumes que chegam até o mesmo nó  $\underline{Q}$ . Em resumo, é uma simples relação de conservação de massas dos fluídos envolvidos no nó. A Segunda Lei de Kirchhoff descreve que ao percorrer uma malha elétrica, a diferença de potencial (ddp) ao retornar ao mesmo ponto de partida é nula. Em sistemas microfluídicos a analogia pode ser representada como a diferença de pressão  $\Delta p$  geradora do movimento dos fluídos deve ser nula ao fim da malha (ou ao retorno ao ponto inicial). De maneira equivalente, as considerações em relação à resistência elétrica em série e em paralelo podem ser aplicadas as resistências hidráulicas  $R_H$  de uma malha de canais em sistemas microfluídicos, Equações 9 e 10, respectivamente<sup>36,37</sup>.

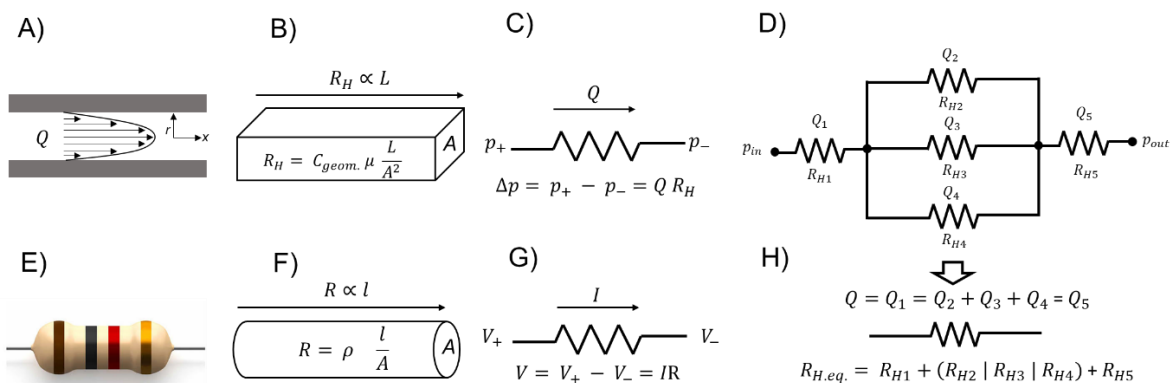
$$R_{H.eq.} = R_{H1} + R_{H1} + \dots + R_{HN} \quad \text{Equação 9 (série)}$$

$$\frac{1}{R_{H.eq.}} = \frac{1}{R_{H1.}} + \frac{1}{R_{H2.}} + \dots + \frac{1}{R_{HN.}} \quad \text{Equação 10 (paralelo)}$$

Os resistores elétricos são dependentes das características dos materiais (resistividade elétrica) que os compõem, bem como pelas suas respectivas dimensões. A resistência hidráulica pode ser representada de maneira também análoga (Equação 11), onde  $C_{geom.}$  é o coeficiente geométrico do canal, enquanto  $L$  é o comprimento do canal,  $\mu$  é a viscosidade do fluido e  $A$  a área seccional. Contudo,  $C_{geom.}$  envolve uma resolução matemática complexa que já foi reportada na literatura e não será discutida aqui<sup>38</sup>, de maneira que para uma secção de um canal retangular, a resistência hidráulica assume a forma dada na Equação 12<sup>13,32,34,38,39</sup>. A Figura 5 resume a analogia entre um sistema microfluídico genérico de escoamento de acordo com Hagen-Poiseuille em relação a sistemas elétricos.

$$R_H = C_{geom.} \cdot \mu \frac{L}{A^2} \quad \text{Equação 11}$$

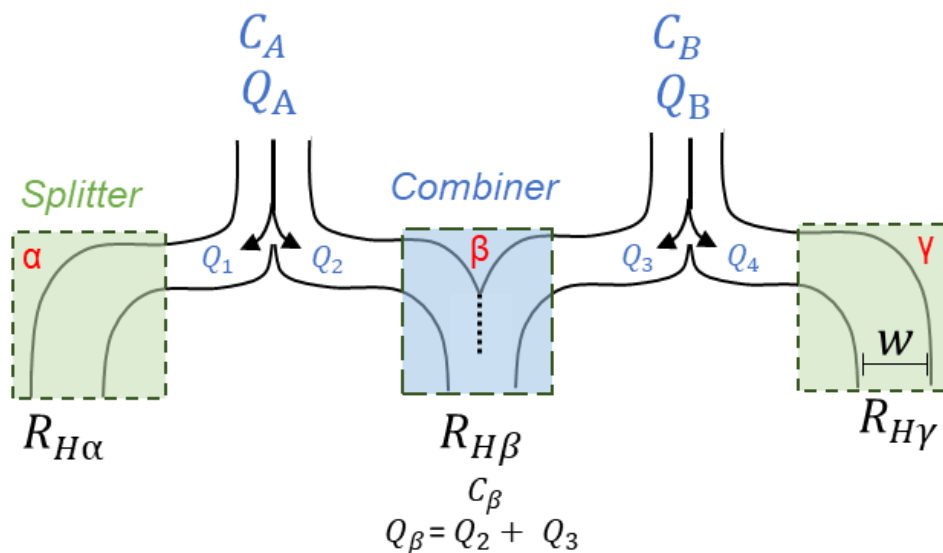
$$R_H = \frac{12 \mu L}{w h^3 \left( 1 - \frac{h}{w} \left( \frac{192}{\pi^5} \sum_{n=1,3,5}^{\infty} \frac{1}{n^5} \tanh\left(\frac{n \pi w}{2 h}\right) \right) \right)} \quad \text{Equação 12}$$



**Figura 5.** Esquema ilustrativo de analogia entre circuitos elétricos e sistemas microfluídicos. Imagem adaptada de Kwang W. Oh et al<sup>32</sup>. A) Escoamento Hagen-Poiseuille. B) Resistência hidráulica em correspondência a um resistor elétrico. C) Parâmetros hidráulicos de um canal. D) Malha fluídica com seus respectivos indicadores. E) Resistor elétrico. F) Resistência elétrica. G) Parâmetros elétricos de um resistor e H) Resultante dos parâmetros da malha fluídica.

À primeira vista, a simplicidade de um sistema microfluídico de  $N$  etapas de diluição em série pode induzir a uma interpretação equivocada das concentrações ao final do processo de diluição. A formação do gradiente de concentração pode ser melhor compreendida observando um esquema genérico (Figura 6) de um sistema *splitter* (quadrado verde) e um sistema *combiner* (quadrado azul). A divisão dos fluxos

*inlets* A e B ( $Q_A$  e  $Q_B$ ) nos *splitters* é dependente das resistências hidráulicas dos canais que os cercam, são eles  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ <sup>26,40</sup>. Se  $L_\alpha = L_\beta = L_\gamma$ , então é esperado que os canais  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  apresentem a mesma resistência hidráulica. No entanto, o canal  $\beta$  agrupa no *combiner* uma fração  $Q_2$  do *inlet* A ( $Q_A$ ) e outra fração  $Q_3$  do *inlet* B ( $Q_B$ )<sup>34</sup>. A primeira consequência para a observação anterior é que  $Q_2$  e  $Q_3$  combinados no canal  $\beta$  sofrem uma maior resistência hidráulica frente as frações  $Q_1$  e  $Q_4$ , pois estão sujeitos a apenas metade do canal ( $\frac{w_\beta}{2}$ ) para acomodação dos fluxos  $Q_2$  e  $Q_3$ . A segunda consequência é a desproporção da divisão entre  $Q_1$  e  $Q_2$  e entre  $Q_3$  e  $Q_4$  devido a maior resistência hidráulica em  $\beta$ , de maneira a resultar as taxas  $Q_1$  e  $Q_4$  maiores frações do volume; as Equações 13-16 resumem as taxas de volumes  $Q_1$ ,  $Q_2$ ,  $Q_3$  e  $Q_4$ . A terceira consequência é a concentração resultante da mistura ( $C_\beta$ ) devido as diferentes razões de taxas de volumes, muitas vezes  $Q_2$  e  $Q_3$  não são equivalentes, gerando concentrações variadas; a concentração resultante da união de duas taxas volumétricas pode ser determinada pela Equação 17<sup>38,41</sup>.



**Figura 6.** Esquema genérico de divisão e mistura em sistemas microfluídicos geradores de gradientes de concentração.

$$Q_1 = \left( \frac{R_{H\alpha}}{R_{H\alpha} + R_{H\beta}} \right) Q_A. \quad \text{Equação 13} \quad Q_2 = \left( \frac{R_{H\beta}}{R_{H\beta} + R_{H\alpha}} \right) Q_A. \quad \text{Equação 14}$$

$$Q_3 = \left( \frac{R_{H\beta}}{R_{H\beta} + R_{H\gamma}} \right) Q_B. \quad \text{Equação 15} \quad Q_4 = \left( \frac{R_{H\gamma}}{R_{H\gamma} + R_{H\beta}} \right) Q_B. \quad \text{Equação 16}$$

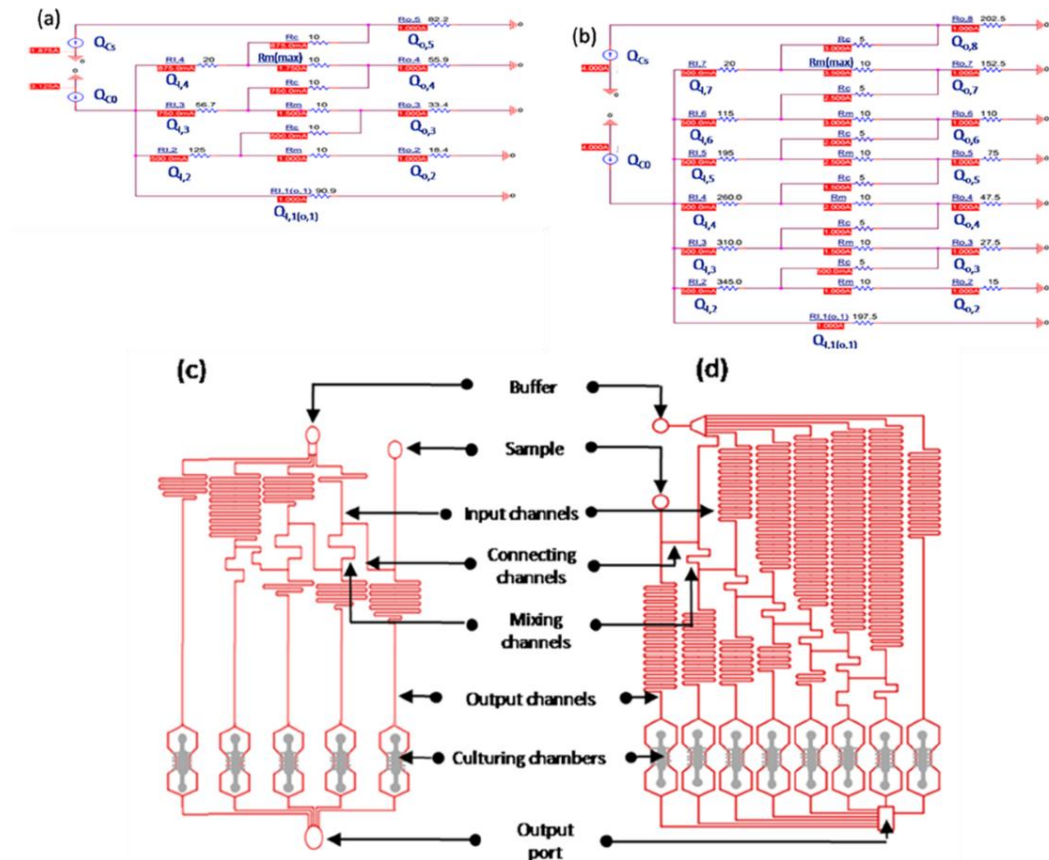
$$C_\beta = \left( \frac{Q_2}{Q_2 + Q_3} \right) C_A. + \left( \frac{Q_3}{Q_2 + Q_3} \right) C_B. \quad \text{Equação 17}$$

A manipulação das concentrações resultantes também é possível não apenas alterando as resistências hidráulicas dos canais (alterando  $L$ ,  $w$  ou  $h$ ), mas também aplicando  $Q_A \neq Q_B$  por meio de bombas de injeção independentes. Com essa abordagem, um sistema de  $N$  etapas de diluição em série pode ser construído para formar qualquer padrão de diluição apenas operando a razão volumétrica de divisão nos *splitters* e de mistura nos *combiners*<sup>40</sup>. Alguns sistemas de  $N$  etapas de diluição em série são classificados de acordo com a razão volumétrica de mistura:

- 10-fold log, razão volumétrica de mistura de 9:1 ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , ...,  $10^{-N+1}$ ,  $10^{-N}$ )<sup>40,42</sup>;
- 2-fold log, razão volumétrica de mistura de 1:1 ( $2^{-1}$ ,  $2^{-2}$ , ...,  $2^{-N+1}$ ,  $2^{-N}$ )<sup>40,42</sup>;
- linear, razão altera a cada etapa de diluição, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, ... 1:N  $\{(N/N + 1), (N - 1)/(N + 1) \dots 2 / (N+1), 1 / (N + 1)\}$ <sup>40,43,44</sup>;
- Gaussiana<sup>40</sup>, entre outros<sup>40,45,46,47,3,48</sup>.

