



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

(21) PI 0718473-5 A2



(22) Data de Depósito: 18/10/2007
(43) Data da Publicação: 03/12/2013
(RPI 2239)

(51) Int.Cl.:
G01N 33/558

(54) Título: BIOENSAIO DE FLUXO DIRETO E FLUXO LATERAL BASEADO EM MEIO POROSO MODELADO, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DO MESMO, E MÉTODOS DE USO DO MESMO. (57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 18/10/2006 US 60/852,751,
26/04/2007 US 60/914,252

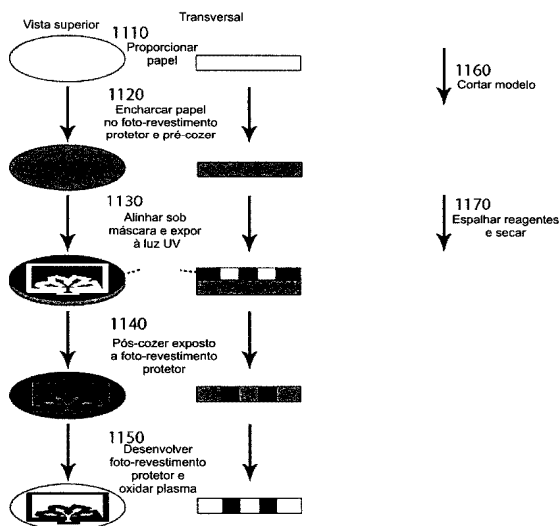
(73) Titular(es): The President And Fellows Of Harvard College

(72) Inventor(es): Amy Wong, Andres W. Martinez, EMANUEL CARRILHO, George M. Whitesides, Hayat Sindi, Katherine A. Mirica, Manish J. Butte, Samuel Thomas, Sarah Jane Vella, Scott T. Phillips, Yanyan Liu

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007081848 de
18/10/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/049083de
24/04/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **BIOENSAIO DE FLUXO DIRETO E FLUXO LATERAL BASEADO EM MEIO POROSO MODELADO, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DO MESMO, E MÉTODOS DE USO DO MESMO".**

5 Declaração de Apoio Governamental

Esta pesquisa foi suportada pelos Institutos Nacionais de Saúde (NIH) (GM065364). Os Centros de Ciência de Pesquisa de Materiais e de Engenharia (MRSEC) tendo em comum facilidades suportadas pela Fundação de Ciência Nacional (NSF) foram usados sob lauda no. DMR-0213805.

- 10 Este trabalho foi também suportado por uma participação pré-doutoral de NSF (A.W.M), uma Participação da Fundação de Pesquisa de Câncer Damon Runyon (DRG-1805-04) (S.T.P), uma participação pós-doutoral da Sociedade Americana de Câncer (S.W.T.), uma participação pós-doutoral do Conselho Nacional de Ciência e Pesquisa de Engenharia (NSERC) (S.J.V.),
- 15 A Lauda de Investigação de Tecnologia do Centro de Transferência de Tecnologia de Massachusetts (M.J.B.), Agência de Fundo de Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (E.C.).

Pedidos Relacionados

- 20 Este pedido reivindica o benefício sob 35 U.S.C. §119(e) do Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos No. 60/914.252, depositado em 26 de abril de 2007, e intitulado "Papel Modelado como uma Plataforma para Bioensaios Portáteis de Baixos Volumes Poucos Onerosos e Métodos de Produção dos Mesmos," os conteúdos totais do qual sendo aqui incorporados por referência, e também reivindica o benefício sob 35 U.S.C. §119(e)
- 25 do Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos No. 60/852.751, depositado em 18 de outubro de 2006, e intitulado "Papel Modelado como uma Plataforma para Bioensaios Portáteis de Baixos Volumes Poucos Onerosos e Métodos de Produção dos Mesmos," os conteúdos totais do qual sendo aqui incorporados por referência.

30 Antecedentes da Invenção

Campo da Invenção

A presente invenção geralmente refere-se a dispositivo de bio-

ensaios baseados em meio poroso, métodos de produção dos mesmos, e métodos de uso dos mesmos.

Discussão da Técnica Relacionada

A análise de fluidos biológicos é útil para monitoramento da saúde de indivíduos e populações. Contudo, estas medições podem ser difíceis de implementar em regiões remotas, tais como aquelas encontradas nos países em desenvolvimento, em situações de emergência, ou em ambientes de cuidado de saúde doméstica. Instrumentos de laboratório convencionais proporcionam medições quantitativas de amostras biológicas, mas eles são tipicamente inadequados para localizações remotas, visto que eles são grandes, caros, e tipicamente requerem pessoal treinado e volumes consideráveis de amostras biológicas.

Outros tipos de plataformas de bioensaio proporcionam alternativas a instrumentos convencionais, mas eles também têm limitações em certas situações. Por exemplo, dispositivos microfluídicos podem ser úteis na classificação biológica e química. Dispositivos microfluídicos baseados ambos em vidro e polímero contendo cavidades e/ou canais foram desenvolvidos. Contudo, dispositivos microfluídicos convencionais quando designados para serem tipicamente simples, requerem bombas e detectores externos para uso.

Enquanto “sondas” são conceitualmente diretas, elas são geralmente muito onerosas para ambientes de baixo custo, e geralmente requerem um volume relativamente grande de amostra de modo a serem capazes de produzir uma medição precisa, por exemplo, cerca de 5 mL de amostra. Tais grandes volumes de amostras não são obtidas facilmente em muitas situações, particularmente de crianças prematuras e crianças jovens.

Sumário da Invenção

Sob um aspecto, um bioensaio inclui um meio hidrofílico poroso capaz de transportar fluidos por ação capilar; e uma barreira impenetrável por fluido embutida no meio hidrofílico poroso, referida barreira definindo um canal terminando em uma ou mais regiões de detecção no meio poroso. Em uma ou mais concretizações, o meio hidrofílico poroso é tratado para pro-

porcionar uma indicação visível de um analito presente em um fluido.

Sob um aspecto, um dispositivo de ensaio inclui um meio hidrofílico poroso; uma barreira impenetrável por fluido compreendendo fotorrevestimento protetor polimerizado, a barreira permeando substancialmente a espessura do meio hidrofílico poroso e definindo um limite de uma região de ensaio no interior do meio hidrofílico poroso; e um reagentes de ensaio na região de ensaio.

Uma ou mais concretizações incluem uma ou mais das seguintes características. A barreira define adicionalmente um limite de uma região de canal no interior do meio hidrofílico poroso, a região de canal fluidicamente ligada à região de ensaio. A barreira define adicionalmente um limite de uma região de deposição de amostra no interior do meio hidrofílico poroso, o canal proporcionando uma trajetória de fluido no interior do meio hidrofílico poroso entre a região de deposição de amostra e a região de ensaio. A barreira define adicionalmente limites de uma pluralidade de regiões de ensaio. A barreira define adicionalmente limites de uma pluralidade de regiões de canal no interior do meio hidrofílico poroso, e define adicionalmente um limite de uma região de deposição de amostra, cada canal proporcionando uma trajetória de fluido no interior do meio hidrofílico poroso entre a região de deposição de amostra e uma região de ensaio correspondente da pluralidade de regiões de ensaio. Reagentes de ensaio em pelo menos alguma das regiões de ensaio. A barreira separa fisicamente as regiões de ensaio da pluralidade de regiões de ensaio uma da outra. O reagente de ensaio é covalentemente ligado ao meio hidrofílico poroso na região de ensaio. O reagente de ensaio é não-covalentemente ligado ao meio hidrofílico poroso na região de ensaio. O reagente de ensaio é selecionado para proporcionar uma indicação visível da presença de analito. O reagente de ensaio é selecionado para reagir à presença de pelo menos um de glicose, proteína, gordura, fator de crescimento endotelial vascular, fator 1 de crescimento similar à insulina, anticorpos, e citoquinas. O fotorrevestimento protetor compreende fotorrevestimento protetor negativo. O meio hidrofílico poroso compreende um de acetato de nitrocelulose, acetato de celulose, papel celulósico, filtro

de papel, papel de tecido, papel de escrita, toalha de papel, tecido, e película de polímero porosa. O meio hidrofílico poroso é flexível. A barreira tem pelo menos uma dimensão entre cerca de 5 cm e cerca de 100 μm . A barreira tem pelo menos uma dimensão entre cerca de 300 μm e cerca de 100 μm . A barreira tem pelo menos uma dimensão menor do que cerca de 300 μm . O canal tem pelo menos uma dimensão lateral que está entre cerca de 750 μm e cerca de 100 μm . O canal tem pelo menos uma dimensão lateral que está entre cerca de 250 μm e cerca de 100 μm . O canal tem pelo menos uma dimensão lateral que é menor do que cerca de 250 μm . Um dispositivo de imagem capaz de obter uma imagem digital da região de ensaio. Um processador em comunicação com o dispositivo de imagem e capaz de obter informação sobre um analito na região de ensaio baseada na imagem digital da região de ensaio. O processador é capaz de obter a informação sobre o analito baseada em uma intensidade na imagem digital da região de ensaio. Uma camada sobre o meio hidrofílico poroso, a camada incluindo pelo menos uma abertura. A abertura proporciona pelo menos parte de uma trajetória de fluido para a região de ensaio.

Sob outro aspecto, um dispositivo de ensaio inclui um meio hidrofílico poroso; uma barreira impenetrável por fluido substancialmente permeando a espessura do meio hidrofílico poroso, e tendo uma largura entre cerca de 1 mm e cerca de 100 μm , a barreira definindo completamente um limite de uma região de ensaio no interior do meio hidrofílico poroso; e um reagente de ensaio na região de ensaio.

Uma ou mais concretizações incluem uma ou mais das seguintes características. O reagente de ensaio é selecionado para proporcionar uma indicação visível da presença de analito. O reagente de ensaio é selecionado para reagir à presença de pelo menos um de glicose, proteína, gordura, fator de crescimento endotelial vascular, fator 1 de crescimento similar à insulina, anticorpos, e citoquinas. A barreira compreende um de fotorrevestimento protetor e polímero curável. O meio hidrofílico poroso compreende um de acetato de nitrocelulose, acetato de celulose, papel celulósico, filtro de papel, papel de tecido, papel de escrita, toalha de papel, tecido, e película

de polímero porosa. A barreira tem pelo menos uma dimensão lateral entre cerca de 300 μm e cerca de 100 μm . A barreira tem pelo menos uma dimensão lateral menor do que cerca de 300 μm . Uma pluralidade de barreiras impenetráveis por fluido permeando substancialmente a espessura do meio hidrofílico poroso, cada barreira tendo uma largura entre cerca de 1 mm e cerca de 100 μm , cada barreira definindo completamente um limite de uma região de ensaio correspondente no interior do meio hidrofílico poroso; e um reagente de ensaio em cada região de ensaio.

Sob outro aspecto, um dispositivo de ensaio inclui um meio hidrofílico poroso; uma barreira impenetrável por fluido permeando substancialmente a espessura do meio hidrofílico poroso e tendo um comprimento e uma largura que varia por menos do que cerca de 10% ao longo do comprimento da barreira, a barreira definindo um limite de uma região de ensaio no interior do meio hidrofílico poroso, e um reagente de ensaio na região de ensaio.

Uma ou mais concretizações incluem uma ou mais das seguintes características. A barreira define adicionalmente um limite de uma região de canal no interior do meio hidrofílico poroso, a região de canal ligada fluidicamente à região de ensaio. A barreira define adicionalmente um limite de uma região de deposição de amostra no interior do meio hidrofílico poroso, o canal proporcionando uma trajetória de fluido no interior do meio hidrofílico poroso entre a região de deposição de amostra e a região de ensaio. O reagente de ensaio é selecionado para proporcionar uma indicação visível da presença de analito. O reagente de ensaio é selecionado para reagir à presença de um de glicose, proteína, gordura, fator de crescimento endotelial vascular, fator 1 de crescimento similar à insulina, anticorpos, e citoquinas. A barreira compreende um de fotorrevestimento protetor e polímero curável. O meio hidrofílico poroso compreende um de acetato de nitrocelulose, acetato de celulose, papel celulósico, filtro de papel, papel de tecido, papel de escrita, toalha de papel, tecido, e película de polímero porosa. A largura da barreira é menor do que cerca de 300 μm . A largura da barreira varia por menos do que cerca de 5% ao longo do comprimento da barreira. A região de canal

tem uma largura entre cerca de 750 μm e cerca de 100 μm . A região de canal tem um comprimento e uma largura que varia por menos do que cerca de 10% ao longo do comprimento do canal. A região de canal tem um comprimento e uma largura que varia por menos do que cerca de 5% ao longo do comprimento do canal.

Sob outro aspecto, um método de produção de um dispositivo inclui saturação de um meio hidrofílico poroso com fotorrevestimento protetor; exposição do meio saturado a um modelo predeterminado de luz; remoção do fotorrevestimento protetor de uma região do meio baseada no modelo predeterminado de luz para definir uma barreira de fotorrevestimento protetor residual que forma um limite da região, no qual o modelo predeterminado de luz é selecionado de modo que a barreira define uma região de ensaio na região; e provisão de um reagente de ensaio na região de ensaio.

Uma ou mais concretizações incluem uma ou mais das seguintes características. A barreira é substancialmente impenetrável por fluido. Seleção do modelo predeterminado de luz de modo que a barreira envolve completamente a região. Seleção do modelo predeterminado de luz de modo que a barreira limita uma primeira porção da região, e no qual uma borda do meio hidrofílico poroso limita uma segunda porção da região. A provisão do reagente compreende ligar covalentemente o reagente à região de ensaio. A provisão do reagente compreende ligar não-covalentemente o reagente à região de ensaio. A seleção no qual o modelo predeterminado de luz de modo que a região de ensaio tem uma forma baseada nas características de transporte do reagente na presença de um líquido. O reagente de ensaio é selecionado para proporcionar uma indicação visível da presença de analito. O reagente de ensaio é selecionado para reagir à presença de um de glicose, proteína, gordura, fator de crescimento endotelial vascular, fator 1 de crescimento similar à insulina, anticorpos, e citocinas. A seleção do modelo predeterminado de luz de modo que a barreira define uma região de canal na região. A região de canal tem pelo menos uma dimensão lateral que está entre cerca de 750 μm e cerca de 100 μm . A seleção do modelo predeterminado de luz é selecionada de modo que a barreira define uma região de de-

posição de amostra na região. A saturação do meio hidrofílico poroso com fotorrevestimento protetor compreende aplicação de uma solução do fotorrevestimento protetor em um solvente ao meio e substancialmente evaporando o solvente. A exposição do meio saturado a um modelo predeterminado de luz compreende irradiar a região com a luz e substancialmente não irradiar a barreira com a luz. A exposição do meio saturado a um modelo predeterminado de luz compreende irradiar a barreira com a luz e substancialmente não irradiar a região com a luz. A remoção do fotorrevestimento protetor compreende a remoção do fotorrevestimento protetor de uma pluralidade de regiões do meio baseada no modelo predeterminado de luz para definir uma pluralidade de barreiras de fotorrevestimento protetor residual que forma limites de regiões correspondentes. A saturação de um segundo meio hidrofílico poroso com fotorrevestimento protetor; exposição do segundo meio saturado a um modelo predeterminado de luz; remoção do fotorrevestimento protetor de uma região do segundo meio baseado no modelo predeterminado de luz para definir uma barreira de fotorrevestimento protetor residual que forma um limite da região; alinhamento substancial da barreira do segundo meio com a barreira do primeiro meio mencionado; e ligação do primeiro meio ao segundo meio. A aplicação de um reagente na região do primeiro meio, o reagente selecionado para reagir a um analito alvo. Provisão de um de um anticorpo etiquetado e uma proteína etiquetada na região do segundo meio, o um do anticorpo etiquetado e a proteína etiquetada selecionados para proporcionar uma indicação de cor de uma reação entre o reagente e o analito alvo. Provisão de uma camada sobre o meio hidrofílico poroso, a camada incluindo pelo menos uma abertura que é alinhada baseada em uma porção da barreira. Seleção do modelo predeterminado de luz de modo que a barreira tem pelo menos uma dimensão que está entre cerca de 5 cm e cerca de 100 μm . Seleção do modelo predeterminado de luz de modo que a barreira tem pelo menos uma dimensão que é menor do que cerca de 250 μm . O meio hidrofílico poroso compreende um de acetato de nitrocelulose, acetato de celulose, papel celulósico, filtro de papel, papel de tecido, papel de escrita, toalha de papel, tecido, e película de polímero porosa. Remoção

do fotorrevestimento protetor de uma pluralidade de regiões do meio baseadas no modelo predeterminado de luz para definir uma pluralidade de barreiras de fotorrevestimento protetor residual que forma limites de uma pluralidade correspondente de regiões, no qual o modelo predeterminado de luz é
5 selecionado de modo que a pluralidade de barreiras define uma pluralidade correspondente de regiões de ensaio nas regiões; e provisão de um reagente de ensaio em pelo menos algumas das regiões de ensaio.

Sob outro aspecto, um método de produção de um dispositivo inclui revestimento de uma matriz de modelo predeterminado com um polí-
10 mero curável; pressionamento da matriz revestida em um meio hidrofílico poroso, o meio tendo uma espessura e o polímero curável substancialmente permeando o meio através de sua espessura de acordo com o modelo predeterminado; cura do polímero curável de modo a formar uma barreira impenetrável por fluido embutida no meio, a barreira impenetrável por fluido definindo uma região de ensaio no meio; e provisão de um reagente na região
15 de ensaio.

Uma ou mais concretizações incluem uma ou mais das seguintes características. O polímero curável compreende poli (dimetil-siloxano) (PDMS). Seleção do modelo predeterminado de modo que a barreira envol-
20 ve completamente a região.

Sob outro aspecto, um método de realização de um ensaio para determinar a presença de um analito em uma amostra líquida inclui deposição da amostra líquida em um dispositivo de ensaio, o dispositivo de ensaio compreendendo um meio hidrofílico poroso, uma barreira impenetrável por
25 fluido compreendendo fotorrevestimento protetor polimerizado, a barreira substancialmente permeando a espessura do meio hidrofílico poroso e definindo um limite de uma região de ensaio no interior do meio hidrofílico poroso, e um reagente de ensaio na região de ensaio, o reagente de ensaio selecionado para proporcionar uma resposta visível à presença do analito; obtenção de uma imagem da região de ensaio; e determinação da presença do
30 analito no líquido baseado na imagem da região de ensaio.

Uma ou mais concretizações incluem uma ou mais das seguin-

tes características. Determinação da presença do analito no líquido compreende obtenção de uma intensidade média de pelo menos uma porção da imagem da região de ensaio, e determinação da presença do analito no líquido baseado na intensidade média. Obtenção da imagem da região de ensaio compreende imagem da região de ensaio com um de um fone de câmara, uma câmara digital, e um escaneador. Determinação da presença do analito baseada na imagem da região de ensaio compreende transmissão da imagem a um laboratório remoto, e obtenção da informação a partir do laboratório remoto com relação à presença do analito no líquido. Obtenção da imagem da região de ensaio compreende imagem da região de ensaio com um fone de câmara, e no qual a determinação da presença do analito baseada na imagem da região de ensaio compreende transmissão da imagem a um laboratório remoto, via o fone de câmara.

Breve Descrição dos Desenhos

15 Nos Desenhos:

figuras 1A-1E são imagens de biodispositivos de ensaio de fluxo lateral, de acordo com algumas concretizações.

figura 2 mostra imagens de biodispositivos de ensaio de fluxo lateral expostas a soluções contendo concentrações variadas de analitos, de acordo com algumas concretizações.

figuras 3A-3C representam biodispositivos de ensaio de fluxo lateral contaminados com sujeira, pólen de planta, e pó de grafite, tomados antes e após exposição a soluções contendo analitos, de acordo com algumas concretizações.

figura 4 ilustra esquematicamente uma vista plana de um dispositivo de bioensaio de fluxo lateral para uso na medição da presença de glicose e proteína em líquidos biológicos, de acordo com algumas concretizações.

figura 5 ilustra etapas para uso de um dispositivo de bioensaio de fluxo lateral para determinar quantitativamente a presença de analitos, por exemplo, glicose e proteína em um líquido biológico, de acordo com algumas concretizações.

figura 6 ilustra os resultados de uma determinação quantitativa da presença de glicose e proteína em líquidos biológicos tendo concentrações variadas de glicose e proteína usando-se um dispositivo de bioensaio de fluxo lateral, de acordo com algumas concretizações.

5 figura 7 ilustra a estabilidade de longo prazo do dispositivo de fluxo na determinação quantitativa da presença de glicose e proteína em um líquido biológico, com e sem trehalose, de acordo com algumas concretizações.

10 figuras 8A e 8B são vistas em perspectivas de biodispositivos de ensaios de fluxo direto, de acordo com algumas concretizações.

 figuras 9A e 9B são vistas frontal e posterior, respectivamente, de um dispositivo de bioensaio de fluxo direto exemplar, de acordo com algumas concretizações.

15 figura 10 ilustra um método exemplar para montagem de um dispositivo de bioensaio de fluxo direto, de acordo com algumas concretizações.

 figura 11 ilustra um procedimento exemplar para provisão de barreiras hidrofóbicas em meio hidrofílico poroso usando fotolitografia no ambiente limpo, de acordo com algumas concretizações.

20 figura 12 ilustra um procedimento exemplar para provisão de barreiras hidrofóbicas no meio hidrofílico poroso usando fotolitografia no laboratório, de acordo com algumas concretizações.

 figura 13 ilustra um procedimento exemplar para provisão de barreiras hidrofóbicas no meio hidrofílico poroso usando impressão de microcontato, de acordo com algumas concretizações.

25 figuras 14A-14B são imagens de barreiras hidrofóbicas obtidas usando-se vários métodos de modelagem, de acordo com algumas concretizações.

30 figuras 15A-15C são imagens de grades de aproximadamente 3.6×3.6 mm quadrados ligadas por barreiras hidrofóbicas modeladas no papel formado usando-se vários métodos de modelagem, de acordo com algumas concretizações.

figuras 16A-16B são imagens de barreiras de larguras relativamente estreitas que proporcionam dispositivos funcionais, e são formados usando-se vários métodos de modelagem, de acordo com algumas concretizações.

5 figura 17A é uma imagem de uma lente exemplar para uso com fone de câmeras, de acordo com algumas concretizações.

figuras 17B-17C são imagens de um dispositivo de bioensaio tomadas, respectivamente, com e sem a lente da figura 17A, de acordo com algumas concretizações.

10 figura 18A ilustra uma vista em perspectiva de um dispositivo de bioensaio tridimensional, de acordo com algumas concretizações.

figura 18B mostram imagens de um dispositivo de bioensaio tridimensional exemplar em tempos diferentes durante exposição a líquidos coloridos, de acordo com algumas concretizações.

15 figura 19 ilustra uma vista m perspectiva de um dispositivo de bioensaio tridimensional, de acordo com algumas concretizações.

figura 20 ilustra vistas plana e em perspectiva de camadas em um dispositivo de bioensaio lateral, de acordo com algumas concretizações.

20 figuras 21A-21F são imagens do dispositivo de bioensaio lateral da figura 20 em tempos diferentes durante exposição a um líquido colorido, de acordo com algumas concretizações.

Descrição Detalhada

Visão Geral

25 As concretizações da invenção proporcionam biodispositivos de ensaio de fluxo direto e de fluxo lateral baseados no meio poroso modelado, métodos de produção dos mesmos, e métodos de uso dos mesmos.

30 Sob alguns aspectos, meios hidrofílicos porosos são modelados com barreiras hidrofóbicas para proporcionar uma classe de plataformas de baixo custo, portáteis, e tecnicamente simples, para operarem bioensaios multiplexados nos líquidos biológicos. Um exemplo de um meio hidrofílico útil para bioensaios é papel, que é pouco oneroso, prontamente comercialmente disponível, disponível, se dissolve rapidamente em líquidos, e não necessita

de manuseio cuidadoso como algumas plataformas convencionais. O papel ou outro meio hidrofílico poroso é modelado com barreiras hidrofóbicas que proporcionam controle espacial de fluidos biológicos, e capacitam o transporte de fluido devido à ação capilar dentro de regiões que as barreiras definem. As barreiras hidrofóbicas podem ser poliméricas, por exemplo, um polímero curável ou um fotorrevestimento protetor, e proporcionam uma barreira substancialmente impermeável através de toda a espessura do meio hidrofílico poroso dentro de áreas definidas. Diferente dos dispositivos microfluídicos convencionais que incluem canais ou cavidades fluídicas vazias no polímero ou vidro, as regiões ligadas por estas barreiras não são vazias, mas, ao invés, são produzidas de, e contêm o meio hidrofílico poroso.

Em contraste adicional a dispositivos convencionais, algumas concretizações dos dispositivos de bioensaio são produzidas usando-se fotolitografia por saturação do meio hidrofílico poroso com fotorrevestimento protetor, exposição do meio saturado a um modelo predeterminado de luz, e remoção do fotorrevestimento protetor baseada no modelo, formação de barreiras hidrofóbicas produzidas de fotorrevestimento protetor. O modelo da luz pode ser selecionado para definir regiões de ensaio, regiões de canal, regiões de deposição de amostra, e similares, os limites dos quais são pelo menos parcialmente pelas barreiras hidrofóbicas. Embora o fotorrevestimento protetor seja convencionalmente usado com semicondutores, os inventores descobriram que, surpreendentemente, a saturação de um meio hidrofílico poroso com fotorrevestimento protetor e realização de fotolitografia naquele fotorrevestimento protetor permite a fabricação de características de alta qualidade que não são disponíveis usando-se técnicas de produção de ensaio convencionais. Técnicas de produção de ensaio convencionais típicas envolvem aplicação de um líquido a um meio poroso de acordo com um modelo, e, em seguida, endurecimento do líquido para formar características. Contudo, quando o líquido é aplicado, ele se espalha lateralmente dentro do meio, causando, desse modo, uma perda de definição nas características. A fotolitografia não ocorre na aplicação do líquido de acordo com um modelo, proporcionando, desse modo, uma resolução característica signifi-

cantemente mais alta do que convencionalmente disponível. Por exemplo, características significativamente menores podem ser produzidas usando-se esta técnica fotolitográfica que pode produzir usando-se técnicas de classificação-impressão, por exemplo, barreiras tendo uma espessura entre cerca de 1 mm e cerca de 100 μm , por exemplo, entre cerca de 300 μm e 100 μm , ou ainda menor. Adicionalmente, a técnica pode formar características que não variam significativamente ao longo de seu comprimento, por exemplo, barreiras tendo larguras que variam por menos do que cerca de 10%, por menos do que cerca de 5%, ou ainda menos, ao longo de seu comprimento.

5 Inversamente, os canais definidos por tais barreiras também terão larguras que não variam significativamente ao longo de seu comprimento, por exemplo, por menos do que cerca de 10%, por menos do que cerca de 5%, ou ainda menos, ao longo de seu comprimento. Outras concretizações dos dispositivos de bioensaio são baseadas em outros métodos de produção, tal

10 como litografia macia, que proporciona benefícios úteis e aperfeiçoam resoluções adicionais não disponíveis usando-se técnicas convencionais para a produção de dispositivos de ensaio, conforme descrito em maiores detalhes abaixo.

15

As regiões ligadas do meio hidrofílico podem ser usadas para

20 definir uma ou mais regiões de ensaio em um dispositivo de bioensaio. As regiões de ensaio do dispositivo de bioensaio podem ser tratadas com reagentes que respondem à presença de analitos em um fluido biológico, e que podem servir como um indicador de presença de analito. Devido a muitas concretizações dos ensaios serem pretendidas para serem facilmente utili-

25 záveis sem o uso de equipamento complicado e oneroso, em algumas concretizações a resposta do dispositivo ao analito é visível a olho nu. Por exemplo, o meio hidrofílico pode ser tratado na região de ensaio para proporcionar um indicador de cor da presença do analito. Indicadores podem incluir moléculas que tornam-se coloridas na presença do analito, mudam de cor na

30 presença do analito, ou emitem fluorescência, fosforescência, ou luminescência na presença do analito. Em outras concretizações, medições radiológicas, magnéticas, óticas, e/ou elétricas podem ser usadas para determinar

a presença de proteínas, anticorpos, ou outros analitos.

Em algumas concretizações, para detectar uma proteína específica, uma região de ensaio do meio hidrofílico pode ser derivatizada com reagentes, tais como moléculas pequenas, que se ligam seletivamente a ou interagem com a proteína. Ou, por exemplo, para detectar um anticorpo específico, uma região de ensaio do meio hidrofílico pode ser derivatizada com reagentes, tais como antígenos, que se ligam seletivamente a ou interagem com aquele anticorpo. Por exemplo, reagentes, tais como moléculas pequenas e/ou proteínas, podem ser covalentemente ligados ao meio hidrofílico usando-se química similar àquela usada para imobilizar moléculas em gotas ou lâminas de vidro, ou usando-se química usada para ligação de moléculas a carboidratos. Em concretizações alternativas, os reagentes podem ser aplicados e/ou imobilizados pela aplicação dos mesmos na solução, e permitindo que o solvente evapore. Os reagentes podem ser imobilizados por absorção física no meio poroso por outras interações não-covalentes. Em geral, uma ampla variedade de reagentes pode ser usada com os dispositivos de bioensaio para detectar analitos, e podem ser aplicados por uma variedade de métodos adequados. Estes reagentes podem incluir anticorpos, ácidos nucleicos, aptâmeros, polímeros molecularmente impressos, receptores químicos, proteínas, peptídeos, compostos inorgânicos, e moléculas orgânicas pequenas. Estes reagentes podem ser adsorvidos em papel (não-covalentemente através de interações não-específicas), ou covalentemente (como ou ésteres, amidas, iminas, éteres, ou através de ligações carbono-carbono, carbono-nitrogênio, carbono-oxigênio, ou oxigênio-nitrogênio).

Contudo, a interação de alguns analitos com alguns reagentes pode não resultar em uma mudança de cor visível, a menos que o analito fosse anteriormente etiquetado. O dispositivo pode ser adicionalmente tratado para adicionar uma mancha ou uma proteína etiquetada, anticorpo, ácido nucleico, ou outro reagente que se liga ao analito alvo após ele se ligar ao reagente na região de ensaio, e produzir uma mudança de cor visível. Isto pode ser feito, por exemplo, pela provisão do dispositivo com uma área separada que já contém a mancha, ou reagente etiquetado, e inclui um meca-

nismo pelo qual a mancha ou reagente etiquetado podem ser facilmente introduzidas no analito alvo após ele se ligar ao reagente na região de ensaio. Ou, por exemplo, o dispositivo pode ser provido com um canal separado que pode ser usado para escoar a mancha ou reagente etiquetado de uma região diferente do papel no analito alvo após ele se ligar ao reagente na região de ensaio. Em uma concretização, este fluxo é iniciado com uma gota de água, ou algum outro fluido. Em outra concretização, o reagente e reagente etiquetado são aplicados à mesma localização no dispositivo, por exemplo, na região de ensaio.