As plataformas geradoras de gradiente de concentração possuem as mais variadas aplicações práticas. Guoxia et al.<sup>3</sup> desenvolveram um sistema gerador de gradiente de concentração linear (2 *inlets* e 8 *outputs*; 0, 14,3, 28,6, 42,9, 57,2, 71,5, 85,8 e 100,0%) e 2-fold log (2 *inlets* e 5 *outputs*; 0, 6,25, 12,5, 25,0, 50,0 e 100,0%) para entrega controlada de agentes tóxicos (cobre, benzeno, metilbenzeno, nitrobenzeno e clorobenzeno) às câmaras de cultura das microalgas *Platymonas subcordiformis*, *Phaeodactylum tricornutum* e *Porphyridium cruentum*. Inicialmente foram estimados os comprimentos  $L$  mínimos necessários para que cada soluto (agentes tóxicos) se homogeneizassem completamente com base nos seus respectivos coeficientes de difusão. A segunda etapa consistiu em determinar as razões de volumes necessárias para cada *splitter*, de maneira a gerar o gradiente desejado. Uma configuração 2-fold log exige que a cada *combiner* (Equação 17) seja abastecido por uma razão 1:1 da solução concentrada do soluto e do seu respectivo solvente. Após a determinação das razões, é necessário estimar as resistências hidráulicas  $R_H$  para cada linha de escoamento (Equação 11), uma vez que  $Q \propto R_H$ . Os autores fizeram uso de um *software* EDA (automação de design eletrônico) para determinação dos comprimentos das linhas de canais  $L$ . A Figura 7 ilustra a planta

eletrônica simulada e o sistema microfluídico convertido em dispositivo. Por fim, os autores demonstraram a efetiva formação dos gradientes monitorando a resistência das microalgas por imagens de microscopia de fluorescência a diferentes concentrações dos agentes tóxicos.



**Figura 7.** Circuito elétrico equivalente para geração de um gradiente de concentração A) 2-fold log e B) linear, e os seus respectivos arranjos convertidos para sistemas microfluídicos C) 2-fold log e D) linear. Imagem extraída na íntegra de Zheng, G. et al<sup>3</sup>.

A proposta de entrega dos solutos (cobre, benzeno, metilbenzeno, nitrobenzeno e clorobenzeno) é simples e exige pequenos comprimentos de misturas. No entanto, isso não afasta a complexidade da malha microfluídica para geração de um gradiente de concentração, sobretudo um gradiente linear (Figura 7D). Sistemas que propõe a manipulação de moléculas com baixos coeficientes de difusão ou alta massa molecular, como, por exemplo, biomoléculas, somam mais complexidade no controle de formação do gradiente de maneira reprodutível e eficiente. Neste contexto,

faz-se necessário compreender quais são os processos de misturas adequados e indicados para uma mistura binária na montagem de um sistema<sup>1</sup>.

#### 9.1.4. Identificação do tipo de processo de mistura em sistemas binários

Um dispositivo gerador de gradiente de concentração ideal deveria ser capaz de reproduzir sempre o mesmo gradiente de concentração para qualquer espécie química de maneira confiável. No entanto, os processos são complexos, bem como a variedade de espécies químicas com características distintas é extensa. Contudo, se  $L_x$  é suficientemente grande ou  $Q$  é lento o suficiente para completa mistura de um soluto  $x$  ( $D_x$ ) antes de alcançar um *splitter*, ou seja, se a combinação de dois fluídos alcançar a homogeneidade antes da subdivisão, é esperado que qualquer soluto com  $D \geq D_x$  também seja completamente misturado em  $L_x$ , abrangendo assim um grupo de solutos compatíveis ao gerador de gradiente de concentração que reproduzirá o mesmo gradiente final.

São muitos trabalhos reportados na literatura que descrevem os mecanismos de misturas por difusão para geração de gradiente de concentração<sup>49,50,51,52,53</sup>. No entanto, os processos difusivos são demasiadamente lentos e muitas vezes demandam grandes comprimentos de mistura  $L$ . Como  $Q$  e  $L$  são inversamente proporcionais (Equação 7), muitas vezes o pesquisador deve decidir priorizar entre o tempo de geração do gradiente ou a redução do dispositivo. A superação desse impasse pode ser resolvido pela substituição de longas linhas de canais por micromisturadores<sup>19,54</sup> ou submeter o escoamento a uma condição turbulenta<sup>55</sup>.

O desenvolvimento de micromisturadores eficientes sem dúvidas tornou-se uma das principais linhas de pesquisa em microfluídica. Micromisturadores são arranjos geométricos confeccionados para gerar uma mistura de dois fluídos de maneira rápida e eficiente<sup>56</sup>. Ao considerar eliminar a necessidade de grandes linhas de canais, espera-se otimizar não apenas o tempo de geração do gradiente de concentração automatizado, mas também reduzir significativamente as dimensões dos dispositivos. No entanto, a proposta de aplicação de um novo micromisturador é complexa e muitas vezes a confecção de dispositivos por técnicas tradicionais é impraticável devido aos detalhes, como obstáculos aos fluídos<sup>57,58</sup>, sobreposição em níveis tridimensionais<sup>59</sup>, espirais<sup>60</sup> e vórtex<sup>61</sup>, grades de relevo e algumas geometrias singulares dos canais<sup>62,63</sup>. Entretanto, o advento da tecnologia de impressão 3D se apresenta para superação de tais inconvenientes. A literatura reporta a utilização de

dispositivos microfluídicos confeccionados a partir de moldes impressos por impressoras 3D, mas ainda é uma tecnologia em inserção nos grupos de pesquisas e sistemas mais complexos foram pouco desenvolvidos<sup>64,65,66</sup>.

A segunda opção para melhorar os efeitos de mistura sem comprometer demasiadamente o tamanho dos dispositivos é por meio da manipulação da taxa de injeção (ou velocidade)  $Q$ . A primeira vista, submeter o escoamento a um processo turbulento, que por consequência acelera a mistura entre dois fluídos, pode parecer uma opção viável. Porém, a pressão gerada ao aplicar uma alta vazão sob os microcanais pode comprometer a selagem ou a estrutura do dispositivo e gerar vazamentos. Outra consequência a ser considerada é a resistência em suportar altas pressões por parte de microrganismos e células, também estudados como analitos<sup>67,68</sup>. Uma alternativa pode ser a dosagem controlada do aumento da taxa de injeção  $Q$  de maneira a gerar perturbações ao sistema, mas não a alcançar turbulências. Essa opção pode agregar uma componente convectiva ao processo de mistura puramente difusivo<sup>1,22,69</sup>.

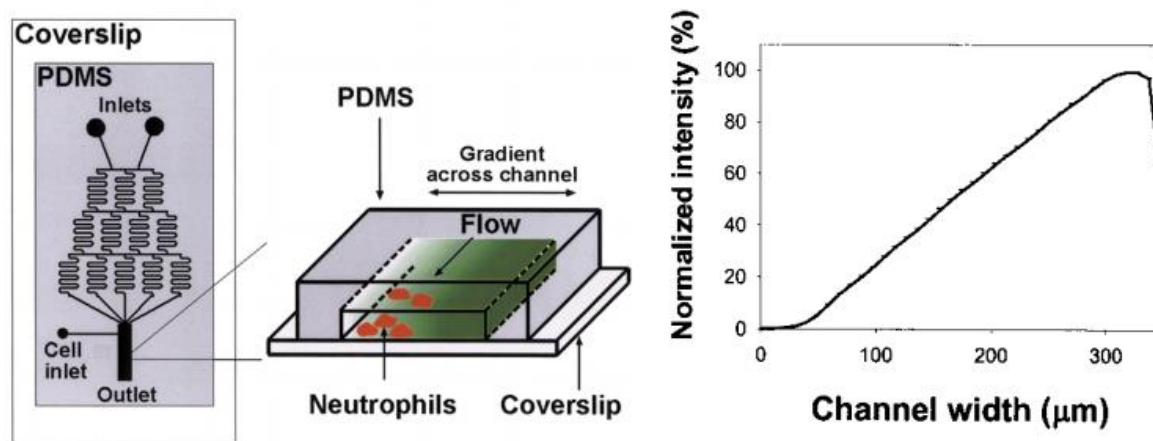
Enquanto o número de Reynolds relaciona a razão entre forças inerciais e forças viscosas para classificar o tipo de escoamento, a classificação do mecanismo de mistura em um sistema binário recorre da utilização do número de Peclet, ( $P_e = U \frac{D_h}{D}$ )<sup>2,11,22</sup>. O número de Peclet é um indicador adimensional da importância do processo convectivo frente ao processo difusivo em misturas. Baseado na magnitude do número de  $P_e$ , pode-se classificar o processo de mistura como:

- Puramente difusivo,  $P_e \ll 1$ .
- Predominantemente convectivo,  $P_e \gg 1$ .

O processo de mistura anteriormente descrito pela equação de conservação de transferência de massa obtida a partir da Lei de Fick (Equação 6) abrange somente o processo de mistura por difusão. Se um sistema possuir  $P_e \gg 1$ , é necessário realizar a adição de um termo à equação referente ao processo de mistura convectivo<sup>36,70</sup>. Logo, a equação de Fick em função dos fluxos mássicos dos compostos A e B, pode ser representada pela Equação 18, com o acréscimo dos fluxos mássicos convectivos<sup>35,71</sup>.

$$\underbrace{N_{Az}}_{\text{fluxo combinado}} = \underbrace{-cD_{AB} \frac{\partial x_A}{\partial z}}_{\text{Difusivo}} + \underbrace{x_A(N_{Az} + N_{Bz})}_{\text{Convectivo}} \quad \text{Equação 18}$$

A construção de gradientes de concentração por transferência de massa em fluídos binários por difusão-convecção tem sido reportado em configurações de  $N$  etapas de diluição em série, também muitas vezes citado como ‘*christmas tree*’<sup>68,72,73</sup>. Jeon Li et al.<sup>74</sup> apresentaram a formação de um sistema com 3 etapas de diluição em série (2 *inlets* e 5 *outputs*). A Figura 8 mostra a configuração do sistema (20 x 50 mm), bem como a caracterização do gradiente de concentração observado em uma imagem de fluorescência do soluto polissacarídeo ligado a fluoresceína (FITC, fluoresceína-isotiocianato – dextran, 8 kDa,  $D = 8,0 \text{ E}^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Os canais foram confeccionados com 50 x 50  $\mu\text{m}$  de largura e altura, e comprimento  $L$  de serpentina não informado; o *splitter* e *combiner* são em formato T. Nota-se que a intensidade normalizada apresenta um perfil linear pela secção transversal do canal (350  $\mu\text{m}$ ) por onde fluxos se unem. No entanto, não são demonstradas caracterizações sobre a completa mistura do soluto antes da câmara onde os fluídos se encontram, em adição, nenhum tipo de caracterização quanto a linearidade também foi proposta.