Os dispositivos de bioensaio podem ser, em uma configuração, de fluxo lateral, uma configuração de fluxo direto, uma combinação dos dois, ou em uma configuração tridimensional. Em um dispositivo de bioensaio de fluxo lateral, o líquido escoar lateralmente através do dispositivo por ação capilar, por exemplo, de uma região de deposição de amostra do meio onde a amostra pode ser introduzida no dispositivo, a uma região de ensaio do meio, onde a presença de analitos pode ser detectada, via um canal definido pela barreira hidrofóbica. Devido à barreira hidrofóbica definir a trajetória de fluxo do líquido, a seleção apropriada do modelo de barreira poder produzir um ensaio multiplexado, em que o líquido escoar da região de deposição de amostra do meio para regiões de ensaio múltiplas, via canais múltiplos definidos pela barreira. A barreira pode adicionalmente ser modelada tal que os canais são suficientemente estreitos para permitir um volume de líquido relativamente pequeno (por exemplo, menos do que 10 μL) para escoar para todas das regiões desejadas do dispositivo. Note-se, contudo, que o tamanho característico mínimo da barreira é dependente, a alguma extensão, das técnicas de fabricação selecionadas, conforme descrito em maiores detalhes abaixo.

Um dispositivo de fluxo direto de bioensaio tipicamente inclui camadas múltiplas, pelo menos uma da qual é um meio hidrofílico poroso que é modelado com barreiras hidrofóbicas. Em uso, o líquido escoar verticalmente de uma camada para outra, e as barreiras hidrofóbicas restringem o fluxo lateral de líquido. Uma ou mais áreas do meio hidrofílico poroso pode

ser tratada para proporcionar um ensaio para um analito alvo, por exemplo, para proporcionar um indicador visível (ou outro indicador detectável) da presença do analito. Em algumas concretizações, uma camada do dispositivo é tratada com uma mancha ou reagente etiquetado que proporciona um
5 indicador de cor da presença do analito, por exemplo, após o analito interagir com um reagente em outra camada. Nota-se que algumas concretizações podem incluir ambos fluxo lateral e direto do líquido.

Sob muitos aspectos, um gota única de líquido, por exemplo, um gota de sangue de um dedo alfinetado, é suficiente para realizar ensaios
10 proporcionando uma resposta simples sim/não à presença de um analito, ou uma medição semi-quantitativa da quantidade de analito que está presente na amostra, por exemplo, pela realização de uma comparação visual ou digital da intensidade do ensaio a um gráfico de cor calibrado. Contudo, de modo a obter uma medição quantitativa de um analito no líquido, um volume
15 definido de fluido é tipicamente depositado no dispositivo. Desse modo, em algumas concretizações, um volume definido de fluido (ou um volume que é suficientemente próximo ao volume definido para proporcionar uma leitura razoavelmente precisa) pode ser obtido por modelagem do papel para incluir uma cavidade de amostra que aceite um volume definido de fluido. Por e-
20 xemplo, no caso de uma amostra de sangue inteira, o dedo do indivíduo pode ser alfinetado, e, em seguida, pressionado contra a cavidade da amostra até que a cavidade esteja cheia, proporcionando, desse modo, uma aproximação satisfatória do volume definido.

Algumas concretizações incluem adicionalmente equipamento
25 que pode ser usado para formar imagem do dispositivo de bioensaio após deposição do líquido de modo a obter informação sobre a quantidade de analito(s) baseado na intensidade de uma resposta colorimétrica do dispositivo. Em algumas concretizações, o equipamento é capaz de estabelecer uma ligação de comunicação com pessoas fora do local, por exemplo, via canais
30 de comunicação de celular, que realiza a análise baseada nas imagens obtidas pelo equipamento.

Sob certos aspectos, tais bioensaios podem ser fabricados u-

sando-se métodos simples que geram barreiras hidrofóbicas modeladas no meio hidrofílico. Por exemplo, em algumas concretizações, o meio hidrofílico é encharcado em fotorrevestimento protetor, e fotolitografia é usada para modelar o fotorrevestimento protetor para formar as barreiras. Fotolitografia
5 pode ser realizada no ambiente limpo, ou, conforme demonstrado abaixo, pode também ser realizado fora de um ambiente limpo, por exemplo, em um ambiente típico de laboratório, sem impactar significativamente a qualidade das barreiras fabricadas, e com custo significativamente reduzido. Em outras concretizações, impressão de microcontato é usada para definir as barreiras.
10 Aqui, uma “matriz” de modelo definido é “borrada” com um polímero, e prensada em e através do meio hidrofílico tal que o polímero encharca o meio, formando, desse modo, barreiras daquele modelo definido. Outras técnicas de fabricação podem também serem usadas, algumas das quais são descritas abaixo. Dependendo da aplicação pretendida do dispositivo e da técnica
15 de fabricação de barreira específica usada, as barreiras podem ter larguras de mais do que cerca de 200 μm , e podem definir canais tendo larguras na ordem de microns, por exemplo, cerca de 50 μm , ou até vários milímetros, ou maiores.

Enquanto algumas concretizações incluem papel cromatográfico
20 como o meio hidrofílico poroso, em geral qualquer substrato que se dissolve em fluidos por ação capilar e que é compatível com o método de modelagem selecionado pode ser usado, por exemplo, nitrocelulose e acetato de celulose, papel celulósico, filtro de papel, tecido, e película de polímero porosa. Por exemplo, nitrocelulose e acetato de celulose são comumente usados, e
25 membranas bem conhecidas para uso em diagnósticos de fluido, mas não são compatíveis com solventes tipicamente usados em fotolitografia, de modo que outros métodos seriam mais adequados para modelá-los, conforme discutido em maiores detalhes abaixo. Em adição, o meio hidrofílico e as regiões de barreira hidrofóbica podem ser preparadas usando-se materiais
30 que são compatíveis com as condições de teste, por exemplo, temperatura, pH, e/ou resistência iônica.

Primeiro, algumas concretizações de dispositivos de bioensaio

de fluxo lateral e usos dos mesmos serão descritos. Em seguida, algumas concretizações de dispositivos de fluxo direto de bioensaio e usos dos mesmos serão descritos. Em seguida, algumas concretizações de métodos para provisão de barreiras hidrofóbicas modeladas em meio hidrofílico poroso serão descritas.

Dispositivos de Bioensaio de Fluxo Lateral

A figura 1A é uma imagem de uma série 100 de dispositivos de bioensaio de fluxo lateral tendo um meio hidrofílico e barreiras hidrofóbicas, de acordo com algumas concretizações da invenção. Cada dispositivo 110 inclui uma ou mais barreiras hidrofóbicas modeladas 130, por exemplo, fotolitograficamente modeladas e fotorrevestimento protetor curado, e meio poroso 120, por exemplo, papel cromatográfico. As barreiras hidrofóbicas 130 definem regiões no meio 120 que podem ser usadas para realizar bioensaios. Na concretização ilustrada, a barreira 130 define uma região de deposição de amostra 140, onde um líquido biológico pode ser depositado, e que também serve como um canal para dissolver fluido por ação capilar, e uma pluralidade de regiões de ensaio 150, na qual o líquido biológico escoar. Conforme descrito em maiores detalhes abaixo, as regiões de ensaio 150 podem ser tratadas para proporcionar ensaios para aplicações particulares, por exemplo, para indicar a presença de açúcar na urina. A figura 1A ilustra dez dispositivos individuais 110 que foram produzidos de um disco simples de 7,5 cm de papel de cromatografia; contudo, o tamanho do papel e o número e tipo de dispositivos podem ser selecionados apropriadamente para uma dada aplicação.

A figura 1B é uma imagem de um dos dispositivos de bioensaio 110 da figura 1A, após absorção de cerca de 5 μ L de tinta vermelha de Waterman por ação capilar. A região de deposição de amostra 140 absorvida pela amostra por ação capilar, e a barreira hidrofóbica modelada 130 direciona a amostra nas três regiões de ensaio 150. Como a imagem mostra, a barreira 130 substancialmente restringe o fluxo de amostra dentro de regiões bem definidas. Devido às regiões modeladas do dispositivo poderem ser fabricadas a um tamanho relativamente pequeno, conforme descrito em maio-

res detalhes, somente um volume relativamente pequeno de líquido (por exemplo, menos do que 10 μL é necessário para encher suficientemente as regiões 140, 150 definidas pela barreira 130; em geral, várias configurações de dispositivos podem requerer cerca de 0,1 μL a 100 μL de fluido para encher o dispositivo, dependendo do tamanho do dispositivo e os tamanhos das características dentro do dispositivo.

Em algumas concretizações, uma ou mais regiões do meio hidrofílico, por exemplo, papel, são derivatizadas para ensaios biológicos por adição de reagentes apropriados. A figura 1C é uma imagem de uma concretização de um dispositivo de bioensaio 160 no qual regiões de ensaio 170 e 180 foram marcadas com reagentes diferentes para uso diagnóstico, e uma terceira região de ensaio 190 é um controle. Na concretização ilustrada, a região 170 é preparada com um ensaio de glicose que é adaptado daquele descrito em J.D. Peele, R.H. Gadsden, R. Crews, *Clin. Chem.* 1977, 23, 2242-2246, os conteúdos totais dos quais são incorporados aqui por referência. Conforme descrito em maiores detalhes abaixo, o ensaio é preparado por marcação da região de ensaio 170 com 0,3 μL de um iodeto de potássio 0,6 M, seguido por 0,3 μL de um 1:5 peroxidase de rábano silvestre/solução de glicose oxidase (15 unidades de proteína por mL de solução). Quando o ensaio é exposto à glicose, a glicose é oxidada pela glicose oxidase na presença de água e oxigênio, para dar ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é, em seguida, reduzido à água por peroxidase de rábano silvestre com uma oxidação concomitante do iodeto a iodo. O resultado é uma mudança de cor visível de clara a marrom que está associada com a presença de glicose.

A região 180 é preparada para um ensaio de proteína que é adaptada daquele descrito em M.J. Pugia, J.A. Lott, J.A. Profitt, T.K. Cast, *J. Clin. Lab. Anal.* 1999, 13, 180-187, os conteúdos totais dos quais são incorporados aqui por referência. Conforme descrito em maiores detalhes abaixo, o ensaio é preparado por marcação da região 180 com 0,3 μL de uma solução de imprintadura (0,3 μL) (92% de água, 8% de etanol por volume, 2,5 g/L de polivinil álcool e 250 mM de tampão de citrato a pH 1,8), seguido por

0,3 μ L de uma solução de reagente (95% de etanol, 5% de água por volume, 3,3 mM de tetrabromofenol azul). O ensaio de proteína é baseado na mudança de cor de tetrabromofenol azul (TBPB) quando ele ioniza e se liga a proteínas. Um resultado positivo neste caso é indicado por uma mudança de cor de amarelo para azul.

A região 190 pode ser usada como uma cavidade de controle e pode ser ou marcada com iodeto, mas não solução de enzima, ou com solução de enzima, mas não iodo.

Nesta concretização exemplar, os reagentes foram marcados com tubos capilares, contendo, pipetas, ou pinos, tais como usados em microsséries, podem ser usados para produzir os ensaios. Impressão de jato de tinta pode também ser usada para depositar reagentes. Os reagentes marcados foram permitidos secar a ar à temperatura ambiente por pelo menos 3 minutos antes do uso do dispositivo.

A figura 1D é uma imagem do dispositivo de bioensaio da figura 1C após ser exposto a 5 μ L de uma solução de urina artificial que não contém glicose ou proteína. Especificamente, 5 μ L de solução de amostra foi transferida para um prato Petri com uma micropipeta, o fundo do dispositivo foi imerso na solução, e a solução foi absorvida no papel por ação capilar. A solução de urina artificial foi preparada de acordo com a receita provida por Brooks and Keevil (T. Brooks, C. W. Keevil, *Lett. Appl. Microbiol.* 1997, 24, 203-206, os conteúdos totais dos quais são incorporados aqui por referência). A solução de urina artificial continha 1,1 mM de ácido láctico, 2,0 mM de ácido cítrico, 25 mM de bicarbonato de sódio, 170 mM de uréia, 2,5 mM de cloreto de cálcio, 90 mM de cloreto de sódio, 2,0 mM de sulfato de magnésio, 10 mM de sulfato de sódio, 7,0 mM de potássio dihidrogênio fosfato, 7,0 mM de dipotássio hidrogênio fosfato, e 25 mM de cloreto de amônia todos misturados em água purificada Millipore. O pH da solução foi ajustado a 6,0 por adição de 1,0 M de ácido hidrocloreto. Todos os reagentes foram obtidos de Sigma-Aldrich.

A figura 1E é uma imagem do dispositivo de bioensaio da figura 1C após ser exposto a 5 μ L da solução de urina artificial acima descrita que

adicionalmente inclui 550 mM de glicose e 75 μ M de albumina de soro bovino (BSA). A região de controle 190 foi marcada com a solução de iodeto de potássio, mas não com a solução de enzima. Ambas região de ensaio de glicose 170 e região de ensaio de proteína 180 mostram uma resposta visível à presença do respectivo analito na solução, enquanto a região de controle 190 não mostra uma resposta significativa. Um controle similar contendo a solução de enzima, mas não o iodeto, dá substancialmente os mesmos resultados (dados não mostrados).

Os testes acima descritos foram repetidos sob condições variadas de tempo e temperatura de modo a determinar a estabilidade dos ensaios. Verificou-se que para esta concretização particular, o ensaio de proteína produziu resultados indiferentes da temperatura de armazenamento e tempo, quando armazenado envolvido em folha de alumínio por cerca de 15 dias, ou a cerca de 0°C, ou a cerca de 23°C. O ensaio de glicose parece um tanto mais sensível às condições de armazenagem, e mostrou sinal diminuído para ensaios realizados cerca de 24 horas após marcação dos reagentes quando armazenados a 23°C; contudo, quando o ensaio de glicose foi armazenado a cerca de 0°C por cerca de 30 dias, ele produziu resultados comparáveis conforme inicialmente.

A figura 2 ilustra uma sequência de testes realizados no bioensaio ilustrado na figura 1C. Especificamente, o bioensaio foi exposto a amostras de urina artificial contendo glicose e proteína em faixas clinicamente relevantes (2,5-500 mM para glicose e 0,38-75 μ M para BSA) por imersão do fundo de cada dispositivo em 5 μ L da solução de teste. O fluido encheu substancialmente a região total definida pela barreira hidrofóbica modelada dentro de cerca de um minuto. Os ensaios secaram, e os indicadores visíveis se desenvolvem substancialmente totalmente após aproximadamente 10-11 minutos. As intensidades dos indicadores visíveis resultantes correspondem aproximadamente à quantidade de glicose e proteína nas amostras de teste. Em geral, as concentrações mais baixas de analito que resultam em uma resposta detectável, por exemplo, que resultam em uma mudança de cor visível, definem os limites inferiores da sensibilidade do ensaio. Nos

testes aqui realizados, as mudanças de cor são visíveis a 2,5 mM de glicose e a 0,38 μ M de BSA, indicando que os ensaios são pelo menos sensíveis (e podem ser inferiores). Em comparação, sondas típicas comercialmente disponíveis detectam menos do que 5 mM de glicose, ou menos do que 0,75 μ M de proteína. Desse modo, o bioensaio ilustrativo acima descrito é pelo menos tão sensível quanto estes ensaios de sonda. Além disso, o formato de ensaio permite a medição de dois ou mais analitos imediatamente, pelo que as sondas são tipicamente limitadas a medição de um analito simples.

Em geral, pela realização das medições com concentrações variadas de analito, uma curva padrão para a medição pode ser determinada. Desse modo, uma dada concentração de proteína ou anticorpo pode estar correlacionada com uma mudança de cor visível ou intensidade, permitindo medições quantitativas. Nota-se, contudo, que medições convencionais radiológicas, óticas, e/ou elétricas para determinar a presença de proteínas ou anticorpos não são incompatíveis com a plataforma, e, em certas circunstâncias, podem ser úteis.

Durante uso típico, amostras líquidas podem não serem medidas sob condições estéreis; por exemplo, soprimento de poeira, ou outras impurezas particuladas, podem contactar o líquido e/ou o dispositivo. Uma característica útil de bioensaios contendo o meio hidrofílico poroso é que o meio também serve como um filtro para remover pelo menos algumas impurezas que podem ser danosas à amostra biológica. As figuras 3A-3C são imagens de dispositivos de fluxo lateral, conforme mostrados na figura 1C, que foram adicionalmente contaminados com sujeira, pólen de planta, e pó de grafite, respectivamente. Estes contaminantes se aproximam das condições que podem ser encontradas durante a coleta típica e análise de amostras no campo. Após deposição dos contaminantes, os dispositivos foram expostos a amostras artificiais de urina contendo 550 mM de glicose e 75 μ M de BSA. As figuras 3A-3C ilustram que estes particulados não movem substancialmente os canais, e não interferem significativamente com o ensaio.

Em geral, existem pelo menos dois modos de introduzir uma amostra líquida a um dispositivo de bioensaio, dependendo do desenho da

concretização particular. Por exemplo, algumas concretizações incluem uma área de deposição de amostra que é ligada por uma borda do meio hidrofílico poroso. A amostra pode ser introduzida a um tal dispositivo por imersão desta borda da área de deposição de amostra no líquido. O líquido, em seguida, escoar lateralmente a uma ou mais áreas de ensaio. Outras concretizações incluem uma ou mais áreas de deposição de amostra que estão localizadas centralmente ao dispositivo, e têm limites pelo menos parcialmente definidos pelas barreiras, de modo que ao invés de imersão de uma borda do dispositivo em um líquido, ao invés, uma gota do líquido pode ser aplicada à(s) área(s) de deposição de amostra central. O líquido então escoar para uma ou mais áreas de ensaio. Tal dispositivo pode ser usado sem a necessidade de um repositório de amostra estéril separada, que não reduz somente a carga no paciente para proporcionar uma amostra líquida de volume relativamente alto dentro do repositório, e também reduz a carga nos trabalhadores de cuidado de saúde para manusear e dispor do líquido.

A figura 20 mostra vistas planas de topo e de fundo de um dispositivo de bioensaio de fluxo lateral exemplar 2000. O dispositivo inclui uma camada de topo 2020 que é laminada a, ou, de outro modo, ligada a uma camada de fundo 2010. Conforme pode ser visto na vista de topo do dispositivo, a camada de topo 2020 inclui um material substancialmente impermeável a líquido, por exemplo, um fotorrevestimento protetor de película seca, no qual um canal 2020' é provido que pode ser usado para coleta de amostra. Na concretização ilustrativa, o canal 2020' inclui uma abertura central e da qual várias aberturas estreitas irradiam. A camada de fundo 2010 inclui um meio hidrofílico poroso, por exemplo, papel, e barreiras hidrofóbicas modeladas, por exemplo, fotorrevestimento protetor modelado, conforme descrito em maiores detalhes aqui, e que definem uma zona de teste 2010' que inclui uma área de absorção de amostra central da qual vários canais radiam e terminam em respectivas áreas de ensaio.

O dispositivo 2000 pode ser formado conforme ilustrado na figura 20, de acordo com algumas concretizações. Primeiro, para formar a camada inferior 2010, um meio hidrofílico poroso saturado com um material

hidrofóbico, tal como fotorrevestimento protetor 2011, é provido, conforme descrito em maiores detalhes abaixo. O meio saturado 2011 é então exposto a UV, ou outra luz estável, através de uma máscara 2040 que tem um modelo selecionado de acordo com o modelo desejado da barreira hidrofóbica no dispositivo 2000, e o material hidrofóbico é então desenvolvido, conforme descrito em maiores detalhes abaixo, para formar a camada 2010. A camada 2010 inclui uma região 2011' que inclui barreiras hidrofóbicas modeladas definindo a zona de teste 2010', e uma projeção de papel 2011'' que pode ser usada para manuseio do dispositivo sem contactar a zona de teste 2010'. As áreas de ensaio circulares no final dos canais de zona de teste 2010' podem ser tratadas conforme descrito em maiores detalhes acima e abaixo, para reagir com analitos.

Em seguida, para formar a camada superior 2020, uma camada de material hidrofóbico que é capaz de modelagem 2021, por exemplo, fotorrevestimento protetor de película seca, é provida. O material 2021 é então exposto a UV, ou outra luz adequada através de uma máscara 2050 que tem um modelo selecionado de acordo com o modelo desejado do canal de coleta de amostra 2020', e o material hidrofóbico é então desenvolvido, por exemplo, conforme descrito em maiores detalhes abaixo, para formar a camada 2020. A camada 2020 inclui uma região 2021' que inclui o canal de coleta de 2020', e uma região 2021'' incluindo suporte plástico que pode ser usado para manuseio do dispositivo sem contactar o canal de coleta de amostra 2020'. Nota-se que as camadas superior e inferior podem ser formadas em qualquer ordem desejada, ou em paralelo, conforme desejado.

A camada superior 2020 é então ligada à camada inferior 2010, por exemplo, por laminação das mesmas juntas, para formar o dispositivo 2000. As camadas superior e inferior são alinhadas, tal que a região 2021'' sobrepõe a 2011'' e a região 2011' sobrepõe à região 2021'. Na concretização ilustrada, a abertura central do canal de coleta de amostra 2020' sobrepõe à área de absorção de amostra central da zona de teste 2010'. Contudo, as aberturas estreitas que radiam da abertura central do canal de coleta de amostra 2020' não sobrepõem os canais ou áreas que radiam a partir da

área de absorção de amostra central da zona de teste 2010'. Ao invés, as aberturas estreitas do canal 2020' são lateralmente afastadas a partir dos canais e áreas de ensaio da zona de teste 2010', de modo que o líquido substancialmente não pode escoar diretamente de uma das aberturas estreitas do canal 2020' em um dos canais ou áreas de ensaio da zona de teste 2010'. Ao invés, as aberturas estreitas do canal 2020' fazem com que o líquido escoe em direção à abertura central do canal de coleta de amostra 2020', do qual o líquido escoar na área de absorção de amostra central da zona de teste 2010' e desta abaixo dos canais múltiplos e áreas de ensaio da zona de teste 2010.

Em um exemplo, a camada inferior 2010 foi formada por saturação de papel de filtro de Whatman 1 com fotorrevestimento protetor; cozimento do papel a cerca de 95°C por cerca de 10 minutos; prensagem do papel junto com uma máscara (entre duas peças de vidro); exposição do papel a luz UV através da máscara; cozimento do papel a cerca de 95°C por cerca de 10 minutos; encharcamento em propileno glicol monometil éter acetato (PGMEA) por cerca de 30 minutos para lavar fotorrevestimento protetor não-exposto; e lavagem do papel com propan-2-ol. O papel foi então seco a cerca de 25°C, e então plasma oxidado por cerca de 10 segundos a cerca de 500 torr para aperfeiçoar a hidrofiliabilidade dos canais e zonas de teste.

No mesmo exemplo, a camada inferior 2020 foi formada por, primeiro, obtenção do fotorrevestimento protetor de película seca, que vem como um rolo de plástico azul de luz protegido em ambos os lados por uma folha plástica clara (Riston®, de Dupont). O fotorrevestimento protetor foi modelado por exposição do mesmo a luz UV através de uma máscara (impressa em uma transparência); remoção da folha plástica de um lado; e lavagem do fotorrevestimento protetor não-exposto com uma solução aquosa de cerca de 0,85 peso% de Na_2CO_3 . O fotorrevestimento protetor modelado foi então pulverizado por cerca de 1 segundo com adesivo 3M Spray Mount_, alinhado à camada 2010 pela mão, e as duas camadas foram laminadas juntas a cerca de 100°C. Uma escova de ar foi usada para aplicar

aproximadamente 7 peso% de solução de polietiliminina (MW = 20,000) em etanol ao topo do dispositivo até que o dispositivo pareceu levemente úmido. O revestimento foi então secado com uma corrente de nitrogênio. O revestimento de polietiliminina aumentou a hidrofobicidade dos raios no fotorrevestimento protetor de película seca.

As figuras 21A-21F são imagens de um dispositivo de bioensaio fabricado usando-se o procedimento do exemplo acima descrito, em tempos diferentes durante exposição à água colorida. A figura 21A é uma imagem da vista de topo do dispositivo antes da exposição à água. A figura 21B é uma imagem do lado de topo do dispositivo obtido imediatamente após deposição de cerca de 5 μ L da água em uma das aberturas estreitas no canal de coleta de amostra 2020' da camada superior 2020. A figura 21C é uma imagem do lado de topo do dispositivo em um tempo mais tarde, e mostra que a água colorida se desloca ao longo da abertura estreita após a qual é depositada na abertura central do canal de coleta de amostra 2020' e na área de absorção de amostra central da zona de teste 2010' da camada inferior 2010.

As figuras 21D-21F são imagens sequenciais do lado de fundo do dispositivo tomadas em tempos diferentes após a água colorida alcançar a área de absorção de amostra central da zona de teste 2010'. A figura 21D mostra a água colorida após ela ter escoado a partir da área de absorção de amostra central da zona de teste 2010' nos canais que radiam a partir da área central. A figura 21E mostra a água colorida após ela ter parcialmente escoado a partir destes canais nas regiões de ensaio. A figura 21F mostra a água colorida após ela ter enchido substancialmente completamente a região de absorção de amostra central, canais, e regiões de ensaio da zona de teste 2010'. Nesta concretização, cerca de 5 μ L de água foi suficiente para encher completamente a zona de teste 2010'.

Devido ao meio poroso poder ser usado para filtrar partículas, ele pode também ser usado para realizar diagnósticos nas amostras de sangue totais. A presença de células de sangue vermelhas tipicamente complica os diagnósticos convencionais, por exemplo, requerendo centrifugação ou

coagulação. Em algumas concretizações dos dispositivos aqui descritos, o meio poroso pode ser selecionado de modo a filtrar as células de sangue vermelhas, e permite fluxo livre dos componentes de fluido do sangue no canal; alternadamente, o papel pode ser adicionalmente tratado para aumentar a ligação às células de sangue vermelhas e impedi-las de bloquear o canal. Em geral, a porosidade do papel determinará o tamanho das partículas que podem ser transportadas através do papel. Por exemplo, proteínas e moléculas pequenas podem tipicamente se mover prontamente através do papel, enquanto partículas na ordem do tamanho do poro podem ser filtradas.

Enquanto testes colorimétricos são geralmente proveitosos na provisão de indicadores visuais da presença ou ausência de analitos, dispositivos de fluxo lateral podem também serem usados como uma plataforma para medir quantitativamente os níveis de analitos em líquidos biológicos, por exemplo, urina. A capacidade para quantificar analitos múltiplos simultaneamente usando-se bioensaios pouco onerosos e portáteis pode potencialmente ser útil para identificação e monitoramento de doença em ambientes de cuidado de saúde domésticos, em situações de emergência, e em países menos industrializados, bem como em ambientes de laboratório e hospital.

Em algumas concretizações, para obter dados quantitativos, o dispositivo de bioensaio é provido de imagem após exposição a líquido, e após os resultados colorimétricos se desenvolverem, por exemplo, usando-se um escaneador de desktop, um escaneador portátil (tal como um escaneador de cartão de negócios), uma câmera digital, ou um fone de câmera. Os escaneadores são úteis para registro dos resultados de bioensaios porque eles são relativamente pouco onerosos, eles têm alta resolução, a imagem escaneada está tipicamente em foco, e a intensidade da imagem é tipicamente não afetada por condições superficiais. As câmeras digitais são portáteis e aumentadamente disponíveis, superficiais e poderosas, embora as intensidades das imagens digitais registradas possam ser afetadas por algumas condições superficiais, e a capacidade de focalizar a reprodutividade pode, em algumas circunstâncias, depender do operador.

Os fones de câmera tipicamente têm características similares conforme as câmeras digitais, e também permitem que a imagem registrada possa ser transmitida eletronicamente através de infraestrutura de comunicações existente (por exemplo, canais de celulares) para um laboratório fora do local, onde os dados podem ser analisados por um especialista. O especialista pode então retornar os resultados da análise (por exemplo, em tempo real) para a pessoa que administra o teste.

Alguns modelos de fones de câmera podem focalizar automaticamente, e não requerem uma lente adicional de modo a focalizar suficientemente em um objeto, por exemplo, um bioensaio, enquanto alguns fones de câmera incluem câmeras que não podem focalizar objetos que estão muito próximos à câmera. Algumas concretizações incluem uma lente colocada na frente da câmera, que pode capacitar a câmera a tomar imagens suficientemente focalizadas de objetos relativamente próximos à câmera. A figura 17A é uma imagem de uma lente exemplar 1710 produzida de poli(dimetilsiloxano) (PDMS), que pode ser reversivelmente vedada à lente em um fone de câmera. A lente 1710 foi fabricada usando-se uma mistura 10:1 de base de PDMS e agente de cura (kit de elastômero de silicone Sylgard[®] 184), e bolhas removidas a partir da mistura pela colocação da mesma sob vácuo por 30 minutos. Cerca de 5 μ L de PDMS foi colocado no fundo de um prato Petri 1720, e curado de cabeça para baixo por 2 horas a 60°C, para criar uma lente de PDMS côncava. A lente de PDMS 1710 foi removida a partir do prato Petri 1720 com pinças, e colocada sobre a lente do fone de câmera. O fone de câmera foi focalizado no dispositivo pelo ajuste da distância entre o fone de câmera ao dispositivo. Em geral, o método focal da lente pode ser ajustado pela mudança do raio de curvatura da lente de PDMS, por exemplo, por cura do PDMS em uma superfície que é ou mais ou menos hidrofílica do que um prato Petri. Uma superfície mais hidrofílica produzirá uma lente com um raio maior de curvatura, e um método focal maior. Uma superfície hidrofílica da lente produzirá uma lente com um raio menor de curvatura. Uma lente com um raio menor de curvatura pode também ser obtida pela cura do PDMS de cabeça para cima, ao invés de, de cabeça pa-

ra baixo. Qualquer lente convergente (por exemplo, lente plano-convexa, lente biconvexa, lente de Fresnel) com um método focal apropriado pode ser colocada na frente do fone de câmera para focalizar a imagem.

A figura 17B é uma imagem 1730 obtida pela colocação da lente 1710 sobre a lente de um fone de câmera (fone de câmera Samsung Trace em modo automático, 1.3 megapixels), e mantendo o fone de câmera cerca de 4 cm acima de um dispositivo de bioensaio exemplar. A figura 17C é uma imagem 1740 do mesmo dispositivo de bioensaio tomada com o mesmo fone de câmera e a mesma distância a partir do dispositivo conforme na figura 17B. A imagem 1730 é significativamente mais clara do que a imagem 1740, como um resultado da lente de PDMS.

Em algumas concretizações, uma vez que os resultados de um ensaio sejam convertidos a formato digital, a intensidade da cor desenvolvida em cada zona de teste é medida usando-se, por exemplo, Adobe®Photoshop®, ou outro programa de análise de imagem. A intensidade da cor é então comparada com uma curva de calibração para calcular a concentração do analito.

A figura 4 ilustra esquematicamente um dispositivo de bioensaio exemplar 400 que inclui um canal central 410 que dissolve uma amostra no meio hidrofílico poroso (por exemplo, papel), e quatro canais laterais que direcionam a amostra em quatro áreas de teste separadas 420, 421, 430, 431, cada uma contendo reagentes de ensaios. O desenho inclui canais relativamente estreitos (cerca de 0,75 mm de largura) para reduzir o volume de amostra requerido para cada ensaio. Geralmente, quanto mais largo o canal, maior o volume de amostra necessário para operar o ensaio. As áreas de teste 420, 421 são tratadas com a proteína de ensaio descrita acima, e as áreas de teste 430, 431 são tratadas com o ensaio de glicose descrito acima.