**Figura 8.** Dispositivo gerador de gradiente de concentração ‘*christmas tree*’ e perfil do gradiente final formado para o soluto FITC<sup>74</sup>.

Para fins práticos, o dispositivo microfluídico de Jeon et al.<sup>74</sup> é eficiente em gerar o gradiente de concentração e pode ser aplicado para os mais variados estudos. Contudo, a não caracterização matemática do perfil do gradiente, bem como a não demonstração da completa mistura dos solutos dentro das serpentinas são recorrentes em muitos trabalhos e podem ser melhores explorados para aplicações em outros sistemas que exigem melhores controles de reprodutibilidade<sup>74</sup>.



Neste cenário, este projeto propõe uma abordagem descritiva de um dispositivo gerador de gradiente de concentração, de maneira a utilizar condições de contornos definidas e obter um controle absoluto do sistema ao desenvolver uma modelagem que descreve e prevê o comportamento do dispositivo para outros solutos sem a necessidade de verificação. Uma das aplicabilidades de um dispositivo gerador de gradiente de concentração pode ser na aplicação em biosensores, mais especificamente em biosensores SPR baseados em arranjos de nanoburacos que é o tema desse projeto. Esses dispositivos possuem uma demanda na construção de sistemas capazes não apenas de detectar biomoléculas, mas também realizar a quantificação, sobretudo para aplicação de prognóstico de doenças (além de diagnóstico precoce). A temática de biosensores SPR é abordada com mais detalhes na próxima secção.

## 9.2. RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIE (SPR)

O fenômeno de ressonância de plasmons de superfície foi relatado pioneiramente por Ritchie na década de 1950<sup>75</sup>. No entanto, o assunto tomou evidência nos anos 90 após Liedberg et al.<sup>76</sup> apresentarem a sensibilidade do fenômeno SPR em monitorar eventos químicos na superfície da plataforma<sup>77</sup>. Para melhor compreensão da SPR os conceitos serão discutidos alicerçados a um modelo genérico.

Considere um material condutor, mais precisamente um metal de massa suficientemente grande para ser considerado *bulk*. Os elétrons livres da banda de condução do metal possuem oscilações que se estendem pelo corpo do metal, abrangendo tanto o interior quanto as superfícies, contudo, as oscilações na superfície não se estendem para fora do corpo do material<sup>78</sup>. A oscilação no interior do metal é denominada plasma, note que o termo plasma é inserido no contexto de um condutor *bulk*. A frequência de oscilação do plasma é descrita por  $\omega_p = \left(\frac{n e^2}{m_{eff}}\right)^{1/2}$  e relaciona a densidade de elétrons do metal  $n$ ; massa específica  $m_{eff}$  e a carga do elétron  $e$ <sup>79,80</sup>.

O plasma pode ser perturbado a partir de uma radiação eletromagnética sob condições específicas, o qual pode ser melhor interpretado com base na relação entre as frequências das radiações incidentes ( $\omega_0$ ) e a frequência do plasma ( $\omega_p$ ) por meio da equação  $\frac{\epsilon'_m}{\epsilon_d} = 1 - \left(\frac{\omega_p}{\omega_0}\right)^2$ . Se  $\frac{\omega_p}{\omega_0} > 1$  ou  $\omega_0 < \omega_p$  a parte real da permissividade

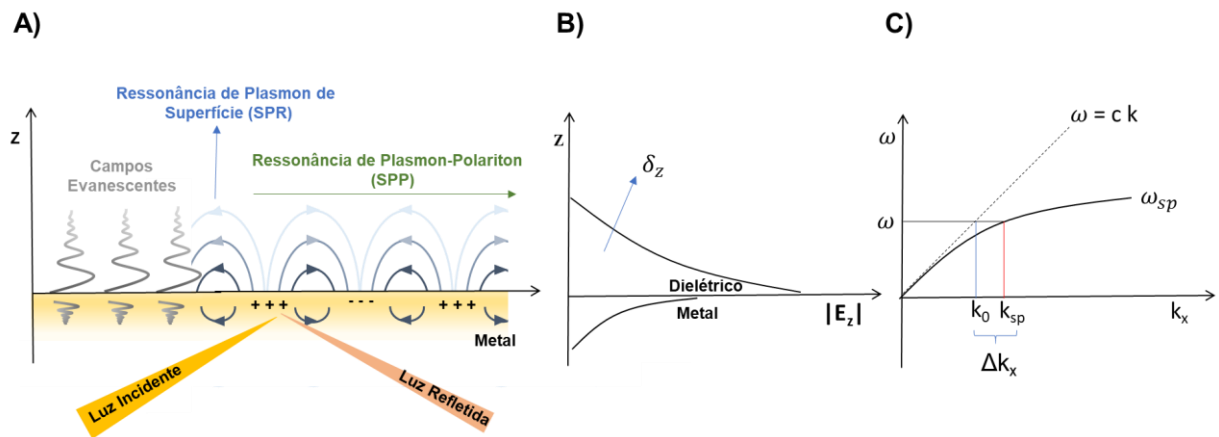
elétrica é negativa, o que proporciona aos elétrons do metal uma oscilação em 180° foi de fase, causando a reflexão de parte da radiação e o acoplamento de uma componente da radiação com a dos elétrons, dando origem ao *bulk*-plasmon<sup>79,80</sup>. Se  $\frac{\omega_p}{\omega_0} < 1$  ou  $\omega_0 > \omega_p$  a parte real da constante dielétrica é positiva e a luz é então transmitida ou absorvida pelas bandas de transição internas do metal<sup>81</sup>. Essa observação justifica a transmissão de radiações na região do ultravioleta (UV) para os metais mais leves.

Se o metal citado anteriormente assume a forma de um filme fino, os elétrons livres da banda de condução do metal que oscilam na superfície podem ser acoplados com a radiação eletromagnética, que por sua vez gera como resultante densidades de cargas também oscilantes na interface metal/dielétrico, este fenômeno é chamado de plasmons de superfície (SPs)<sup>79,82</sup>. Os SPs são considerados quasipartículas que para sua formação algumas condições físicas devem ser atendidas<sup>83</sup>.

Por serem densidades de cargas oscilantes, os SPs possuem uma frequência  $\omega_{sp}$  (Equação 19) e um número de onda  $k_{sp}$  (Equação 20). Essa observação indica que os elétrons oscilantes do plasma serão os mesmos a serem excitados a formar SPs em um filme fino e a formar *bulk*-plasmons em um corpo extenso (*bulk*). A diferença entre *bulk*-plasmons e SPs surge pelo fato dos plasmons no *bulk* se propagarem para o interior do material, enquanto que os SPs são confinados na interface metal/dielétrico de um filme fino<sup>78,81,84</sup>.

$$\omega_{sp} = C k_{sp} \sqrt{\left(\frac{1}{\varepsilon_m}\right) \left(\frac{1}{\varepsilon_d}\right)} \quad \text{Equação 19} \quad k_{sp} = k_0 \sqrt{\frac{\varepsilon_m \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} = k_p \quad \text{Equação 20}$$

A Equação 20 expressa as condições necessárias para a geração dos SPs em um filme fino. A primeira condição é que  $k_0 = k_{sp}$ . Logo, é necessário ocorrer um incremento  $\Delta k_x$  do número de onda da radiação eletromagnética  $k_0$  de maneira a satisfazer a Equação 20 (Figura 9C)<sup>85</sup>. Uma maneira eficiente de obter o  $\Delta k_x$  é por meio do uso de um prisma. A radiação propagante em um meio de índice de refração  $n_0$  descreve seu movimento por  $k_0 = n_0 \left(\frac{\omega}{c}\right) \text{sen } \theta$ . Ao penetrar um prisma de índice de refração  $n_p$ , a propagação assume um incremento  $\Delta k_x$  e o número de onda assume  $k_p = n_p \left(\frac{\omega}{c}\right) \text{sen } \theta + \Delta k_x$ <sup>80</sup>. Uma segunda condição necessária para que a Equação 19 seja satisfeita é que a frequência da radiação seja  $\omega_0 = \omega_{sp}$ , e isso implica que  $\lambda_0 = \lambda_{sp}$ <sup>81</sup>.



**Figura 9.** Representação dos fenômenos envolvidos na geração dos SPs. A) Interface metal/dielétrico por onde é representado a formação e a evanescência dos SPs. B) Extensão de propagação dos SPs no metal e no dielétrico bem como no eixo  $z$  perpendicular à superfície. C) Diferença entre os números de onda dos SPs em relação ao número de onda da radiação incidente.

Satisfazendo as condições físicas mencionadas para geração dos SPs em um filme fino, duas consequências de mesma origem são observadas. A primeira consequência é a propagação longitudinal da densidade de carga oscilante, o que é chamado de plasmon-polariton de superfície (SPPs)<sup>78,81,82</sup>. Os SPPs do ponto de vista clássico podem ser considerados uma onda eletromagnética superficial que se propaga pela interface metal/dielétrico (Figura 9A)<sup>86,87</sup>. Enquanto que o conceito de SPR abrange apenas o acoplamento entre os elétrons da banda de condução do condutor e a radiação eletromagnética na interface sob condições supracritadas<sup>79</sup>. Em adição, alguns trabalhos classificam a SPR de acordo com dois mecanismos de propagação dos SPs. Enquanto os SPPs são SPs que se propagam apenas, e somente pela interface, a ressonância de plasmons de superfície localizados (LSPR) define que os SPs são confinados em dimensões mínimas<sup>78,87</sup>, como, por exemplo em nanoestruturas metálicas<sup>84,88</sup>. A Figura 9 resume de forma ilustrativa os fenômenos envolvidos na geração e propagação dos SPs.

A segunda consequência é a geração de um campo eletromagnético evanescente perpendicular à superfície de propagação dos SPs<sup>84</sup>. A intensidade do campo diminui exponencialmente ao se afastar da superfície de propagação dos SPs<sup>82</sup>. O decaimento da intensidade do campo pode ser estimado pela Equação 21, onde  $E_0$  é o campo elétrico máximo em  $z = 0$ . Um sistema composto por ouro como

condutor e de ar como dielétrico, o valor do comprimento de decaimento é cerca de  $(0,4 \pm 0,1) \lambda$  para dentro do dielétrico<sup>89</sup>. A Figura 9B ilustra o comportamento evanescente dos SPs ao se afastar da interface condutor/dielétrico<sup>90</sup>.

$$E_z = E_0 e^{\left[-\frac{\omega}{c} \left(\frac{-\epsilon'_d}{\epsilon'_m + \epsilon_d}\right)^{\frac{1}{2}} z\right]} \quad \text{Equação 21}$$

A propagação dos SPPs no eixo x e a propagação do campo eletromagnético evanescente no eixo z podem ser estimadas como propriedades extensivas. O comprimento de propagação dos SPPs no eixo x, aqui referido como  $\delta_{sp}$ <sup>79,80</sup>, pode ser estimado pela Equação 22. Note que a propagação é estritamente dependente das permissividades elétricas dos componentes da interface e se extingue ao se afastar do ponto de origem (Figura 9B). A extinção acontece devido à absorção dos elétrons em ressonância plasmônica pelo metal. Um filme fino de prata irradiado por  $\lambda_0 = 500$  nm pode alcançar  $\delta_{sp,Ag} = 20 \mu\text{m}$  no eixo x, por exemplo. O comprimento de propagação ou de penetração do campo eletromagnético evanescente no dielétrico  $\delta_z$  pode ser estimada de acordo com a Equação 23<sup>80</sup>. Um filme fino de ouro em interface com água (dielétrico) irradiado por  $\lambda_0 = 630$  nm pode alcançar  $\delta_{z,\text{água}} = 162$  nm, por exemplo.

$$\delta_{sp} = \frac{1}{2k''_{sp}} = \frac{c}{\omega} \left(\frac{\epsilon'_m + \epsilon_d}{\epsilon'_m \epsilon_d}\right)^{3/2} \frac{(\epsilon'_m)^2}{\epsilon'_m} \quad \text{Equação 22} \quad \delta_z = \frac{c}{\omega} =$$

$$\left(\frac{-\epsilon'_d}{\epsilon'_m + \epsilon_d}\right)^{1/2} \quad \text{Equação 23}$$

Para fins práticos, para a aplicação do fenômeno de SPR para biosensoriamento, por exemplo, a escolha do condutor é crítica. Normalmente são utilizados condutores metálicos como a prata, ouro, cobre e alumínio. Devido a relativa resistência a processos oxidativos e baixa reatividade é preferível a utilização do ouro.

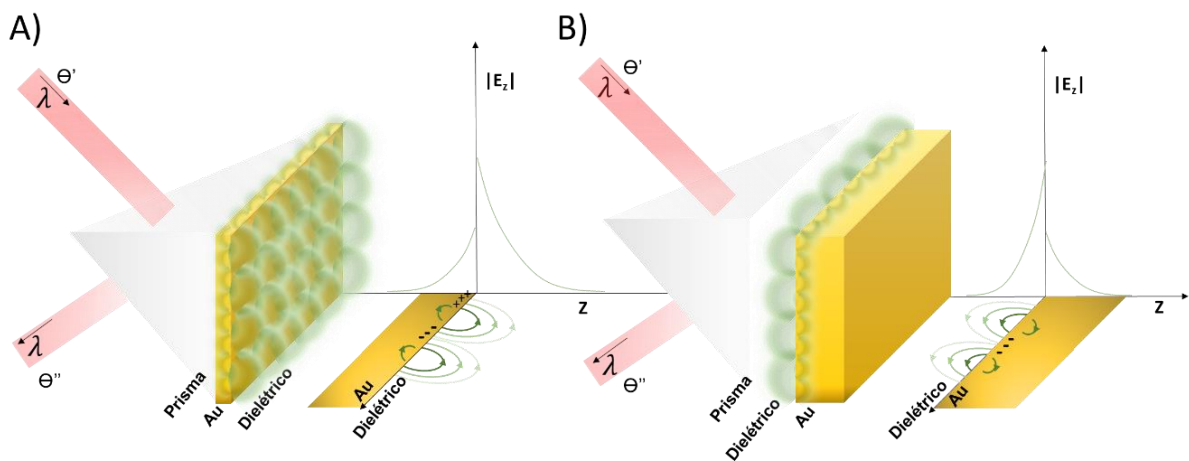
### 9.2.1. Biosensores SPR convencionais

A fundamentação sobre os SPs assume aplicação prática quando entendido que as características dos SPs são diretamente relacionadas a permissividade do dielétrico ( $\epsilon_d$ ), que por sua vez, possui relação com o índice de refração (RI) do dielétrico ( $n_d$ )<sup>91</sup>. Logo, a variação do RI na interface desencadeia uma série de mudanças na geração dos SPs que podem ser monitoradas a partir do controle da radiação emitida para geração dos SPs, bem como pela componente refletida<sup>92</sup>. Esse entendimento é o suporte de diversos dispositivos de sensoriamento biológico SPR

desenvolvidos até então. Neste contexto, é válido esclarecer que em um mesmo sistema pode haver o surgimento de diferentes modos SPs ou modos plasmônicos. Os modos são uma referência a diferentes comprimentos de onda que satisfazem as condições físicas para se combinar com elétrons da banda de valência do metal e gerar SPs<sup>79,80</sup>.

Baseados nessa fundamentação, dois sistemas distintos desenvolvidos por Otto<sup>85</sup> e outro por Kretschmann<sup>90</sup> consistem nas configurações mais utilizadas para o estudo do acoplamento da radiação eletromagnética em SPR, sendo a configuração de Kretschmann a mais empregada nos equipamentos comerciais de sensoriamento. Ambas as configurações se utilizam de um prisma para alcançar o incremento  $\Delta k_x$  a partir da incidência de uma frequência sob ângulo  $\Theta$  perfeito para que o número de onda  $K_0$  se iguale ao número de onda  $K_{sp}$  necessário para a excitação dos SPs. No entanto, a configuração de Otto apresenta uma vacância entre o prisma e o metal, o que soma uma dificuldade experimental na montagem do sistema.

A mudança do RI causada pela formação de ligações químicas na interface metal/dielétrico, por exemplo, proporciona uma variação da permissividade elétrica do dielétrico  $\epsilon_d$ . Como consequência, uma variação do ângulo  $\Theta$  de incidência é observado. Por esse mecanismo, denominado de reflexão interna total atenuada, são monitorados os eventos na superfície do metal condutor<sup>93</sup>. A Figura 10 ilustra a configuração dos dispositivos desenvolvidos por Kretschmann e Otto, respectivamente.



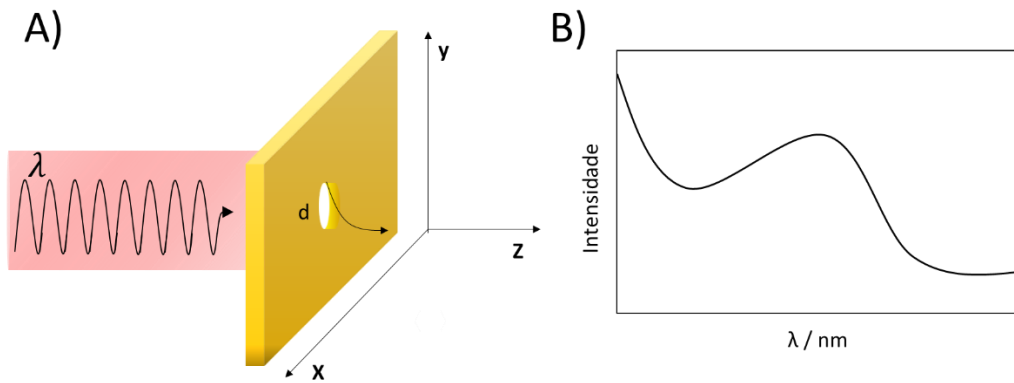
**Figura 10.** Setup experimental para geração de SPR propostos por A) Kretschmann e B) Otto.

### 9.2.2. Fenômeno SPR em nanoburacos e arranjos de nanoburacos

Em contraste com as dificuldades experimentais supramencionadas para as configurações dos biosensores SPR pelas configurações de Kretschmann e Otto, surge-se como opção a utilização de nanoestruturas metálicas para geração de modos SPs, as quais exibem configurações experimentais mais simples. Em particular a configuração de biosensores baseados em arranjos de nanoburacos, que por ser parte deste trabalho, será discutida em detalhes frente a configurações como SPs em grades de relevo, superfícies com texturas ou nanopartículas de ouro, por exemplo.

Ao estudar o fenômeno de difração da luz incidida sobre uma superfície metálica contendo um orifício/buraco de diâmetro de sub-comprimento de onda, Bethe<sup>94</sup> nos anos 40 concluiu que a transmissão da radiação seria mínima, e que a quantidade de luz transmitida diminuiria ao passo do aumento do  $\lambda_0$  da radiação incidida. Foi ainda proposto que a eficiência de transmissão respeitaria a equação  $E_T = \frac{64 (kr)^4}{27 \pi^4}$ , onde  $r$  é o raio do buraco. No entanto, anos mais tarde Ebbesen<sup>95</sup> demonstrou que uma abertura circular em um filme metálico opticamente denso apresenta uma transmissão luminosa não prevista pela teoria de Bethe. A radiação apresentou uma banda de transmissão com quantidade de luz maior que a esperada, em outras palavras, o fluxo de fótons por unidade de área transmitido foi maior que do fluxo de incidência (Figura 11). Para esse fenômeno foi atribuído o nome de *Extraordinary Optical Transmission* (EOT)<sup>96</sup>.

A hipótese mais aceita para explicar a EOT é que há um acoplamento da radiação incidente aos elétrons livres do metal em modos SPs, que por sua vez são tuneladas pelo buraco e re-irradiados na face anterior<sup>97</sup>. A justificativa apresentada por Ebbesen é que a teoria de Bethe é aplicável idealmente a aberturas ausentes de espessuras, diferente de buracos que possuem um caminho contínuo relativamente espesso, como em um filme fino. Desta maneira, o espectro de transmissão da luz através de um único buraco tem relação direta com a espessura do filme<sup>98</sup>.



**Figura 11.** A) Esquema representativo do mecanismo de transmissão da luz extraordinária (EOT) de um orifício em um substrato metálico. B) Espectro de transmissão representativo de um único orifício em um substrato metálico.

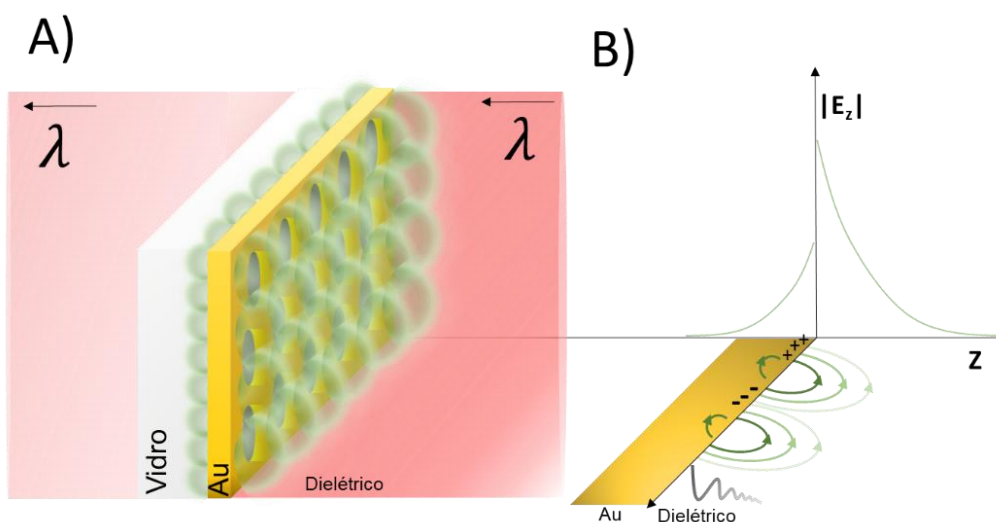
No contexto de excitação dos elétrons da banda de condução do metal a formar modos SPs em nanoburacos, há necessidade de incrementar o momento ou número de onda da radiação incidente. Logo, a formação dos modos SPs no buraco assume a condição  $k_{sp} = k_0 + G$ , sendo  $G$  o incremento do número de onda necessário para geração dos modos SPs em nanoburacos<sup>98</sup>. O incremento  $G$  pode ser alcançado construindo uma matriz de buracos periodicamente ordenados. Ebbesen justifica que devido a associação de buracos periodicamente ordenados, a radiação é espalhada pelos buracos produzindo modos SPs incapazes de se propagarem como SPPs, dessa maneira o campo eletromagnético é intensificado e o incremento  $G$  alcançado, bem como na face anterior que reemite a radiação<sup>99</sup>.

Ao manipular a periodicidade da matriz de buracos, bem como o diâmetro e geometria, foi observado que é possível correlacionar a permissividade elétrica do metal e do dielétrico, e estimar o comprimento de onda máximo de transmissão ( $\lambda_{max}$ ) da EOT pela Equação 24, onde  $i$  e  $j$  são números inteiros dos coeficientes de difração relacionados a matriz de nanoburacos e  $P$  é a periodicidade<sup>98,100</sup>.

$$\lambda_{max} = \frac{P}{\sqrt{i^2 + j^2}} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \quad \text{Equação 24}$$

O uso de plataformas plasmônicas que utilizam matrizes ou arranjos de nanoburacos eliminam a complexidade de alinhamento óptico exigido em sensores SPR convencionais. A luz incidente nesse tipo de nanoestrutura é convertida diretamente em plasmons de superfície sem a necessidade de um prisma. Enquanto que o monitoramento dos eventos químicos/bioquímicos podem ser realizados com

base na quantidade de radiação transmitida em um alinhamento colinear ( $\Theta = 0$ ) da radiação incidente aos arranjos de nanoburacos<sup>101</sup>. A Figura 12 ilustra a formação dos SPs nos arranjos de nanoburacos e como se propagam o campo elétrico no eixo z.