Várias características deste desenho os tornam adequados para uso em ambientes de cuidado de saúde domésticos ou remotos, por exemplo. O canal central 410 de aproximadamente 3 mm de comprimento filtra particulados de amostras biológicas, similarmente ao dispositivo descrito

acima, e a seção inferior projetada do canal central 410 facilita a absorção da amostra. O dispositivo exemplar central pode se ajustar em uma peça de papel de $1,6 \times 1,6$ cm, de modo que o dispositivo não é somente pequeno e portátil, mas também leve (~35 mg). A área vazia acima das áreas de teste 420, 421, 430, 431 pode ser usada para etiquetagem e para manipulação do dispositivo.

Neste exemplo ilustrativo, existem também várias características específicas de desenho para os ensaios de glicose e proteína particulares usados. Os líquidos fazem com que os reagentes para o ensaio de glicose se movam com a parte anterior do solvente, enquanto os líquidos não fazem com que os reagentes para o ensaio de proteína se movam. O desenho da figura 4 inclui dois tipos de zonas de teste para acomodar este comportamento diferencial, e para aumentar a capacidade de quantificar os ensaios. Para o ensaio de glicose, formas similares a diamante são providas em áreas de teste 430, 431 para concentrar os reagentes nas extremidades das áreas de teste. Para o ensaio de proteína, formas similares a retângulo são providas nas áreas de teste 420, 421 para proporcionar uma região definida para análise de dados relativamente consistente. Em geral, quatro bioensaios diferentes podem ser realizados com este desenho exemplar, mas aqui dois ensaios são providos em duplicata em cada dispositivo. Adicionalmente, na concretização da figura 4, o tamanho dos canais e zonas de teste foram configurados e designados para ser grande bastante para ser visível pelo olho, mas, ao mesmo tempo, pequeno bastante para limitar o volume de fluido necessário para operar o ensaio a um volume de amostra tratável (por exemplo, cerca de 5 μ L), tal como uma lágrima, ou uma gota de urina.

Em geral, as formas e tamanhos dos canais e/ou regiões de ensaio podem ser selecionados de acordo com o tipo de líquido e/ou analito e/ou método de detecção com o qual o dispositivo é para ser usado. Por exemplo, se a resposta do dispositivo ao analito é para ser medida pela formação de imagem do dispositivo e análise da imagem com software de computador, então os canais e regiões de ensaio não necessitam necessariamente serem visíveis ao olho humano, considerando-se que o sistema de

imagem pode obter uma quantidade suficiente de informação sobre a resposta ao analito para realizar uma análise. Ou, como no exemplo acima, se os reagentes se movem com o líquido aplicado ao dispositivo, então as regiões de ensaio podem ser moldadas para capturar e/ou concentrar o reagente. Ou, como no exemplo acima, se o reagente está relativamente estacionário dentro da região de ensaio, então a região de ensaio pode ser moldada para proporcionar uma área que o software da análise da imagem pode facilmente analisar.

A figura 5 ilustra um procedimento exemplar 500 para quantificação dos níveis de glicose e proteína na urina. Primeiro, o dispositivo de bioensaio é exposto ao líquido 510, por exemplo, imerso em cerca de 5.0 μ L de uma solução de amostra de urina artificial com uma concentração conhecida de glicose e proteína (albumina de soro bovino, BSA). Em um exemplo, a solução e procedimento de imersão foram os mesmos conforme descrito acima.

O dispositivo de bioensaio exposto é então provido de imagem 520. Em um exemplo, trinta minutos após começo do ensaio, o dispositivo foi fotografado usando-se, ou uma câmera digital Nikon D50 SLR em modo manual com flash (6.1 Megapixels); um fone de câmera Sony Ericsson W660i em modo automático sem flash (2.0 Megapixels com autofoco); ou um fone de câmera Samsung Trace em modo automático (1.3 Megapixels) com uma lente de PDMS. O dispositivo também foi escaneado usando-se um escaneador Epson Perfection 1640SU ou ambientes de falha (cor photo, 600 dpi); e um escaneador portátil de alimentação de folha Docketport 465 em ambientes de falha (cor, 600 dpi). Estes exemplos são não-limitativos, e outros dispositivos de imagem podem ser usados.

A imagem é então opcionalmente convertida à escala cinza de 8-bit 530, ou convertida a um formato de cor, tal como CMYK 530', por exemplo, usando-se Adobe®Photoshop®. Em seguida, as regiões de teste na imagem são selecionadas 540. Em um exemplo, as regiões de teste foram selecionadas com o mouse usando-se uma ferramenta retangular para o ensaio de proteína e uma ferramenta de laço poligonal para o ensaio de gli-

cose. Para o ensaio de proteína, a área de teste total foi selecionada com um retângulo que era de $2,5 \times 1,5$ mm de largura. Para o ensaio de glicose, o triângulo na ponta do modelo foi selecionado.

Em seguida, a media aritmética de intensidade de pixel dentro
 5 de cada área de teste foi usada para quantificar a resposta colorimétrica
 550. Estas intensidades médias foram subtraídas das intensidades médias
 para dispositivos com reagentes marcados, mas que não foram expostos à
 amostra. Nota-se que algumas ou todas das etapas de análise podem ser
 automatizadas. Por exemplo, o software operando no computador pode ser
 10 usado para selecionar automaticamente regiões da imagem a serem subse-
 quentemente analisadas. Ou, por exemplo, a análise total da imagem pode
 ser automatizada, isto é, um programa de computador pode automaticamen-
 te selecionar as regiões da imagem, medir a intensidade média de pixel, e
 converter a intensidade de pixel a uma concentração usando as equações
 15 derivadas das curvas de concentração.

A figura 6 ilustra sinais obtidos para concentrações diferentes de
 glicose e proteína em urina artificial de acordo com algumas concretizações
 da invenção. As concentrações de glicose entre 0 e 20 mM foram medidas.
 O ensaio de proteína foi operado usando-se concentrações de BSA entre 0 e
 20 60 μ M, e é mostrado no gráfico no fundo da figura. Os gráficos contêm da-
 dos obtidos usando-se um escaneador de desktop (quadrados), um escane-
 ador portátil (quadrados abertos), uma câmera digital (círculos), e um fone
 de câmera com foco automático (círculos abertos); a inserção mostra a regi-
 ão linear dos dados em maiores detalhes. Cada ponto de dado é a média de
 25 doze ensaios; barras de erro representam os desvios padrões relativos des-
 tas medições. A região linear do dado foi ajustada com uma linha; a inclina-
 ção (m), interceptação (b), e valor R^2 para cada linha são conforme segue: gli-
 cose (escaneador de desktop) ($m = 16,6$, $b = -1,54$, $R^2 = 0,991$), glicose (es-
 caneador portátil) ($m = 18,0$, $b = 2,95$, $R^2 = 0,986$), glicose (câmera digital) (m
 30 $= 8,96$, $b = -2,12$, $R^2 = 0,983$), glicose (fone de câmera) ($m = 6,17$, $b = 0,186$,
 $R^2 = 0,986$), proteína (escaneador de desktop) ($m = 1,16$, $b = 12,8$, $R^2 =$
 $0,982$), proteína (escaneador portátil) ($m = 1,07$, $b = 14,0$, $R^2 = 0,954$), prote-

ína (câmera digital) ($m = 0,771$, $b = 14,5$, $R^2 = 0,980$) , proteína (fone de câ-
mera) ($m = 0,379$, $b = 17,0$, $R^2 = 0,950$).

Conforme a figura 6 ilustra, o sinal obtido a partir dos ensaios
exemplares de glicose e proteína se correlaciona aproximadamente linear-
mente com a concentração de analito. Os pontos de dados e barras de erro
5 mostrados nesta figura são os valores de desvio médio e padrão, respecti-
vamente, de pelo menos doze medições por concentração de analito. Ajustes
de mínimos quadrados lineares de cada conjunto de dados dão coefici-
entes de determinação (R^2) de 0,95-0,99. As respostas são aproximadamen-
te lineares entre 0 e 5 mM de glicose e entre 5 e 60 μ M de BSA, mas se
10 desviam da linearidade pelo nivelamento em concentrações mais altas de
analitos. A faixa de concentrações de glicose medida pelo uso, ou do esca-
neador ou câmera, não atravessa a faixa total de concentrações de glicose
detectada na urina clinicamente (1–56 mM). Contudo, mesmo níveis de gli-
cose na urina acima de 0,8 mM são indicativos de doença, de modo que eles
15 podem ser úteis para detectar baixos níveis de glicose. A faixa linear do en-
saio de glicose (0-5 mM) pode permitir a medição quantitativa de baixas
concentrações de glicose na urina. A faixa linear para a detecção de proteí-
na é também apropriada para uso clínico. O ensaio parece ser suficiente-
mente sensível para distinguir entre doença glomerular ([proteína] > 35 μ M),
doenças tubulares renais (10 μ M < [proteína] < 20 μ M), e microalbuminúria
20 (0,3 μ M < [proteína] < 2 μ M). Nota-se que pode ser possível detectar outras
concentrações de glicose e proteína quantitativamente pela mudança das
concentrações de reagentes, ou pelo encurtamento do canal central do mo-
delo para limitar a distância entre as cavidades de teste e o fundo do disposi-
25 tivo.

A figura 6 também ilustra que a intensidade do sinal foi consis-
tentemente menor para a câmera digital e fone de câmera do que para o
escaneador de desktop e escaneador portátil, com as condições particulares
30 de iluminação, mas as similaridades entre coeficientes de determinação e o
relacionamento consistente entre as inclinações para os dados de glicose e
proteína sugerem que câmeras digitais de alta qualidade são proximamente

mais efetivas como escaneadores para adquirir dados quantitativos. Por exemplo, curvas de calibração a partir do escaneador e da câmera foram comparadas para quantificar os níveis de BSA e glicose em uma amostra de teste de urina artificial. Uma amostra contendo 4,5 mM de glicose e 45 μ M de BSA foi analisada doze vezes, produzindo resultados de $4,3 \pm 0,4$ mM de glicose e 46 ± 5 μ M de BSA (usando-se a curva de calibração do escaneador) e $4,5 \pm 0,8$ mM de glicose e 48 ± 6 mM de BSA (usando-se a curva de calibração da câmera). Desse modo, ambas as técnicas produzem resultados estatisticamente comparáveis.

Em um procedimento exemplar, devido aos dados a partir da câmera digital e fones de câmera serem dependentes, para alguma extensão, às condições de iluminação, cada conjunto de dados foi calibrado pela operação de uma amostra de urina artificial de concentração conhecida. As intensidades de sinal para esta amostra conhecida foram comparadas com o valor esperado a partir da curva mostrada na figura 6 para obter um fator de resposta que foi usado para ajustar os dados experimentais para ajustar a curva de calibração.

Em geral, protocolos de análise de imagem, tais como o protocolo exemplar acima, podem ser usados para analisar uma variedade de dispositivo de bioensaios, e não são limitados à concretização desejada. Qualquer dispositivo que responda à presença de um analito em um modo que pode ser digitalmente provido de imagem pode ser analisado usando-se adaptações do procedimento acima descrito. Por exemplo, outros desenhos de dispositivos de bioensaio laterais, dispositivos de bioensaio de fluxo direto, e dispositivos de bioensaio tridimensionais podem também serem analisados.

Conforme notado acima, o desempenho dos dispositivos de bioensaio não são significativamente impactados pela presença de contaminantes particulados. A Tabela 1 mostra os resultados que resumem a análise quantitativa de amostras de urina artificial exemplares (4,5 mM de glicose e 50 μ M de BSA) contaminadas com ou sujeira, serragem, ou pólen de planta. Cada contaminante foi medido seis vezes usando-se ambos a câmera digital

e o escaneador; os sinais digitais foram convertidos a concentrações usando-se as linhas de calibração mostradas na figura 6. Em cada caso, os contaminantes tinham pouco efeito nas concentrações de glicose (erro $\leq 6\%$), e somente pólen de planta afetou a concentração de proteína (erro $\leq 13\%$).

- 5 Isto foi um resultado de alguma proteína a partir da flor que foi dissolvida na amostra, e causou uma resposta aumentada.

Tabela 1. Resultados quantitativos para ensaios usando-se soluções contaminadas de glicose (4,5 mM) e BSA (45 μ M). Os dispositivos foram escaneados usando-se o escaneador de desktop, e as concentrações foram calculadas usando-se as curvas de calibração para o escaneador de desktop

	Glicose	BSA
Contaminante	Conc. Observada (mM)	Conc. Observada (μ M)
Sujeira	$4,4 \pm 0,4$	47 ± 9
Serragem	$4,3 \pm 0,3$	41 ± 5
Pólen	$4,5 \pm 0,6$	86 ± 4^a

^a Cerca de $34 \pm 10 \mu$ M de proteína foram independentemente medidos em uma amostra de 0μ M de BSA contaminada com pólen.

- Conforme notado acima, pelo menos algum controle sobre o volume de amostra que é analisada é tipicamente necessário para produzir uma medição quantitativa. Contudo, em alguns ambientes, por exemplo, localizações remotas, uma micropipeta capaz de dispensar 5μ l de amostra pode não estar disponível. Desde que a área superficial combinada dos canais e zonas de teste nos dispositivos de bioensaio é constante em muitas concretizações, analitos podem ser obtidos quantitativamente na imersão do dispositivo em um volume de amostra desconhecido, e por remoção do dispositivo logo que a amostra tenha enchido as zonas de teste. A Tabela 2 mostra os resultados de medições de três concentrações diferentes de glicose e proteína usando-se um método no qual aproximadamente 20μ L de urina artificial foi transferida para um prato Petri, o fundo do dispositivo foi imerso na amostra, e o dispositivo foi removido a partir da amostra logo que a amostra tenha enchido as quatro zonas de teste. O dispositivo foi assentado

plano em uma toalha de papel e após 30 minutos, o dispositivo foi provido de imagem conforme descrito acima. Os erros nas medições usando este método são um tanto maiores do que aqueles usando volumes de amostra fixos, mas os níveis de analitos podem ainda serem detectados quantitativamente.

Tabela 2. Detecção quantitativa de amostras contendo glicose (2,5, 3,5, e 4.5 mM) e proteína (25, 35, e 45 μ M). Os valores são os desvios médio e padrão de dose medições.

	[Glicose], mM			[BSA], μ M		
	Concentrações Conhecidas			Concentração Conhecidas		
	2,5	3,5	4,5	25	35	45
Método de Detecção	Concentrações Observadas			Concentrações Observadas		
Escaneador de Desktop	$2,5 \pm 0,4$	$3,5 \pm 0,6$	$4,3 \pm 0,4$	27 ± 4	38 ± 6	46 ± 5
Escaneador Portátil	$2,6 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,6$	$4,7 \pm 0,4$	28 ± 6	38 ± 5	45 ± 4
Câmera Digital	$2,4 \pm 0,4$	$3,8 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,8$	26 ± 6	37 ± 8	48 ± 6
Fone de Câmera (com auto foco)	$2,5 \pm 0,5$	$3,9 \pm 0,7$	$4,5 \pm 0,7$	27 ± 7	36 ± 8	44 ± 7
Fone de Câmera (com lente de PDMS) ^a	$2,6 \pm 0,6$	$3,2 \pm 0,7$	$4,8 \pm 0,5$	26 ± 6	34 ± 8	45 ± 7

^a A curva de calibração a partir do fone de câmera com foco automático foi usada para quantificar estes resultados.