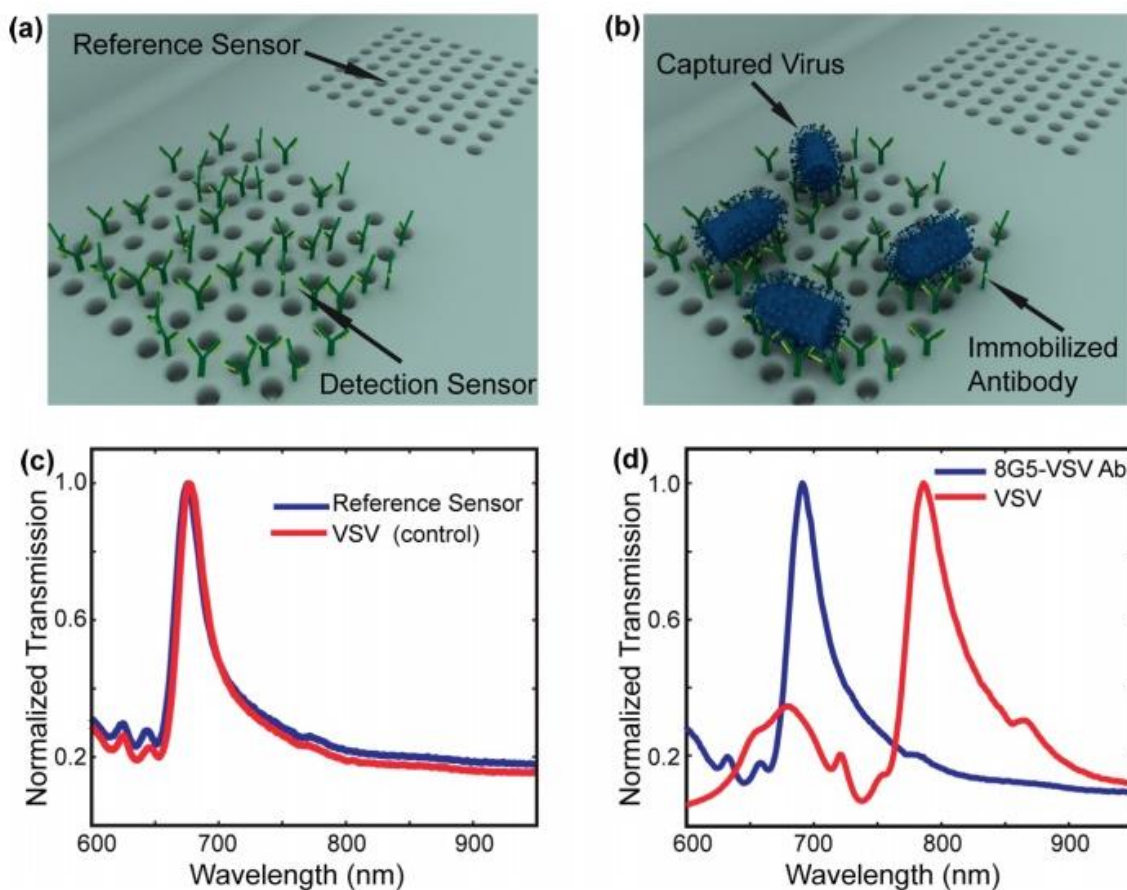
**Figura 12.** A) Esquema ilustrativo do fenômeno de Plasmons de Superfície em arranjos de nanoburacos. B) Representação da propagação do campo elétrico no eixo z.

### 9.2.3. Biosensores SPR baseados em arranjos de nanoburacos

Assim como para os biosensores de Otto e Kretschmann, os biosensores SPR baseados arranjos de nanoburacos são fundamentados na variação do RI local a interface metal/dielétrico. Yanik et al.<sup>102</sup> desenvolveram uma plataforma plasmônica ( $90 \mu\text{m} \times 90 \mu\text{m}$ ) de nanoburacos circulares com raios de 220 nm e periodicidade de 600 nm para a detecção do vírus da estomatite vesicular (VSV). A Figura 13C apresenta o espectro de transmissão da EOT antes (azul) e depois (vermelho) da incubação do substrato plasmônico em VSV ( $10^9 \text{PFU}^* \text{mL}^{-1}$ ) na ausência do elemento de bioreconhecimento para o VSV, ou seja, a não ligação do VSV ao substrato não altera RI, e conseqüentemente não há *redshift*. Com a imobilização do 8G5-VSV (elemento de reconhecimento do VSV) é possível claramente notar o *redshift* da banda de transmissão antes (azul) e após (vermelho) a exposição do VSV ( $10^9 \text{PFU mL}^{-1}$ ) (Figura 13D)<sup>102</sup>.

\* Unidade Formadora de Placa (PFU)





**Figura 13.** A) Esquema representativo do biosensor SPR baseado em arranjo de nanoburacos B) Etapa de captura do vírus por parte do anticorpo. C) Espectro de transmissão da EOT na ausência do anticorpo 8G5-VSV. D) Espectro de transmissão da EOT de detecção do VSV na presença do anticorpo 8G5-VSV. Imagem extraída na integra de Yanik, A. A., et al<sup>102</sup>.

Em nosso laboratório Monteiro et al.<sup>103</sup> confeccionaram uma plataforma plasmônica contendo arranjos de nanoburacos com diâmetros de 200 nm e periodicidade de 400 nm, alinhados colinearmente a um laser monocromático de He/Ne com emissão em 633 nm. Pelo método de aquisição de imagens, os pesquisadores acompanharam a intensidade de EOT do microarranjo ao passo que a superfície do transdutor foi submetida a uma modificação bioquímica. Após preparar a superfície do substrato adequadamente, foi possível detectar o HER 2 (Receptor Epidermal Humano 2) com concentração de até 3,0 ng mL<sup>-1</sup> <sup>103</sup>.

A utilização do fenômeno de SPR em arranjo de nanoburacos para o desenvolvimento de biosensores tem ganhado importância por se tratar de uma

técnica bastante sensível e com a capacidade de integrar outros sistemas laboratoriais<sup>101,104,105,106</sup>. Porém, grande parte dos trabalhos normalmente apresentam a detecção de analitos e não a quantificação. A quantificação é uma dificuldade comum pois haveria a necessidade de realizar inúmeros processos de monitoramento sob a exposição de concentrações variadas do analito para elaboração de uma curva de calibração. No entanto, as ligações formadas sobre a superfície são, em sua maioria, irreversíveis, o que torna impraticável a reutilização do mesmo arranjo de nanoburacos para uma segunda análise. Diante deste cenário, a opção mais viável é a criação de uma plataforma plasmônica com múltiplos arranjos de nanoburacos, onde os arranjos sejam expostos paralelamente a concentrações diferentes de analitos, sendo possível então a correlação dos efeitos dos SPs e a quantificação do analito.

#### **9.2.4. Biosensores SPR baseados em arranjos hexagonais**

Outra vertente inovadora dos biosensores plasmônicos, frente às plataformas convencionais, está associada a utilização de nanoestruturas com geometrias não esféricas a fim de se obter uma resposta mais eficiente. As propriedades ópticas dos sensores baseados em nanoburacos podem ser otimizadas simplesmente alterando algumas propriedades do substrato, como periodicidade, espessura do filme metálico, dimensão dos nanoburacos e também sua geometria. Estudos recentes mostram que matrizes hexagonais podem produzir sensores plasmônicos com elevada sensibilidade, uma vez que apresentam elevada densidade de distribuição dos nanoburacos<sup>126</sup>. A elevada densidade dos nanoburacos hexagonais reduz a resistência de fluxo óptico tornando a detecção do analito mais precisa. Em seu trabalho, Rakhshani et al.<sup>126</sup> apresentaram um modelo de sensor com nanoburacos hexagonais alcançando sensibilidade de 3172 nm/UIR, podendo ser utilizado como plataforma sensorial para detecção de grupos sanguíneos com um limite mínimo de detecção de  $1 \times 10^{-4}$  RIU. Outro detalhe importante a salientar é a organização hexagonal dos arranjos, que, segundo Ekşioğlu et al.<sup>127</sup> apresenta sensibilidade semelhante ao modelo quadrático, porém suporta maiores valores de figura de mérito (FOM) devido ao fenômeno de EOT apresentar sinal com maior nitidez. Nesse trabalho eles também destacaram que os arranjos hexagonais apresentaram um maior deslocamento de ressonância espectral causado pela presença de um dielétrico de 10 nm sobre a superfície de ouro, que pode ser ainda maior no caso de ambos os arranjos possuírem a mesma periodicidade. Nesse aspecto é fundamental a

elaboração de uma plataforma que garanta elevada eficiência no processo de detecção com elevada confiabilidade dos resultados e com perspectiva de preparo de um sensor comercial para detecção dos analitos de interesse em concentrações muito baixas.

### 9.3. BIOSENSORES NA DETECÇÃO DA PROTEÍNA $\beta$ -AMILÓIDE

Estudos envolvendo a detecção de Doença de Alzheimer (DA) por meio de biosensores plasmônicos se tornaram mais presentes na literatura a partir do início do século XXI. Alguns trabalhos reportam a avaliação de um biosensor SPR baseado na configuração de Kretschmann para detecção da DA<sup>107-112</sup>. No entanto, apesar da elevada sensibilidade, os inconvenientes experimentais da configuração de Kretschmann impulsionaram estudos para determinação biomolecular em dispositivos mais simplificados tais como aqueles baseados em SPR localizado (LSPR) para determinação da proteína  $\beta$ -amilóide<sup>113,114</sup> e da proteína  $\tau$ <sup>115,116</sup>.

Ainda que a literatura disponha de trabalhos avaliando o potencial dos biosensores plasmônicos no diagnóstico precoce da DA, estudos envolvendo a morfologia, bem como os arranjos de nanopartículas na construção desses dispositivos, ainda não foram reportados.

Quantificações realizadas por Mehta e colaboradores<sup>117</sup> via método ELISA detectaram as proteínas  $\beta$ -amilóide A $\beta$  1–40 e A $\beta$ 1–42 em concentrações de 20 pg/mL e 40 pg/mL, respectivamente<sup>118</sup>. Embora o método ELISA tenha sido capaz de detectar a proteína em baixas concentrações, opera-se com moléculas marcadas que pode gerar falsas respostas e ainda as análises são onerosas e necessitam de laboratórios especializados dificultando análises *point-of-care*<sup>119</sup>.

Recentemente, Kim et al<sup>120</sup> avaliou a sensibilidade de um biosensor LSPR para detecção da proteína  $\beta$ -amilóide utilizando nanopartículas de ouro com geometrias esférica e em bastão. Como resultado, os autores quantificaram a proteína  $\beta$ -amilóide na ordem de  $10^{-15}$  mol/L. A sensibilidade do biosensor LSPR foi capaz de identificar concentrações similares às presentes no corpo humano. Entretanto, este método não permite a integração de sistemas microfluídicos formando dispositivos *lab-on-a-chip* diferentemente de plataformas plasmônicas baseadas em arranjos de nanoburacos, como proposto nesse projeto.

Diante do exposto, o uso de arranjos de nanoburacos em filme de ouro, como meio gerador de SPs, é um campo que pode ser explorado na detecção de proteínas associadas ao Alzheimer, visto que apresenta vantagens com relação a outros métodos que a literatura reporta e que ainda carece de trabalhos utilizando tal plataforma como detecção. Isso tudo acoplado a tecnologia microfluídica pode levar ao desenvolvimento de produtos ou metodologias eficientes para o diagnóstico de doenças de forma precoce, facilitando o tratamento, diminuindo filas de espera, diminuindo tempo de internamento, enfim, trazendo grandes benefícios à população em geral.

## 10. CRONOGRAMA DETALHADO (36 meses)

ID	Atividade	Marco Físico	Início (mês)	Fim (mês)	Responsável	Atuantes
1	a. Design	Confeccionar diferentes configurações para um dispositivo de diluição em série.	1	1	A	A, F, G, H
	b. Modelagem matemática	Identificar pelo modelo matemático os coeficientes de concentração dos dispositivos propostos.	2	2	E	E, F, G, H
	c. Ensaios 1	Caracterizar experimentalmente a formação dos coeficientes de concentração dos dispositivos propostos.	3	3	A	A, F, G, H
	d. Modelagem computacional	Caracterizar a formação dos coeficientes de concentração dos dispositivos propostos por simulações computacionais.	3	4	E	E, F, G, H
	e. Mistura	Identificar efeitos no processo de diluição decorrentes das configurações das câmaras de mistura.	4	4	E	A, E, F, G, H
	f. Finalização	Apresentar uma descrição matemática de reprodutibilidade do dispositivo proposto.	5	6	E	A, E, F, G, H
2	Fabricação	Fabricar filmes finos de ouro sobre placas de vidro através de técnicas de deposição de metais.	7	8	C	C, H
3	a. Perfuração	Perfurar os filmes finos de ouro com diferentes formas e distribuições geométricas de arranjos.	8	11	D	D, F, H
	b. Ensaios 2	Caracterizar as plataformas metálicas através de microscopias ópticas.	11	12	D	D
4	Sensibilidade	Caracterizar as plataformas metálicas quanto a sensibilidade frente a biomoléculas padrão como a BSA (albumina de soro bovino).	13	15	A	A, F, G
5	Acoplamento	Acoplar o dispositivo microfluídico gerador de gradiente de concentração a plataforma plasmônica para um bioensaio de detecção de BSA.	16	20	A	A, F, G
6	a. Imobilização	Realizar a imobilização de bioreceptor da proteína $\beta$ -amilóide (marcador da Doença de Alzheimer) sobre arranjos de nanoburacos.	21	25	A	A, F, G
	b. $\beta$ -Amilóide	Executar a detecção e quantificação das proteínas $\beta$ -amilóide a partir de uma amostra com concentração desconhecida.	26	30	A	A, F, G
7	Validação	Validar ou certificar as leituras do biosensor através da comparação com resultados de análises clínicas convencionais em mesma amostragem.	30	34	B	B
8	Avaliação Final	Avaliar a aplicação do sistema para o estudo de biomoléculas utilizadas como marcadores de outras doenças neuro-degenerativas.	35	36	A	A, B, F, G

Equipe: (A) Emerson Giroto, B (Jaqueline Rinaldi), (C) Alexandre Urbano, (D) Marcos R. Guilherme, (E) Marcos de Souza, (F)

Jean Halison, (G) Maiara Taniguchi, (H) Bento Cabral.

## 11. BIBLIOGRAFIA CITADA (incluindo doi)

- <sup>1</sup> Hu, C.; Liu, J.; Chen, H.; Nie, F. Microfluidic Platforms for Gradient Generation and its Applications. *Biochem. Anal. Biochem.* **2017**, *06*, <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000320>.
- <sup>2</sup> Atencia, J.; Beebe, D. J. Controlled microfluidic interfaces. *Nature* **2005**, *437*, 648. <https://doi.org/10.1038/nature04163>.
- <sup>3</sup> Zheng, G.; Lu, L.; Yang, Y.; Wei, J.; Han, B.; Zhang, Q.; Wang, Y. Development of Microfluidic Dilution Network-Based System for Lab-on-a-Chip Microalgal Bioassays. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 13280. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02597>.
- <sup>4</sup> Singh, P. SPR Biosensors: Historical Perspectives and Current Challenges. *Sensors Actuators, B Chem.* **2016**, *229*, 110. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.118>.
- <sup>5</sup> Li, Z.; Leustean, L.; Inci, F.; Zheng, M.; Demirci, U.; Wang, S. Plasmonic-based platforms for diagnosis of infectious diseases at the point-of-care. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 107440. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107440>.
- <sup>6</sup> Beilke, M. C.; Klotzbach, T. L.; Treu, B. L.; Sokic-Lazic, D.; Wildrick, J.; Amend, E. R.; Gebhart, L. M.; Arechederra, R. L.; Germain, M. N.; Moehlenbrock, M. J.; Sudhanshu; Minter, S. D. Em *Micro Fuel Cells* Elsevier Inc., 2009.
- <sup>7</sup> Xiao, X.; Xia, H.; Wu, R.; Bai, L.; Yan, L.; Magner, E.; Cosnier, S.; Lojou, E.; Zhu, Z.; Liu, A. Tackling the Challenges of Enzymatic (Bio) Fuel Cells. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 9509. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00115>.
- <sup>8</sup> Chen, X.; Yin, L.; Lv, J.; Gross, A. J.; Le, M.; Gutierrez, N. G.; Li, Y.; Jeerapan, I.; Giroud, F.; Berezovska, A.; O'Reilly, R. K.; Xu, S.; Cosnier, S.; Wang, J. Stretchable and Flexible Buckypaper-Based Lactate Biofuel Cell for Wearable Electronics. *Adv. Funct. Mater.* **2019**, *29*, 1. <https://doi.org/10.1002/adfm.201905785>.
- <sup>9</sup> Westwater, J. W.; Drickamer, H. G. The Mathematics of Diffusion. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 1267. <https://doi.org/10.1021/ja01562a072>.
- <sup>10</sup> Maurício Gobbi, Dias, N. L. *Introdução a Mecânica dos Fluidos e aos Fenômenos de Transportes*, Universidade Federal do Paraná, **2012**.
- <sup>11</sup> Byron Bird, M. R.; Stewart, W. E.; Lightfoot, E. N. *Transport Phenomena*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, **2006**.
- <sup>12</sup> Holmes, D. P. Confined Fluid Flow: Microfluidics and Capillarity. *Univ. Roma* **2015**.
- <sup>13</sup> Sinton, D. Pressure Drop in Rectangular Microchannels as Compared With Theory Based on Arbitrary Cross. **2009**, *131*, 1. <https://doi.org/10.1115/1.3077143>.
- <sup>14</sup> Chen, X.; Zhang, S. A novel macromodel based on krylov subspace projection method for micromixers with serpentine channels. *Int. J. Nonlinear Sci. Numer. Simul.* **2018**, *19*, 275. <https://doi.org/10.1515/ijnsns-2017-0013>.
- <sup>15</sup> Chen, X.; Li, T.; Zeng, H.; Hu, Z.; Fu, B. Numerical and experimental investigation on micromixers with serpentine microchannels. *Int. J. Heat Mass Transf.* **2016**, *98*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2016.03.041>.
- <sup>16</sup>Mixing Characteristic of T-type micrfluidic mixers.pdf. [s.d.].
- <sup>17</sup> Shamloo, A.; Vatankhah, P.; Akbari, A. Analyzing mixing quality in a curved centrifugal micromixer through numerical simulation. *Chem. Eng. Process. - Process Intensif.* **2017**, *116*, 9. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2017.03.008>.
- <sup>18</sup> Sahu, P. K.; Golia, A.; Sen, A. K. Analytical, numerical and experimental investigations of mixing fluids in microchannel. *Microsyst. Technol.* **2012**, *18*, 823. <https://doi.org/10.1007/s00542-012-1511-3>.
- <sup>19</sup> Nguyen, N. T.; Wu, Z. Micromixers - A review. *J. Micromechanics Microengineering* **2005**, *15*, <https://doi.org/10.1088/0960-1317/15/2/R01>.

- <sup>20</sup> Goldstein, R. E.; Austin, R. H.; Brody, J. P.; Yager, P. Biotechnology at low Reynolds numbers. *Biophys. J.* **1996**, *71*, 3430. [//a1996vx96900051](https://doi.org/10.1088/0960-1317/20/1/015029).
- <sup>21</sup> Soleymani, A.; Yousefi, H.; Ratchananusorn, W.; Turunen, I. Pressure drop in micro T-mixers. *J. Micromechanics Microengineering* **2010**, *20*, <https://doi.org/10.1088/0960-1317/20/1/015029>.
- <sup>22</sup> Squires, T. M.; Quake, S. R. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Rev. Mod. Phys.* **2005**, *77*, 977. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.77.977>.
- <sup>23</sup> Liu, Y. Z.; Kim, B. J.; Sung, H. J. Two-fluid mixing in a microchannel. *Int. J. Heat Fluid Flow* **2004**, *25*, 986. <https://doi.org/10.1016/j.ijheatfluidflow.2004.03.006>.
- <sup>24</sup> Reynolds, O. On the Dynamical Theory of Incompressible Viscous Fluids and the Determination of the Criterion. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **1895**, *186*, 123. <https://doi.org/10.1098/rsta.1895.0004>.
- <sup>25</sup> Addae-Mensah, K. A.; Wang, Z.; Parsa, H.; Chin, S. Y.; Laksanasopin, T.; Sia, S. K. *Fundamentals of Microfluidics Devices* 2010.
- <sup>26</sup> Zhu, P.; Wang, L. Passive and active droplet generation with microfluidics: a review. *Lab Chip* **2017**, *17*, 34. <https://doi.org/10.1039/C6LC01018K>.
- <sup>27</sup> Finlayson, B. A.; Aditya, A.; Brasher, V.; Dahl, L.; Dinh, H. Q.; Flynn, J.; Jenssen, C.; Kress, D.; Moon, A.; Ninh, F.; Nordmeier, A. Mixing of Liquids in Microfluidic Devices How to measure the quality of mixing. *Proc. COMSOL Conf. 2008 Bost. Mix.* **2008**, *1*. <http://www.comsol.com/paper/mixing-of-liquids-in-microfluidic-devices-5016>.
- <sup>28</sup> Suh, Y. K.; Kang, S. A review on mixing in microfluidics. *Micromachines* **2010**, *1*, 82. <https://doi.org/10.3390/mi1030082>.
- <sup>29</sup> Brillouin, M. Jean Leonard Marie Poiseuille. *J. Rheol. (N. Y. N. Y.)*. **1930**, *1*, 345. <https://doi.org/10.1122/1.2116329>.
- <sup>30</sup> PFITZNER, J. Poiseuille and his law. *Anaesthesia* **1976**, *31*, 273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2044.1976.tb11804.x> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/779509>.
- <sup>31</sup> Hagen, G. Ueber die Bewegung des Wassers irr engcn cylindrischn Bdhren. *Ann. Phys.* **1839**, *122*, 423.
- <sup>32</sup> Oh, K. W.; Lee, K.; Ahn, B.; Furlani, E. P. Design of pressure-driven microfluidic networks using electric circuit analogy. *Lab Chip* **2012**, *12*, 515. <https://doi.org/10.1039/c2lc20799k>.
- <sup>33</sup> Shi, H.; Hou, Z.; Zhao, Y.; Nie, K.; Dong, B.; Chao, L.; Shang, S.; Long, M.; Liu, Z. Rapid and steady concentration gradient generation platform for an antimicrobial susceptibility test. *Chem. Eng. J.* **2019**, *359*, 1327. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.11.046>.
- <sup>34</sup> Vasilakis, N.; Papadimitriou, K. I.; Morgan, H.; Prodromakis, T. Novel modular pressure and flow rate balanced microfluidic serial dilution networks on printed circuit boards: Designs, Simulations and Fabrication. *bioRxiv* **2018**, 270124. <https://doi.org/10.1101/270124>.
- <sup>35</sup> Toh, A. G. G.; Wang, Z. P.; Yang, C.; Nguyen, N. T. Engineering microfluidic concentration gradient generators for biological applications. *Microfluid. Nanofluidics* **2014**, *16*, 1. <https://doi.org/10.1007/s10404-013-1236-3>.
- <sup>36</sup> Bruus, H. Theoretical Microfluidics (Oxford Master Series in Physics). **2007**, *18*, 40. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25246403>.
- <sup>37</sup> Wang, Y.; Mukherjee, T.; Lin, Q. Systematic modeling of microfluidic concentration gradient generators. *J. Micromechanics Microengineering* **2006**, *16*, 2128. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/16/10/029>.
- <sup>38</sup> Cornish, R. J. Flow in a Pipe of Rectangular Cross-Section. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **1928**, *120*, 691. <https://doi.org/10.1098/rspa.1928.0175>.
- <sup>39</sup> Sørensen, K. T.; Kristensen, A. Label-free monitoring of diffusion in microfluidics. *Micromachines* **2017**, *8*, 1. <https://doi.org/10.3390/mi8110329>.