A combinação de papel modelado e um escaneador ou detector de câmera digital oferece várias vantagens para detecção quantitativa de doença em ambientes de cuidado de saúde domésticos, ou por primeiros

respondedores. Esta concretização verificou-se dar resultados precisos e quantitativos quando se detecta glicose e proteína na urina (erro $\leq 15\%$). Estes resultados também demonstram que esta tecnologia baseada em papel pouco onerosa, simples e portátil é suficientemente quantitativa em sistemas de teste que pode ser útil em um contexto medicamente relevante.

Em alguns dispositivos exemplares, os resultados para o ensaio de glicose foram observados para tornarem-se menos sensíveis com o tempo após marcação dos reagentes no dispositivo (quando o dispositivo foi armazenado à temperatura ambiente). Um dispositivo analítico que seria útil em localizações remotas incluiria desejavelmente reagentes que permanecem estáveis por pelo menos vários dias, e, preferivelmente, por várias semanas. De modo a intensificar a estabilidade dos reagentes para o ensaio de glicose, trehalose, um dissacarídeo conhecido por sua capacidade de estabilizar proteínas em sua forma ativa em outras aplicações, pode ser adicionada. A figura 7 ilustra que, em algumas concretizações exemplares onde trehalose foi marcada no papel (antes que as enzimas sejam adicionadas), nenhuma perda na atividade enzimática foi observada sobre um período de duas semanas (mesmo quando os dispositivos são armazenados à temperatura ambiente), pelo que, em algumas concretizações exemplares preparadas sem trehalose, o ensaio de glicose diminuiu linearmente com o tempo. Especificamente, na presença de trehalose, a intensidade de sinal para o ensaio de glicose (quando detectando 4,5 mM de glicose em urina artificial) foi aproximadamente constante por cerca de 30 dias quando os dispositivos foram marcados com reagentes e então armazenados à temperatura ambiente. Os valores no gráfico são a média de seis medições, e as barras de erro representam os desvios padrões a partir destas médias. O ensaio de proteína pode ser armazenado à temperatura ambiente por mais de 2 meses sem perda de sinal (dados não mostrados). Será apreciado que a trehalose não é necessária para proporcionar dispositivos funcionais, e também que muitos outros tratamentos podem ser usados para intensificar a estabilidade dos ensaios.

Embora o meio poroso das concretizações inclua regiões dife-

rentes que são derivatizadas para detecção de glicose e proteína, em geral o meio pode ser adequadamente derivatizado para medição de outros analitos também, e pode ser usado em uma variedade de aplicações para qual a disponibilidade de um teste simples e não oneroso é útil.

5 Por exemplo, em algumas concretizações, os dispositivos de bioensaio são usados para realizar análise de urina para crianças, por exemplo, crianças prematuras. A obtenção de uma quantidade suficiente de urina de uma criança jovem, particularmente uma criança jovem prematura, é difícil com tecnologia convencional. A técnica convencional é pôr uma esfera de algodão na fralda da criança jovem no local apropriado, abrir a fralda
10 3 horas depois, remover a esfera de algodão, e espremer o máximo possível de urina (tipicamente somente fração de uma gota) em uma sonda de análise de urina dimensionada para adulto. Este método resulta em uma variedade de problemas, incluindo que a espécime tenha tipicamente pelo menos
15 parcialmente evaporada, que afeta a concentração dos analitos, bem como a gravidade específica (e, desse modo, mobilidade) da solução. Adicionalmente, os analitos podem ser oxidados, que podem afetar os resultados da proteína, glicose, pH e/ou outras medições.

 Em contraste, concretizações da presente invenção proporcionam dispositivos que podem ser prontamente usados para capturar e analisar amostras de urina de crianças jovens, por exemplo, crianças jovens prematuras. Em uma concretização, um dispositivo de bioensaio de fluxo lateral, preparado para os ensaios desejados, é posicionado em um local correto na fralda, e inclui um canal de papel que conduz à superfície externa
20 da fralda. Quando a criança jovem urina, a urina escoar através do dispositivo e o canal de papel, e revela indicadores colorimétricos externos que podem ser lidos por uma enfermeira, técnico ou médico. Tal dispositivo pode ser prontamente incluído nas fraldas devido ao seu baixo custo. Além disso, a leitura do dispositivo não requer manuseio da criança jovem, devido às cores/ensaios ocorrerem na superfície externa da fralda. Este aspecto pode ser
25 particularmente útil para crianças jovens prematuras, porque o manuseio pode causar problemas com sua respiração, temperatura, e/ou níveis de es-
30

5 tresse, por exemplo. Adicionalmente, o resultado é imediatamente disponível após urinação; isto resulta ambos em uma falta de necessidade para esperar para realizar o teste até uma mudança de fralda tabelada (tipicamente de 3 em 3 horas), e reduz a degradação potencial da amostra que pode ocorrer com ensaios convencionais. Em algumas concretizações, os indicadores visuais são produzidos particularmente brilhante de modo a indicar que a urina foi analisada, de modo que o resultado pode ser rapidamente lido.

10 Uma variedade de ensaios pode ser incorporada nos dispositivos baseados em fralda. Por exemplo, os testes de glicose e/ou proteína descritos acima podem ser incluídos. Em algumas concretizações, o fator de níveis de crescimento endotelial vascular (VEGF) na urina de crianças jovens, por exemplo, crianças jovens prematuras, pode ser monitorado. Os níveis de VEGF são um indicador do desenvolvimento de doença retinal. Um método convencional de diagnose de doença retinal em crianças jovens
15 prematuras é exames de 15 minutos semanalmente ou bissemanalmente por um oftalmologista retinal de criança jovem, que é ambos oneroso e disruptivo à criança jovem. A detecção de VEGF e outros fatores de crescimento (tais como IGF-1, ou fator 1 de crescimento similar à insulina) na urina, pode ser útil para diagnose de retinopatia de prematuridade, diabetes, câncer, e
20 transplante, conforme revelado em S.K. Smith, Hum. Reprod. Update 1998, 4, 509-519, os conteúdos dos quais são incorporados aqui por referência. A detecção de VEGF e outros fatores de crescimento pode ser feita em tecnologia de papel modelado no mesmo modo que testes de tira de gravidez detectam beta-HCG na urina.

25 Em outras concretizações, os dispositivos podem ser usados para realizar análise de urina de animais, por exemplo, animais de laboratório, ou animais domésticos em um veterinário. Convencionalmente, os animais são apertados e/ou excitado até que eles urinem; a urina é coletada e, então, depositada em sondas de análise de urina de humano adulto. Em
30 contraste, os bioensaios de fluxo lateral podem ser formados como “tiras estreitas” de papel relativamente pequenas e difundidas no chão da gaiola, no qual o animal pode urinar. Tais testes colorimétricos podem ser úteis para

medição de proteína e glicose em animais de laboratório onde diagnose antecipada de diabetes ou doença de rim é útil. Em um ambiente veterinário, a determinação de diabetes em gatos e cães obesos é um teste útil que pode ser difícil de se fazer convencionalmente.

5 Em outras concretizações, os bioensaios de fluxo lateral podem ser usados para analisar fluido cerebrospinal (CSF), por exemplo, para determinar se um paciente tem meningite. Geralmente, a diagnose de meningite inclui uma cultura de CSF, uma contagem de célula para determinar quantas células de sangue brancas estão no CSF, e medição dos níveis de proteína e glicose do CSF. Estes três fatores podem ser úteis na determinação da etiologia de meningite viral versus bacterial/parasítica/fungal. CSF é tipicamente não disponível em grandes quantidades (pouco mL), especialmente em crianças. Além disso, prioridade é dada aos requerimentos de cultura de CSF, deixando pouca ou nenhuma amostra para ensaios químicos (glicose, 10 proteína). Enquanto analisadores químicos convencionais podem realizar medições de glicose/proteína em espécimes de um pouco μ L, tais testes são onerosos, e são tipicamente indisponíveis em países não desenvolvidos. Em contraste, os dispositivos de fluxo lateral podem proporcionar não custosamente e rapidamente uma leitura semi-quantitativa de proteína e glicose de CSF. Por exemplo, uma aplicação para ambientes trópicos de fonte pobre pode permitir diferenciação de malária cerebral de meningite viral por classificação de níveis de proteína e glicose no CSF. Estes distúrbios requerem tratamentos drasticamente diferentes, e diferenciação correta pode poupar pacientes de medicações desnecessárias e seus efeitos colaterais não- 15 inconsequenciais.

 Em algumas concretizações, os dispositivos podem ser usados para análise de leite de peito, por exemplo, para determinar níveis de proteína, gordura, e glicose no leite de peito, que pode ajudar as mães que alimentam no peito a ajustar suas alimentações/bombeios para capturar calorias adequadas. Esta afirmação é particularmente importante para bebês que nascem prematuramente, onde nutrição é crítica para alcançar crescimento. 30

 Em outras concretizações, os dispositivos podem ser usados em

aplicações de projeto de tecido, por exemplo, na geração de “tecidos” pequenos de fígado, pâncreas, células de ilha, e outros órgãos exócrinos/endócrinos para a proposta de terapia de substituição. O monitoramento da saída destes números pequenos de células, por exemplo, medição de
5 saída de albumina de culturas pequenas de hepatócitos, pode ser difícil. Químicas catalíticas, tais como ELISA, podem ser incorporadas nos dispositivos de modo a produzir medições de espécimes relativamente pequenas. Ensaio tipo ELISA podem ser na forma de dispositivo de fluxo lateral ou de fluxo direto, onde anticorpos etiquetados de enzima, por exemplo, podem ser
10 depositados em uma região no dispositivo, e então solvatados pelo fluido biológico à medida que ele se dissolve através de um dispositivo. O anticorpo etiquetado pode se ligar a um antígeno na amostra, e este complexo se liga adicionalmente a um anticorpo que é fixado (covalentemente) ou aderido (não-covalentemente) ao substrato. Os substratos para a enzima fixados ao
15 anticorpo podem ser providos através de um canal separado no dispositivo, ou por adição manual de reagentes após o fluido biológico tiver passado através do dispositivo.

Em ainda outras concretizações, os dispositivos podem ser usados em oftalmologia, por exemplo, na análise de componentes no fluido vítreo (os conteúdos do olho), ou em películas de lágrima. Tais análises podem ser úteis na diagnose de uma variedade de condições (por exemplo, infecções, tumores, trauma, resposta a artrite reumatóide similar à inflamação sistêmica). Os fluidos do olho podem ser rapidamente analisados, por exemplo, para determinar os níveis de anticorpos e/ou citocinas.

25 Em outras concretizações, os dispositivos podem ser usados para medir componentes em fluido de lavagem bronqueoalveolar para diagnose, por exemplo, aspiração de refluxo gastroesofageal em conteúdos do estômago.

Em geral, os dispositivos são adequados para detectar marcadores bioquímicos de metabolismo, estresse, e doença em plantas, animais, e
30 humanos. Os dispositivos também podem ser usados para detectar a poluição e outros analitos na água e solo, e são adequados para detectar analitos

em outros fluidos similares: cosméticos, óleos, combustíveis, e outros.

Dispositivos de Bioensaio de Fluxo Direto

Enquanto algumas concretizações operam geralmente por fluxo lateral da amostra líquida no meio poroso em canais definidos pelas barreiras hidrofóbicas, em algumas concretizações a amostra escoar através de camadas múltiplas de meio hidrofílico, isto é, em uma configuração de “fluxo direto”. Nos dispositivos de fluxo direto, as barreiras hidrofóbicas contêm lateralmente o líquido à medida que ele escoar transversalmente de uma camada na outra. As camadas diferentes de meio poroso podem ser tratadas, ou deixadas não-tratadas, conforme apropriado para uma dada aplicação.

A figura 8A é uma ilustração esquemática, em vista perspectiva, de um dispositivo de fluxo direto 800 de acordo com algumas concretizações da invenção. O dispositivo inclui revestimentos protetores superior e inferior 810, 850, um filtro opcional 820, e meio poroso 830, 840. Os revestimentos protetores superior e inferior 810, 850 mantêm as outras camadas do dispositivo adjacentes uma à outra, proporciona o dispositivo com resistência e estabilidade adicionais, reduz evaporação a partir do dispositivo, e protege as outras camadas de contaminação externa. O revestimento protetor superior 810 inclui uma abertura 815 através da qual uma amostra líquida pode ser depositada nas camadas inferiores. As camadas protetoras superior e inferior podem ser, por exemplo, revestimentos de polímero. Um exemplo de um revestimento protetor útil é fita adesiva comercialmente disponível, que é pouco onerosa e que se ligará prontamente às superfícies de camadas que ela contacta. Laminados são também úteis.

O filtro 820, por exemplo, filtro de fibra de vidro, ou outro filtro comercialmente disponível, pode opcionalmente ser incluído quando é provável que filtração da amostra será necessária, por exemplo, se a presença de poeira ou outros contaminantes é esperada, ou se o dispositivo será usado com amostras de sangue totais e remoção de células de sangue vermelhas. O meio poroso 830, por exemplo, papel celulósico, inclui uma ou mais barreiras hidrofóbicas modeladas que definem regiões 835 em que reagentes podem ser marcados ou, de outro modo, aplicados. O meio poroso 840,

por exemplo, papel celulósico, do mesmo modo, inclui uma ou mais barreiras hidrofóbicas que definem regiões 845 em que outros reagentes podem ser marcados ou, de outro modo, aplicados. Em algumas concretizações, os reagentes nas regiões 835 reagem com um analito em uma amostra para
5 produzir um reagente intermediário. Estes reagentes intermediários passam com o excesso de fluido em regiões 845, onde eles reagem com um segundo conjunto de reagentes previamente absorvidos na região 845. Em algumas concretizações, esta segunda reação dá um produto colorido. A estrutura em camada inibe o contato entre reagentes nas regiões 835 e 845 até que
10 o analito esteja presente.

A figura 8B é uma ilustração esquemática, em vista perspectiva, de um dispositivo de fluxo direto 800' de acordo com algumas concretizações da invenção. O dispositivo é similar ao dispositivo mostrado na figura 8A, e inclui revestimentos protetores superior e inferior 810', 850', um filtro
15 opcional 820', e meio poroso 830', 840', que podem ser substancialmente os mesmos conforme aqueles descritos acima. O dispositivo 800' inclui adicionalmente um meio absorvente 860' que age como uma bomba para retirar líquido através das camadas 820', 830', e 840' do dispositivo. Em algumas concretizações, os reagentes nas regiões 835' são antígenos, que podem
20 ser usados para detectar anticorpos em uma amostra biológica. Em outras concretizações, os reagentes são anticorpos para detecção de antígenos; em concretizações adicionais, eles são ácidos nucleicos, aptâmeros, polímeros molecularmente impressos, ou outros receptores químicos formulados para se ligarem a antígenos, por exemplo, ácidos nucleicos, proteínas, mo-
25 léculas orgânicas pequenas, ou íons inorgânicos. Os reagentes na região 845' podem ser aderidos à camada 840', ou covalentemente (por exemplo, usando química descrita anteriormente), ou não-covalentemente (por exemplo, através de adsorção não-específica).

Um ensaio exemplar realizado usando-se o dispositivo 800' envolve adição de um fluido biológico ao filtro 820'; o fluido é distribuído no fil-
30 tro, e o excesso de fluido passa através do filtro, e é distribuído nas regiões de camada 830'. O excesso de fluido dissolve os reagentes, por exemplo,

anticorpos secundários etiquetados, que foram depositados na camada 830', e os transporta para a camada 840'. O analito no fluido, por exemplo, um anticorpo, se liga aos receptores fixados às regiões 845', e os reagentes etiquetados das regiões 835' se ligam ao analito. O excesso de fluido e reagentes são transportados na camada 860', que é hidrofílica e serve para coleta de excesso de fluido e reagentes. Opcionalmente, uma gota de água, tampão, ou outro fluido de lavagem, podem ser adicionados ao filtro 820' para lavar excesso de reagentes através do dispositivo na camada 860'; esta etapa de lavagem pode remover etiquetas não-especificamente ligadas, e reduzem sinal antecedente. Este dispositivo é adequado para, por exemplo, imunoenaios, dos quais um ensaio pode ser, mas não é limitado, a um ensaio de ELISA. Um ensaio ELISA exemplar incluiria um anticorpo secundário etiquetado por enzima, por exemplo, etiquetado com peroxidase de rábano silvestre, na região 835'. A adição de reagente, por exemplo, iodeto, à região 845', após completção de um ensaio, pode conduzir a amplificação do sinal para o ensaio, por exemplo, por peroxidase de rábano silvestre que catalisa a conversão de iodeto em iodo, dando uma cor marrom.

Nota-se que nem todas as camadas necessitam serem incluídas em todas as concretizações. Por exemplo, em algumas concretizações, somente uma camada simples de meio poroso, por exemplo, meio 830 na figura 8A, é necessária para realizar um bioensaio em uma amostra de interesse. Outras concretizações podem incluir mais ou camadas diferentes do que aquelas ilustradas nas figuras 8A e 8B. Também, dispositivos múltiplos podem ser providos em uma dada unidade (por exemplo, em uma peça simples de meio poroso) que podem permitir prontamente testes de diagnóstico múltiplos a serem operados em paralelo ou em sequência. Conforme descrito em maiores detalhes abaixo, cada um dos dispositivos pode por si ser multiplexado, permitindo, desse modo, muitos tipos diferentes de medições a serem realizadas imediatamente.

As figuras 9A e 9B ilustram vistas frontal e posterior, respectivamente, de um dispositivo de fluxo vertical exemplar 900, de acordo com algumas concretizações. Conforme pode ser visto na figura 9A, o dispositivo

inclui camada superior protetora 910, por exemplo, fita adesiva, filtro 920, e meio poroso 930, por exemplo, filtro de papel. A camada superior protetora 910 inclui uma abertura similar àquela mostrada na figura 8A, que proporciona uma área onde a amostra líquida pode ser depositada no filtro 920, por exemplo, filtro de fibra de vidro. A camada superior protetora 910 também opcionalmente inclui uma “projeção” que se prolonga além da borda do meio poroso 930, e permite fácil manuseio do dispositivo. O meio poroso 930 inclui uma barreira hidrofóbica que define regiões (não visíveis nesta imagem) através das quais a amostra pode escoar, sendo aplicada ao filtro 920.

10 A figura 9B mostra uma vista posterior do dispositivo 900. O dispositivo inclui camada inferior protetora 950 e regiões 935 para análise de amostra, que são definidas pela barreira hidrofóbica no meio poroso 930. Na concretização ilustrada, existem quatro regiões 935 que são cada uma tratada para proporcionar um ensaio diferente; contudo, em geral, outras formas e
15 números de regiões, e outras configurações, são possíveis. Em contraste aos dispositivos de fluxo lateral acima descritos, aqui as regiões de ensaio são separadas de uma outra pela barreira hidrofóbica. Contudo, algumas concretizações incluem regiões de ensaio que estão em comunicação fluidica uma com a outra. Tais concretizações podem operar como combinação
20 de dispositivos de fluxo lateral e de fluxo direto.

A figura 10 ilustra um procedimento exemplar para montagem do dispositivo de fluxo lateral das figuras 9A-9B. Primeiro, a camada de bioensaio e filtro são preparados 1010. Em um exemplo, a camada de bioensaio é um meio poroso tendo barreiras modeladas e ensaios marcados nas regiões
25 definidas pelas barreiras, por exemplo, conforme descrito acima, e o filtro é uma peça de 9 mm de diâmetro de papel de filtro de fibra de vidro (Whatman GF/C) preparada usando-se uma punção de furo. O filtro é alinhado sobre a camada de bioensaio 1020. A camada protetora, por exemplo, adesiva, é provida 1030. Em um exemplo, um furo de 7 mm de diâmetro é puncionado
30 na fita adesiva clara (por exemplo, fita Scotch)) (7 × 1,9 cm) ~7 mm de uma extremidade da fita. O filtro é então aderido à camada de bioensaio 1040 usando-se o adesivo. O adesivo é então dobrado uma série de vezes 1050

para segurar o filtro à camada de bioensaio, com o furo no adesivo colocado sobre o filtro de fibra de vidro, e o excesso de comprimento da fita envolvido ao redor da camada de bioensaio para vedar o dispositivo.

Em um exemplo, o dispositivo conforme fabricado é relativamente
5 te leve (cerca de 50 mg) e pequeno (cerca de $36 \times 18 \times 0,3$ mm), mas é grande bastante para ser manipulado pela mão. O dispositivo foi designado para realizar quatro ensaios que produzem indicadores de função do fígado, por tratamento das quatro regiões 935 com ensaios diferentes.

Uma primeira região 935 do dispositivo fabricado foi tratada para
10 detectar alanina aminotransferase (ALT) usando-se um método modificado a partir do procedimento reportado na Patente dos Estados Unidos No. 5.279.944, os conteúdos da qual sendo aqui incorporado por referência. O ensaio ocorre na formação de ácido pirúvico (catalisado por ALT) na presença de L-alanina e ácido alfa-cetoglutarico. O ácido pirúvico subsequentemente
15 reage com oxidase pirúvica para produzir peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio reage peroxidase de rábano silvestre na presença de 4-aminoantipiridina e sódio ácido dimetilaminobenzoico para dar o 4-N (1-imino-3-carboxi-5-N,N dimetiamino-1,2-cicloexandion) antipirina sal de sódio, o ensaio vira uma cor púrpura/vermelha quando ALT está presente.

20 Um ensaio de ALT no papel é preparado, em uma concretização exemplar, por marcação das seguintes soluções na cavidade de ensaio na ordem listada, seguido por 10 minutos de secagem entre cada solução: 1) 0,3 μ L de uma solução de trehalose 0,3 M em água de Millipore; 2) 0,3 μ L de solução contendo L-alanina (1 M), ácido α -cetoglutarico (30 mM), KH_2PO_4 (2
25 mM), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM), e tiamina pirofosfato (TPP) (2 mM) em 200 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,35); 3) 0,3 μ L de solução contendo 4-aminoantipiridina (2 mM) e sódio ácido dimetilaminobenzoico (10 mM) em 200 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,35); e 4) 0,3 μ L de solução contendo oxidase pirúvica (6 U/ml) e peroxidase de rábano silvestre (6 U/ml) em 200 mM
30 de tampão Tris-HCl (pH 7,35). As curvas de calibração para ALT foram preparadas por marcação de 0,5 μ L de soluções de ALT em 50 mM de tampão de fosfato de sódio (pH 8,0) contendo 150 mM de NaCl nas áreas de teste.

Uma segunda região 935 do dispositivo fabricado foi tratada para detectar níveis de proteínas em plasma usando-se um procedimento modificado a partir daquele reportado em *J. Clin. Lab. Anal.* 1999, 13, 180 e in *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 1318. Especificamente, 0,3 μL de 250-mM de solução tampão de citrato (pH 1,8) foi marcado na área de teste, seguido por 10 minutos de secagem, e então 0,3 μL de 4,5 mM de solução de tetrabromofenol azul (TBPB) em etanol foi adicionado; o papel foi secado novamente por 10 minutos. As curvas de calibração foram preparadas por marcação 0,5 μL de soluções de BSA (variando em concentração de 0,1-2 mM) em 50 mM de tampão de fosfato de sódio (pH 8,0) contendo 150 mM de NaCl nas áreas de teste.

Uma terceira região 935 do dispositivo fabricado foi tratada para detectar níveis de fosfatase alcalina (ALP) em plasma usando-se um ensaio modificado daquele descrito em "Rapid e Sensitive Colorimetric Method for Visualizing Biotin-Labeled DNA Probes Hybridized to DNA ou RNA Immobilized on Nitrocellulose: Bio-Blots," Leary, J. J.; Brigati, D. J.; Ward, D. C., *PNAS*, Vol. 80, No. 13, 1983, pp. 4045-4049, os conteúdos totais do qual sendo aqui incorporado por referência. Especificamente, 0,3 μL de 500 mM de tampão Tris (pH 9,5) foi marcado em uma área de teste de papel, a área permitida secar por 10 minutos, em seguida 0,3 μL de 2,5% de nitro azul tetrazolium em 70% de dimetilformamida foi marcado, seguido por 10 minutos de secagem, e 0,3 μL de 5% de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato em 100% de DMF. A área de teste foi permitida secar por 30 minutos. As curvas de calibração foram preparadas por marcação de 0,5 μL de soluções de fosfatase alcalina em 500 mM de tampão Tris (pH 9.5) nas áreas de teste.

Uma quarta região 935 do dispositivo fabricado foi tratada para detectar níveis de aspartato aminotransferase (AST) em plasma, usando-se um procedimento modificado daquele reportado na Patente dos Estados Unidos 5.834.226, os conteúdos da qual sendo aqui incorporado por referência. Especificamente, em seguida o dorso do substrato de teste foi coberto com fita para minimizar evaporação, 2,0 μL de 5% p/v de solução de trehalose em água de Millipore foi marcado nas áreas de teste. Após secagem

por 10 minutos, 2,0 μL de uma solução contendo ácido L-cisteinesulfínico 1,0 M e mono sódio 2-cetoglutarato 0,1 M em 200 mM de tampão TRIS (pH 8,0) contendo 0,0237 M de NaCl, e 4,5 mM de EDTA sal de disódio, foi marcado nas áreas de teste. Após secagem por outros 10 minutos, 2,0 μL de
5 uma solução de corante (contendo 0,25 g de polivinilálcool, 7,5 mg de metil verde, 7,5 mg de rhodamina B, 2,8 mg de ZnCl_2 em 25,0 mL de água deionizada) e 0,06% de Triton X-100 foi marcado nas áreas de teste. As curvas de calibração foram preparadas por marcação de 2,0 μL de soluções de aspartato aminotransferase (em concentrações variando de 0,05 U/mL a 2,50
10 U/mL) em 50 mM de tampão de fosfato de sódio (pH 8,0) contendo 150 mM de NaCl nas áreas de teste.

Em algumas concretizações, o dispositivo é exposto a uma gota de sangue que é obtida por perfuração de um dedo usando-se uma lanceta, onde o sangue é adicionado ao dispositivo por retenção do dispositivo entre
15 o dedo perfurado e o polegar (de modo que a gota de sangue é alinhada no filtro). O dispositivo é mantido sem pressão por cerca de 60 segundos, então espremido moderadamente por cerca de 10 segundos. Após cerca de 70 segundos, o dispositivo não mais necessita ser retido; os resultados dos ensaios, contudo, não são analisados até após 30 minutos. Os resultados dos
20 ensaios são observados pela retirada do invólucro protetor (isto é, a fita) a partir do papel modelado (este processo também remove o filtro de fibra de vidro). Os resultados dos ensaios podem ser visualizados qualitativamente por comparação com gráficos de cor, ou eles podem ser quantificados por digitalização e análise dos resultados, por exemplo, conforme descrito em
25 maiores detalhes acima.

Devido a qualquer modelo desejado poder ser definido no meio poroso, uma ampla faixa de aplicações além dos bioensaios pode ser considerada. Por exemplo, o meio poroso, por exemplo, papel, pode ser modelado em canais, e eletroforese subsequentemente realizada nas amostras naqueles canais por aplicação de um campo elétrico. Embora o uso de papel na eletroforese seja bem conhecido e compreendido, o comprimento da trajetória da amostra, e, desse modo, o grau de separação entre partículas car-

30

regadas na amostra, foram convencionalmente limitados ao comprimento do papel usado. Consequentemente, devido ao papel poder ser arbitrariamente modelado, os canais podem ser fabricados com um modelo em “zig-zag” ou outro, que aumenta o comprimento da trajetória do canal relativo ao comprimento do papel. Além disso, a modelagem permite que os canais sejam significativamente mais estreitos do que em eletroforese convencionalmente baseada em papel, de modo que tamanhos de amostra muito menores podem ser usados.

Em algumas concretizações, camadas de meio hidrofílico poroso modelado (por exemplo, papel) e camadas de material de isolamento (por exemplo, fita de lado duplo) são empilhadas em ordem alternada para produzir dispositivos microfluídicos tridimensionais. Os dispositivos microfluídicos tridimensionais podem dissolver fluidos lateralmente, dentro de uma camada de papel modelada, ou verticalmente, entre duas camadas de papel modelado. As camadas de material de isolamento asseguram que os fluidos em camadas diferentes de papel modelado não se misturem um com o outro. Aberturas podem ser providas nas camadas de material de isolamento sempre que os fluidos necessitam de escoar verticalmente entre as duas camadas de papel modelado. Os dispositivos microfluídicos tridimensionais podem capacitar dois canais diferentes de se cruzarem sem entrarem em contato físico direto; esta é uma característica que não é possível em dispositivo de fluxo lateral de camada simples. Três dispositivos tridimensionais são também úteis para distribuição de amostras em um grande número de cavidades em qualquer modelo desejado. Três dispositivos tridimensionais são úteis em aplicações onde um grande número de amostras são para serem processados e analisados, porque amostras podem escoar na direção vertical, e cada camada do dispositivo pode ser usada para processamento ou análise de amostra. Devido às camadas de papel e fita serem delgadas ($\sim 100\text{-}200\text{ }\mu\text{m}$ por camada), é possível empilhar várias camadas de papel e fita, sem mudar, significativamente, o tamanho do dispositivo.

A figura 18A ilustra esquematicamente uma vista em perspectiva de uma concretização de um dispositivo microfluídico tridimensional 1800,

que inclui duas camadas de papel modelado 1810 e 1830, e uma camada de material de isolamento 1820, por exemplo, fita de lado duplo, com aberturas. As três camadas 1810, 1820, 1830 são alinhadas e ligadas uma à outra. A Figura 18B mostra dispositivo da figura 18A dissolvendo corantes aquosos de duas cores diferentes (uma da qual parece mais clara do que a outra, na
 5 imagem de escala cinza). O dispositivo permite que os canais separados, através dos quais os corantes estão escoando, cruzem um com o outro sem qualquer mistura ocorrer entre os dois fluidos.

A figura 19 ilustra esquematicamente uma vista em perspectiva
 10 de outra concretização de um dispositivo microfluídico tridimensional 1900, que é um dispositivo de distribuição de amostra designado para distribuir duas amostras em dezesseis zonas de teste em um modelo particular. O dispositivo 1900 inclui quatro camadas de papel modelado 1910 e três camadas de material de isolamento 1920. A camada de topo 1911 do dispositi-
 15 vo inclui duas admissões para as duas amostras, e a camada de fundo 1914 do dispositivo inclui dezesseis zonas de teste. As camadas internas do dispositivo incluem uma pluralidade de canais que distribuem as amostras no plano horizontal. A figura 19 ilustra esquematicamente o fluxo de corantes aquosos de duas cores diferentes (uma da qual parece mais clara do que a
 20 outra a imagem de escala cinza), após aplicação dos líquidos às duas admissões na camada de topo 1911 do dispositivo, e permitindo que os corantes se desloquem através do dispositivo nas dezesseis zonas de testes na camada de fundo 1914. Com um arranjo apropriado de canais nas camadas internas do dispositivo, qualquer modelo de amostras nas zonas de teste
 25 pode ser obtido.