- <sup>40</sup> Lee, K.; Kim, C.; Ahn, B.; Panchapakesan, R.; Full, A. R.; Nordee, L.; Kang, J. Y.; Oh, K. W. Generalized serial dilution module for monotonic and arbitrary microfluidic gradient generators. *Lab Chip* **2009**, *9*, 709. <https://doi.org/10.1039/b813582g>.
- <sup>41</sup> Tsuji, T.; Matsumoto, Y.; Kugimiya, R.; Doi, K.; Kawano, S. Separation of Nano- and Microparticle Flows Using Thermophoresis in Branched Microfluidic Channels. *Micromachines* **2019**, *10*, 321. <https://doi.org/10.3390/mi10050321>.
- <sup>42</sup> Hattori, K.; Sugiura, S.; Kanamori, T. Generation of arbitrary monotonic concentration profiles by a serial dilution microfluidic network composed of microchannels with a high fluidic-resistance ratio. *Lab Chip* **2009**, *9*, 1763. <https://doi.org/10.1039/b816995k>.
- <sup>43</sup> Walker, G. M.; Monteiro-Riviere, N.; Rouse, J.; O'Neill, A. T. A linear dilution microfluidic device for cytotoxicity assays. *Lab Chip* **2007**, *7*, 226. <https://doi.org/10.1039/b608990a>.
- <sup>44</sup> Lee, K.; Kim, C.; Kim, Y.; Jung, K.; Ahn, B.; Kang, J. Y.; Oh, K. W. 2-Layer Based Microfluidic Concentration Generator By Hybrid Serial and Volumetric Dilutions. *Biomed. Microdevices* **2010**, *12*, 297. <https://doi.org/10.1007/s10544-009-9385-6>.
- <sup>45</sup> Jacobson, S. C.; McKnight, T. E.; Ramsey, J. M. Microfluidic devices for electrokinetically driven parallel and serial mixing. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4455. <https://doi.org/10.1021/ac990576a>.
- <sup>46</sup> Jiang, X.; Ng, J. M. K.; Stroock, A. D.; Dertinger, S. K. W.; Whitesides, G. M. A miniaturized, parallel, serially diluted immunoassay for analyzing multiple antigens. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5294. <https://doi.org/10.1021/ja034566+>.
- <sup>47</sup> Qilong, S.; Qiongwei, Z.; Zhigang, L. U. Generation of Linear and Parabolic Concentration Gradients by Using a Christmas Tree-Shaped Microfluidic Network. **2018**, *23*, 244.
- <sup>48</sup> Lee, K.; Kim, C.; Kim, Y.; Ahn, B.; Bang, J.; Kim, J.; Panchapakesan, R.; Yoon, Y. K.; Kang, J. Y.; Oh, K. W. Microfluidic concentration-on-demand combinatorial dilutions. *Microfluid. Nanofluidics* **2011**, *11*, 75. <https://doi.org/10.1007/s10404-011-0775-8>.
- <sup>49</sup> Lin, F.; Butcher, E. C. T cell chemotaxis in a simple microfluidic device. *Lab Chip* **2006**, *6*, 1462. <https://doi.org/10.1039/b607071j>.
- <sup>50</sup> Irimia, D.; Geba, D. A.; Toner, M. Universal microfluidic gradient generator. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3472. <https://doi.org/10.1021/ac0518710>.
- <sup>51</sup> Lee, J. S. H.; Hu, Y.; Li, D. Electrokinetic concentration gradient generation using a converging-diverging microchannel. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *543*, 99. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.04.041>.
- <sup>52</sup> Walker, G. M.; Zeringue, H. C.; Beebe, D. J. Microenvironment design considerations for cellular scale studies. *Lab Chip* **2004**, *4*, 91. <https://doi.org/10.1039/b311214d>.
- <sup>53</sup> Stone, H. A.; Stroock, A. D.; Ajdari, A. Engineering Flows in Small Devices. *Annu. Rev. Fluid Mech.* **2004**, *36*, 381. <https://doi.org/10.1146/annurev.fluid.36.050802.122124>.
- <sup>54</sup> Hessel, V.; Löwe, H.; Schönfeld, F. Micromixers - A review on passive and active mixing principles. *Chem. Eng. Sci.* **2005**, *60*, 2479. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2004.11.033>.
- <sup>55</sup> You, J. B.; Kang, K.; Tran, T. T.; Park, H.; Hwang, W. R.; Kim, J. M.; Im, S. G. PDMS-based turbulent microfluidic mixer. *Lab Chip* **2015**, *15*, 1727. <https://doi.org/10.1039/c5lc00070j>.
- <sup>56</sup> Cai, G.; Xue, L.; Zhang, H.; Lin, J. A review on micromixers. *Micromachines* **2017**, *8*, <https://doi.org/10.3390/mi8090274>.
- <sup>57</sup> Alam, A.; Afzal, A.; Kim, K. Y. Mixing performance of a planar micromixer with circular obstructions in a curved microchannel. *Chem. Eng. Res. Des.* **2014**, *92*, 423. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.09.008>.
- <sup>58</sup> Wang, L. Mixing enhancement of a passive microfluidic mixer containing triangle baffle. *Technology* **2014**, *9*, 877. <https://doi.org/10.1002/apj>.
- <sup>59</sup> Hossain, S.; Kim, K. Y. Mixing performance of a serpentine micromixer with non-aligned inputs. *Micromachines* **2015**, *6*, 842. <https://doi.org/10.3390/mi6070842>.



- <sup>60</sup> Scherr, T.; Quitadamo, C.; Tesvich, P.; Park, D. S. W.; Tiersch, T.; Hayes, D.; Choi, J. W.; Nandakumar, K.; Monroe, W. T. A planar microfluidic mixer based on logarithmic spirals. *J. Micromechanics Microengineering* **2012**, *22*, <https://doi.org/10.1088/0960-1317/22/5/055019>.
- <sup>61</sup> Sudarsan, A. P.; Ugaz, V. M. Multivortex micromixing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 7228. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507976103>.
- <sup>62</sup> Clark, J.; Kaufman, M.; Fodor, P. S. Mixing enhancement in serpentine micromixers with a non-rectangular cross-section. *Micromachines* **2018**, *9*, <https://doi.org/10.3390/mi9030107>.
- <sup>63</sup> Javaid, M. U.; Cheema, T. A.; Park, C. W. Analysis of passive mixing in a serpentine microchannel with sinusoidal side walls. *Micromachines* **2017**, *9*, 1. <https://doi.org/10.3390/mi9010008>.
- <sup>64</sup> Gong, H.; Woolley, A. T.; Nordin, G. P. High density 3D printed microfluidic valves, pumps, and multiplexers. *Lab Chip* **2016**, *16*, 2450. <https://doi.org/10.1039/c6lc00565a>.
- <sup>65</sup> Amin, R.; Knowlton, S.; Hart, A.; Yenilmez, B.; Ghaderinezhad, F.; Katebifar, S.; Messina, M.; Khademhosseini, A.; Tasoglu, S. 3D-printed microfluidic devices. *Biofabrication* **2016**, *8*, 1. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/2/022001>.
- <sup>66</sup> Duong, L. H.; Chen, P. C. Simple and low-cost production of hybrid 3D-printed microfluidic devices. *Biomicrofluidics* **2019**, *13*, <https://doi.org/10.1063/1.5092529>.
- <sup>67</sup> Wolfram, C. J.; Rubloff, G. W.; Luo, X. Perspectives in flow-based microfluidic gradient generators for characterizing bacterial chemotaxis. *Biomicrofluidics* **2016**, *10*, 1. <https://doi.org/10.1063/1.4967777>.
- <sup>68</sup> Walker, G. M.; Sai, J.; Richmond, A.; Stremmler, M.; Chun, C. Y.; Wikswo, J. P. Effects of flow and diffusion on chemotaxis studies in a microfabricated gradient generator. *Lab Chip* **2005**, *5*, 611. <https://doi.org/10.1039/b417245k>.
- <sup>69</sup> Yildiz-Ozturk, E.; Yucel, M.; Muderrisoglu, C.; Sargin, S.; Yesil-Celiktas, O. Modelling coupled dynamics of diffusive–convective mass transfer in a microfluidic device and determination of hydrodynamic dispersion coefficient. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2017**, *80*, 100. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.08.033>.
- <sup>70</sup> Li, D. *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics* 2013.
- <sup>71</sup> Wang, X.; Liu, Z.; Pang, Y. Concentration gradient generation methods based on microfluidic systems. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 29966. <https://doi.org/10.1039/c7ra04494a>.
- <sup>72</sup> Lin, F.; Nguyen, C. M. C.; Wang, S. J.; Saadi, W.; Gross, S. P.; Jeon, N. L. Effective neutrophil chemotaxis is strongly influenced by mean IL-8 concentration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *319*, 576. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.029>.
- <sup>73</sup> Ruan, J.; Wang, L.; Xu, M.; Cui, D.; Zhou, X.; Liu, D. Fabrication of a microfluidic chip containing dam, weirs and gradient generator for studying cellular response to chemical modulation. *Mater. Sci. Eng. C* **2009**, *29*, 674. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.12.009>.
- <sup>74</sup> Li Jeon, N.; Baskaran, H.; Dertinger, S. K. W.; Whitesides, G. M.; De Water, L. Van; Toner, M. Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 826. <https://doi.org/10.1038/nbt712>.
- <sup>75</sup> R. H. RITCHIE Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films. *Phys. Rev.* **1956**, *106 N.5*, 8. <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRev.106.874>.
- <sup>76</sup> Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundström, I. Biosensing with surface plasmon resonance - how it all started. *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(95\)96965-2](https://doi.org/10.1016/0956-5663(95)96965-2).
- <sup>77</sup> Singh, P. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors Actuators B* **2009**, *54*, 3.
- <sup>78</sup> Rider, A. E.; Ostrikov, K.; Furman, S. A. Plasmas meet plasmonics: Everything old is new again. *Eur. Phys. J. D* **2012**, *66*, <https://doi.org/10.1140/epjd/e2012-30273-3>.
- <sup>79</sup> Barnes, W. L.; Dereux, A.; Ebbesen, T. W. Surface plasmon subwavelength optics. *Nature* **2003**, *424*, 824. <https://doi.org/10.1038/nature01937>.

- <sup>80</sup> Raether, H. *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings* 1988.
- <sup>81</sup> Li, M.; Cushing, S. K.; Wu, N. Plasmon-enhanced optical sensors: A review. *Analyst* **2015**, *140*, 386. <https://doi.org/10.1039/c4an01079e> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25365823>.
- <sup>82</sup> Novotny, L., Hecht, B. *Principles Of Nano-Optics*, Cambridge University Press, **2012**.
- <sup>83</sup> Neto, A. R.; Jorio, A. Relação de dispersão para os plásmo-polárítos de superfície em uma interface plana metal/dielétrico. **2017**, *39*, 1.
- <sup>84</sup> Liedberg, B.; Lundström, I.; Stenberg, E. Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance. *Sensors Actuators B. Chem.* **1993**, *11*, 63. [https://doi.org/10.1016/0925-4005\(93\)85239-7](https://doi.org/10.1016/0925-4005(93)85239-7).
- <sup>85</sup> Otto, A. Theory of Plasmon Excitation in Thin Films by Electrons of Non-Normal Incidence. *Phys. Status Solidi* **1967**, *22*, 401. <https://doi.org/10.1002/pssb.19670220211>.
- <sup>86</sup> Olmon, R. L.; Slovick, B.; Johnson, T. W.; Shelton, D.; Oh, S. H.; Boreman, G. D.; Raschke, M. B. Optical dielectric function of gold. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **2012**, *86*, 1. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.86.235147>.
- <sup>87</sup> Mayer, K. M.; Hafner, J. H.; Antigen, A. Å. Localized Surface Plasmon Resonance Sensors. **2011**, 3828.
- <sup>88</sup> Huang, C.; Bonroy, K.; Reekmans, G.; Laureyn, W.; Verhaegen, K.; De Vlaminck, I.; Lagae, L.; Borghs, G. Localized surface plasmon resonance biosensor integrated with microfluidic chip. *Biomed. Microdevices* **2009**, *11*, 893. <https://doi.org/10.1007/s10544-009-9306-8>.
- <sup>89</sup> Jung, L. S.; Campbell, C. T.; Chinowsky, T. M.; Mar, M. N.; Yee, S. S. Quantitative interpretation of the response of surface plasmon resonance sensors to adsorbed films. *Langmuir* **1998**, *14*, 5636. <https://doi.org/10.1021/la971228b>.
- <sup>90</sup> Kretschmann, E.; Kroger, E. Reflection and Transmission of Light By a Rough Surface, Including Results for Surface-Plasmon Effects. *J Opt Soc Am* **1975**, *65*, 150. <https://doi.org/10.1364/JOSA.65.000150>.
- <sup>91</sup> Singh, P. SPR Biosensors: Historical Perspectives and Current Challenges. *Sensors Actuators, B Chem.* **2016**, *229*, 110. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.118>.
- <sup>92</sup> Puiu, M.; Bala, C. SPR and SPR imaging: Recent trends in developing nanodevices for detection and real-time monitoring of biomolecular events. *Sensors (Switzerland)* **2016**, *16*, <https://doi.org/10.3390/s16060870>.
- <sup>93</sup> Homola, J. *Em Optical Biosensors: Today and Tomorrow (2 nd Edition)*; (Editors), F. S. L. and C. R. T., org.; 1996.
- <sup>94</sup> Bethe, H. A. Theory of Diffraction by Small Holes. *Phys. Rev.* **1944**, *66*, 163. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.66.163>
- <sup>95</sup> Ebbesen, T. W.; Lezec, H. J.; Ghaemi, H. F.; Thio, T.; Wolff, P. A. Extraordinary optical transmission through sub-wavelength hole arrays. *Nature* **1998**, *391*, 667. <https://doi.org/10.1038/35570>.
- <sup>96</sup> Martín-Moreno, L.; García-Vidal, F. J.; Lezec, H. J.; Pellerin, K. M.; Thio, T.; Pendry, J. B.; Ebbesen, T. W. Theory of extraordinary optical transmission through subwavelength hole arrays. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 1114. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.86.1114>.
- <sup>97</sup> Degiron, A.; Lezec, H. J.; Yamamoto, N.; Ebbesen, T. W. Optical transmission properties of a single subwavelength aperture in a real metal. *Opt. Commun.* **2004**, *239*, 61. <https://doi.org/10.1016/j.optcom.2004.05.058>.
- <sup>98</sup> Genet, C.; Ebbesen, T. W. Light in tiny holes. *Nanosci. Technol. A Collect. Rev. from Nat. Journals* **2009**, *445*, 205. [https://doi.org/10.1142/9789814287005\\_0021](https://doi.org/10.1142/9789814287005_0021).
- <sup>99</sup> Garcia-Vidal, F. J.; Martin-Moreno, L.; Ebbesen, T. W.; Kuipers, L. Light passing through subwavelength apertures. *Rev. Mod. Phys.* **2010**, *82*, 729. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.82.729>.

- <sup>100</sup> Monteiro, J. P.; Carneiro, L. B.; Rahman, M. M.; Brolo, A. G.; Santos, M. J. L.; Ferreira, J.; Girotto, E. M. Effect of periodicity on the performance of surface plasmon resonance sensors based on subwavelength nanohole arrays. *Sensors Actuators, B Chem.* **2013**, *178*, 366. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.12.090>.
- <sup>101</sup> Lesuffleur, A.; Im, H.; Lindquist, N. C.; Lim, K. S.; Oh, S.-H. Laser-illuminated nanohole arrays for multiplex plasmonic microarray sensing. *Opt. Express* **2008**, *16*, 219. <https://doi.org/10.1364/oe.16.000219>.
- <sup>102</sup> Yanik, A. A.; Huang, M.; Kamohara, O.; Artar, A.; Geisbert, T. W.; Connor, J. H.; Altug, H. An optofluidic nanoplasmonic biosensor for direct detection of live viruses from biological media. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 4962. <https://doi.org/10.1021/nl103025u>.
- <sup>103</sup> Monteiro, J. P.; Predabon, S. M.; Bonafé, E. G.; Martins, A. F.; Brolo, A. G.; Radovanovic, E.; Girotto, E. M. SPR platform based on image acquisition for HER2 antigen detection. *Nanotechnology* **2017**, *28*, <https://doi.org/10.1088/1361-6528/28/4/045206>.
- <sup>104</sup> Monteiro, J. P.; de Oliveira, J. H.; Radovanovic, E.; Brolo, A. G.; Girotto, E. M. Microfluidic Plasmonic Biosensor for Breast Cancer Antigen Detection. *Plasmonics* **2016**, *11*, 45. <https://doi.org/10.1007/s11468-015-0016-1>.
- <sup>105</sup> Jonsson, M. P.; Jönsson, P.; Dahlin, A. B.; Höök, F. Supported lipid bilayer formation and lipid-membrane-mediated biorecognition reactions studied with a new nanoplasmonic sensor template. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3462. <https://doi.org/10.1021/nl072006t>.
- <sup>106</sup> Menezes, J. W.; Ferreira, J.; Santos, M. J. L.; Cescato, L.; Brolo, A. G. Large-area fabrication of periodic arrays of nanoholes in metal films and their application in biosensing and plasmonic-enhanced photovoltaics. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 3918. <https://doi.org/10.1002/adfm.201001262>.
- <sup>107</sup> A. Barrantes, M. T. Rejas, M. J. Benítez, and J. S. Jiménez, "Interaction between Alzheimer's A $\beta$ 1-42 peptide and DNA detected by surface plasmon resonance..," *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 12, no. 4, pp. 345–55, **2007**. <https://doi.org/10.3233/jad-2007-12408>.
- <sup>108</sup> K. Hegnerová *et al.*, "Surface plasmon resonance biosensors for detection of Alzheimer disease biomarker," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 139, no. 1, pp. 69–73, **2009**. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.09.006>
- <sup>109</sup> H. J. Kim, Y.-S. Sohn, C. Kim, and D. Jang, "Surface plasmon resonance sensing of a biomarker of Alzheimer disease in an intensity measurement mode with a bimetallic chip," *J. Korean Phys. Soc.*, vol. 69, no. 5, pp. 793–797, **2016**. <https://doi.org/10.3938/jkps.69.793>
- <sup>110</sup> N. Bohli, O. Meilhac, P. Rondeau, S. Gueffrache, L. Mora, and A. Abdelghani, "A facile route to glycosylated albumin detection," *Talanta*, vol. 184, pp. 507–512, **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.027>
- <sup>111</sup> Y. K. Lee, K. S. Lee, W. M. Kim, and Y. S. Sohn, "Detection of amyloid- $\beta$ 42 using a waveguide-coupled bimetallic surface plasmon resonance sensor chip in the intensity measurement mode," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, pp. 1–7, **2014**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098992>
- <sup>112</sup> J. Ryu, H.-A. Joung, M.-G. Kim, and C. B. Park, "Surface Plasmon Resonance Analysis of Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid Aggregation on a Solid Surface: From Monomers to Fully-Grown Fibrils," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 7, pp. 2400–2407, **2008**. <https://doi.org/10.1021/ac7019514>
- <sup>113</sup> a. J. Haes, W. P. Hall, L. Chang, W. L. Klein, and R. P. Van Duyne, "A Localized Surface Plasmon Resonance Biosensor: First Steps toward an Assay for Alzheimer's Disease," *Nano Lett.*, vol. 4, no. 6, pp. 1029–1034, **2004**. <https://doi.org/10.1021/nl049670j>
- <sup>114</sup> A. J. Haes, L. Chang, W. L. Klein, and R. P. Van Duyne, "Detection of a biomarker for Alzheimer's disease from synthetic and clinical samples using a nanoscale optical biosensor," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 7, pp. 2264–2271, **2005**. <https://doi.org/10.1021/ja044087q>
- <sup>115</sup> M. Vestergaard, K. Kerman, D. K. Kim, H. M. Hiep, and E. Tamiya, "Detection of Alzheimer's tau protein using localised surface plasmon resonance-based immuno-chip," *Talanta*, vol. 74, no. 4, pp.

1038–1042, **2008**. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.06.009>

<sup>116</sup> A. Neely *et al.*, “Ultrasensitive and highly selective detection of alzheimer’s disease biomarker using two-photon rayleigh scattering properties of gold nanoparticle,” *ACS Nano*, vol. 3, no. 9, pp. 2834–2840, **2009**. <https://doi.org/10.1021/nn900813b>

<sup>117</sup> P. D. Mehta, T. Pirttilä, S. P. Mehta, E. A. Sersen, P. S. Aisen, H. M. Wisniewski, “Plasma and Cerebrospinal Fluid Levels of Amyloid  $\beta$  Proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer Disease,” *Archives of Neurology*, vol. 57, **2000**. doi:10.1001/archneur.57.1.100

<sup>118</sup> R. Mehta (2012). *Interactions, Imaging and Spectra in SEM, Scanning Electron Microscopy*, Dr. ViacheslavKazmiruk (Ed.), ISBN: 978-953-51-0092-8, InTech.

<sup>119</sup> W. R. Vidal, Alaíde Mader Braga; Catpani, “Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy : advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis,” *Sao Paulo Med. J.*, vol. 123, no. 6, pp. 282–285, **2005**. <https://doi.org/10.1590/S1516-31802005000600006>

<sup>120</sup> H. Kim, J. U. Lee, S. Song, S. Kim, and S. J. Sim, “A shape-code nanoplasmonic biosensor for multiplex detection of Alzheimer’s disease biomarkers,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 101, no. September 2017, pp. 96–102, **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.10.018>

<sup>121</sup> Kim, C.; Lee, K.; Kim, J. H.; Shin, K. S.; Lee, K. J.; Kim, T. S.; Kang, J. Y. A serial dilution microfluidic device using a ladder network generating logarithmic or linear concentrations. *Lab Chip* **2008**, 8, 473. <https://doi.org/10.1039/b714536e>.

<sup>122</sup> Shen, Q.; Zhou, Q.; Lu, Z.; Zhang, N. Generation of Linear and Parabolic Concentration Gradients by Using a Christmas Tree-Shaped Microfluidic Network. *Wuhan Univ. J. Nat. Sci.* **2018**, 23, 244. <https://doi.org/10.1007/s11859-018-1317-y>.

<sup>123</sup> Xu, Z.; Huang, X.; Wang, P.; Wang, H.; Weitz, D. A. Optimization and development of a universal flow-based microfluidic gradient generator. *Microfluid. Nanofluidics* **2016**, 20, 1. <https://doi.org/10.1007/s10404-016-1749-7>.

<sup>124</sup> Haji-Hashemi, H.; Norouzi, P.; Safarnejad, M. R.; Ganjali, M. R. Label-free electrochemical immunosensor for direct detection of Citrus tristeza virus using modified gold electrode. *Sensors Actuators, B Chem.* **2017**, 244, 211. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.12.135>.

<sup>125</sup> Johnsson, B.; Löfås, S.; Lindquist, G. Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal. Biochem.* **1991**, 198, 268. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90424-R](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90424-R)

<sup>126</sup> Rakhshani, M.R.; Mansouri-Birjandi, M. A. Engineering Hexagonal Array of Nanoholes for High Sensitivity Biosensor and Application for Human Blood Group Detection. *IEEE Transactions on Nanotechnology.* **2018**, 17, 475. <http://dx.doi.org/10.1109/TNANO.2018.2811800>.

<sup>127</sup> Ekşioğlu, Y.; Cetin, A.E.; Petráček, J. Optical Response of Plasmonic Nanohole Arrays: Comparison of Square and Hexagonal Lattices. *Plasmonics.* **2016**, 11, 851. <https://doi.org/10.1007/s11468-015-0118-9>

**“Alzheimer’s is the cleverest thief,  
because she not only steals from you,  
but she steals the very thing you need  
to remember what’s been stolen.”**

- Jarod Kintz

[alzheimer.net](http://alzheimer.net)