Métodos de Provisão de Barreiras Hidrofóbicas Modeladas em Meio Hidrofílico Poroso

Em algumas concretizações, conforme descrito em maiores detalhes abaixo, barreiras hidrofóbicas podem ser providas no meio hidrofílico
 30 poroso usando-se métodos de modelagem que requerem equipamento relativamente pequeno, podem ser realizadas mais próximo de qualquer laboratório, e são versáteis o bastante para produção de muitos tipos de modelos e

cópias múltiplas de cada modelo. Devido à facilidade relativa de fabricação e a pronta biodisponibilidade de componentes pouco onerosos, os dispositivos de bioensaio podem ser formados com custo significativamente mais baixo do que dispositivos convencionais, tais como sondas, e, desse modo, podem
5 ser úteis, entre outras coisas, para detecção de doença em localizações remotas, onde os recursos são limitados, e onde o custo e portabilidade dos dispositivos são úteis.

Conforme notado acima, de modo a fabricar canais microfluídicos no meio hidrofílico poroso, tal como, mas não limitado a, o polímero hidrofílico modelado geralmente se prolonga substancialmente através da espessura total do papel de modo a confinar o líquido dentro de áreas desejadas. Esta restrição limita os métodos que podem ser usados na prática de papel de modelagem. Por exemplo, métodos de impressão usando tintas padrões não podem ser adequadas para produção de canais em papel devido às tintas atualmente disponíveis serem designadas para aderirem à superfície de papel, não para absorverem no papel. Contudo, pode ser considerado que certas tintas podem ser designadas de modo a absorver substancialmente através da espessura de papel.
10
15

A composição do meio poroso, por exemplo, papel, pode também limitar os métodos de modelagem que podem ser usados na prática. Por exemplo, papel tipicamente inclui fibras intergeminadas que são orientadas nos eixos x- e y- de uma folha de papel, e que são empilhadas no topo de uma outra na direção z. O resultado deste arranjo é a difusão aumentada de líquidos no plano x-, y-, comparado à direção z-, que conduz a manchamento das características que foram modeladas. Escolhas apropriadas de monômeros, polímeros e solventes podem ser feitas para superar estas propriedades de papel, e capacitam a modelagem de características distintas que passam através da espessura total de papel.
20
25

Alguns métodos úteis para modelagem de papel são baseados na fotolitografia, e podem ser implementados, ou em um ambiente limpo, ou em um laboratório. A fotolitografia de ambiente limpo opera bem para produção de modelos altamente definidos em papel, mas é relativamente oneroso
30

e lento, possivelmente tornando sua viabilidade comercial um tanto limitada. Outros métodos, tais como fotolitografia de laboratório e litografia suave (também denominada impressão de microcontato), eliminam a necessidade de um ambiente limpo, e têm requerimentos somente modestos para equipamento e perito na parte do fabricante, enquanto ainda produz dispositivos de alta qualidade. A fotolitografia de laboratório é útil para produção de modelos, com canais bem resolvidos e tamanhos característicos pequenos. A litografia suave é tipicamente menos onerosa do que os métodos baseados em fotolitográficos, e é útil para produção de cópias múltiplas do mesmo modelo relativamente rapidamente.

Para algumas aplicações, os tamanhos característicos nos dispositivos microfluídicos em papel são relativamente grandes (por exemplo, com canais de cerca de 1-2 mm de largura), de modo que uma resolução inferior, mas técnica de estampagem mais rápida, serão suficientes. Para outras aplicações, características microdimensionadas serão usadas e, desse modo, um método pouco oneroso, mas de resolução mais alta, será útil. Para muitas aplicações, os dispositivos terão características com tamanhos menores do que 1,5 mm. Deve ser reconhecido, contudo, que uma ampla variedade de formas e tamanhos de canal pode ser formada usando-se os sistemas e métodos aqui descritos. Em ambos os tipos de aplicações, é desejável que o método de modelagem seja pouco oneroso, tenha alta produção, e não requeira um usuário altamente tecnicamente perito para manufaturar.

A discussão abaixo descreve três métodos para modelagem de papel (litografia de ambiente limpo, litografia de bancada superior, e estampagem), de acordo com algumas concretizações da invenção, e compara a qualidade de modelos produzidos usando-se cada método com o custo de produzi-los. Estas comparações são feitas para várias características que podem ser úteis em dispositivos microfluídicos em papel, por exemplo, curvas, ângulos retos, junções-T, e canais verticais. As larguras destas características são também variadas, ambas para os canais hidrofílicos, e para as barreiras hidrofóbicas. A resolução e uniformidade destas características são

comparadas, bem como a capacidade dos modelos controlarem o espalhamento de água em papel. Os vários exemplos são pretendidos para serem ilustrativos de alguns tipos de características que podem ser produzidas usando-se alguns métodos, e não são para serem construídos como limitando a invenção.

Em algumas concretizações, modelos hidrofóbicos são gerados usando-se fotolitografia de ambiente limpo. A figura 11 ilustra esquematicamente etapas em um método exemplar de papel cromatográfico de modelagem fotolitograficamente com fotorrevestimento protetor para criar barreiras hidrofóbicas dentro do papel.

Na concretização ilustrada na figura 11, primeiro um meio hidrofílico poroso, tal como papel de cromatografia (por exemplo, cerca de 7,5 cm de diâmetro e cerca de 100 μ m de espessura) é provido 1110. O papel é selecionado para ter uma espessura e resistência suficientes para suportar as etapas litográficas, e também para ser compatível com o uso pretendido subsequente.

Em seguida, o papel é encharcado em fotorrevestimento protetor e pré-cozido 1120. Em um exemplo, o papel é encharcado em cerca de 2 mL de fotorrevestimento protetor SU-8 2010 para uma quantidade de tempo suficiente para o fotorrevestimento protetor encharcar através do papel, por exemplo, 30 segundos a 1 minuto. Em algumas concretizações, o fotorrevestimento protetor substancialmente permeia ou impregna o papel, de modo que quando definidas porções do fotorrevestimento protetor, são mais tarde removidas, as partes que permanecem dentro e no papel formam uma barreira substancialmente impermeável a fluxo de fluido lateral. Outros materiais fotoativos que são compatíveis com fotolitografia, tais como fotopolímeros, podem também serem usados, considerando-se que o material pode ser removido para definir um modelo, sem danificar o papel. O papel encharcado com fotorrevestimento protetor é então opcionalmente girado, por exemplo, a 2000 rpm por 30 segundos, para remover excesso de fotorrevestimento protetor. O excesso de fotorrevestimento protetor pode ser removido em outros modos, por exemplo, por raspagem ou prensagem. Em seguida, o papel é

cozido, por exemplo, a 95 °C por 5 minutos, ou seco com ar, por exemplo, para remover ciclopentanona na fórmula SU-8.

Em seguida, o papel encharcado por fotorrevestimento protetor é alinhado sob uma fotomáscara, e exposto a luz UV a um comprimento de onda selecionado para fazer com que o fotorrevestimento protetor reaja apropriadamente 1130. Em um exemplo, uma fotomáscara obtida de CAD/Art Services, Inc., é alinhada usando-se um alinhador de máscara (OL-2 Mask Aligner, AB-M, Inc), e o papel exposto a ~405 nm de luz UV (50 mW/cm²) através da máscara por cerca de 10 segundos. Em outro exemplo, a fotomáscara é impressa diretamente nas transparências usando-se uma impressora de jato de tinta.

Em seguida, o papel exposto é cozido 1140, por exemplo, a 95°C por 5 minutos, para reticular ou, de outro modo, tratar apropriadamente o fotorrevestimento protetor.

Em seguida, o fotorrevestimento protetor é desenvolvido, e a montagem resultante é opcionalmente oxidada por plasma 1150. Em um exemplo, o fotorrevestimento protetor não-polimerizado é removido pelo encharcamento do papel exposto e pós-cozido em propileno glicol monometil éter acetato (PGMEA) (5 min), e por lavagem do modelo com 2-propanol (3 × 10 mL). O processo de desenvolvimento deixa barreiras hidrofóbicas formadas de fotorrevestimento protetor no papel (ou outro meio poroso). Em algumas circunstâncias, seguindo o processo fotolitográfico, o papel tem uma hidrofobicidade mais alta do que antes do processamento, possivelmente devido ao revestimento protetor ligado ao papel. Se apropriado para alcançar um nível satisfatório de hidrofiliabilidade no papel para a aplicação pretendida, a superfície total do papel pode opcionalmente ser exposta a um plasma de oxigênio, ou outro tratamento apropriado para ajustar a hidrofiliabilidade. Em um exemplo, o papel modelado é exposto a um plasma de oxigênio por 10 segundos a 600 torr (SPI Plasma-Prep II, Structure Probe, Inc).

Em concretizações onde a hidrofiliabilidade do papel é suficiente para a proposta pretendida após remoção do fotorrevestimento protetor, esta etapa não necessita ser realizada. Em algumas concretizações, o fotorrevestimen-

to protetor e processamento deste são selecionados para reduzir ou eliminar a mudança na hidrofiliidade do papel.

O papel modelado resultante pode então ser cortado a partir do wafer para formar um dispositivo de bioensaio individual 1160, e derivatizado ou, de outro modo, modificado, para o uso em ensaios diagnósticos por mar-
5 cação de reagentes e secagem 1170, conforme descrito em maiores detalhes acima.

A máscara através da qual o fotorrevestimento protetor é exposto é modelada apropriadamente para a aplicação desejada do dispositivo de
10 bioensaio acabado. Em algumas concretizações, a máscara é modelada para definir canais hidrofóbicos tendo, por exemplo, aproximadamente 1 mm de largura, e/ou para definir regiões de ensaio, por exemplo, entre 1-10 regiões de ensaio ou mais, conforme desejado. Em concretizações onde o dispositivo é para ser usado em aplicações de microsérie, o dispositivo pode
15 incluir mais do que 50, mais do que uma centena, ou ainda várias centenas de regiões de ensaio. Em concretizações incluindo ambos regiões de ensaio e canais, as regiões de ensaio podem ser coextensivas com o canal, ou podem ramificarem-se do mesmo. As regiões modeladas podem ter formas diferentes para proporcionar informação ao usuário com relação ao tipo de
20 ensaio, conforme apropriado. Em geral, devido ao papel ou outro meio hidrofílico poroso que ocupa o canal ser capaz de transportar fluido através dos canais por ação capilar, os canais não necessitam ter um tamanho ou forma particular que é por si capaz de induzir ação capilar. Quanto menor os canais, contudo, menos amostra será necessária de modo a produzir uma me-
25 dição satisfatória.

Usando-se os métodos fotolitográficos aqui descritos, larguras de canal de 100 μm foram alcançadas. Enquanto o tamanho da característica menor é teoricamente limitado pela resolução fotolitográfica, alguns parâmetros experimentais limitam o tamanho das características que podem
30 praticamente ser formados neste método. Por exemplo, devido ao papel ser opaco e relativamente espesso, ele tipicamente requer um tempo de exposição relativamente longo para expor o fotorrevestimento protetor de todo mo-

do através do papel, que reduz a resolução litográfica um tanto. Não obstante, tamanhos de característica menores do que 100 μm devem ser prontamente alcançáveis, e características muito menores (por exemplo, 100 nm) são teoricamente possíveis.

5 Procedimentos para provisão de barreiras hidrofóbicas no meio hidrofílico poroso usando-se “bancada superior” ou fotolitografia de “laboratório” usam muitos dos mesmos princípios como a fotolitografia de ambiente limpo descrita acima, mas são geralmente menos onerosos e mais simples de realizar.

10 A figura 12 ilustra um processo exemplar para provisão de barreiras hidrofóbicas no meio hidrofílico poroso de acordo com algumas concretizações. Primeiro, um meio hidrofílico poroso é provido 1210. Enquanto o papel é selecionado para ter uma espessura e resistência suficientes para suportar as etapas litográficas, e também para ser compatível com o uso
15 subsequente pretendido, de modo a reduzir custos, em um exemplo, uma peça de 10 cm x 10 cm de toalha de papel é usada como o meio hidrofílico.

 Em seguida, o papel é encharcado no fotorrevestimento protetor e secado 1220. Em um exemplo, 1 mL de fotorrevestimento protetor SC é espalhado sobre a toalha de papel usando-se o lado de um tubo de teste de
20 vidro para obter um revestimento aproximadamente constante do revestimento protetor através da espessura da toalha de papel. O excesso de revestimento protetor é removido, por exemplo, por manchamento com uma toalha de papel, e o papel encharcado com fotorrevestimento protetor em seguida secado a ar a 25°C por 10 minutos. As opções para fotorrevestimen-
25 to protetor são geralmente os mesmos conforme descrito com referência a figura 11. Fotorrevestimento protetor SC é tipicamente menos oneroso do que muitos outros tipos de fotorrevestimento protetor comercialmente disponível, e, desse modo, pode ser útil em aplicações de custo sensível. Fotorrevestimento protetores feitos em casa são adequados também.

30 Em seguida, o papel encharcado com fotorrevestimento protetor é alinhado sob uma fotomáscara e exposto a luz UV a um comprimento de onda selecionado para fazer com que o fotorrevestimento protetor reaja a-

propriadamente 1230. Em um processo exemplar, as máscaras para litografia de bancada superior são produzidas por impressão das mesmas em folhas de transparência usando-se uma impressora de jato de tinta de desktop (HP Photosmart C3100). Neste exemplo, o papel é exposto a luz UV de uma
5 lâmpada de UV de onda longa, B 100 AP, UVP, $\sim 20 \text{ mW/cm}^2$, mantida 12 cm acima do papel, por cerca de 3,5 minutos através de uma fotomáscara que é mantida no lugar na parte superior do papel por prendimento da máscara e papel entre duas peças de vidro. Outra fonte pouco onerosa de luz UV é uma lâmpada de apagamento de chip UV EPROM (memória de apenas
10 leitura programável apagável).

Em seguida, o fotorrevestimento protetor é desenvolvido 1240. Em um exemplo, fotorrevestimento protetor não-polimerizado removido por encharcamento do papel em xileno (3 min), e diclorometano ($3 \times 3 \text{ min}$). O processo de desenvolvimento deixa as barreiras hidrofóbicas formadas de
15 fotorrevestimento protetor no papel (ou outro meio poroso). Como na concretização da figura 12, o papel pode ser opcionalmente tratado com um plasma de oxigênio para ajustar sua hidrofiliicidade, por exemplo, por exposição do papel a um plasma de oxigênio por 10 segundos a 600 torr (SPI Plasma-Prep II, Structure Probe, Inc).

20 O papel modelado resultante pode então ser cortado e derivatizado, conforme descrito em maiores detalhe acima.

Em outras concretizações, barreiras hidrofóbicas são providas em litografia suave/impressão de microcontato/estampagem de meio hidrofílico poroso. A figura 13 ilustra um método exemplar para uso de litografia
25 suave para proporcionar barreiras hidrofóbicas. Primeiro, uma matriz é provida 1310. Em um exemplo, matrizes são produzidas de plástico (microplaca de cavidade Costar 384, Corning), e, em outro exemplo, matrizes de borracha foram fabricadas como de costume por Rubber Stamps Net, tendo um custo de cerca de \$25 por uma matriz de 3×3 polegadas, e são limitadas às
30 características de cerca de 0,35 mm de largura. É contemplado que outros tamanhos característicos mínimos são possíveis, e são limitados pela técnica de manufaturamento e material usados.

Em seguida, a matriz é “borrada”, por exemplo, por pintura de um polímero hidrofóbico na matriz 1320. Em um exemplo, poli(dimetilsiloxano) (PDMS) (sylgard 184, 10:1 de base de elastômero:agente de cura, curado por 3 horas a temperatura ambiente), foi espalhado em uma
5 camada delgada sobre as características de um modelo usando uma escova de tinta plana de bolha branca #4.

Em seguida, a matriz borrada com polímero foi pressionada no meio hidrofílico poroso 1330. Em um exemplo, uma matriz revestida com PDMS foi colocada em contato com uma peça de 10 × 10 cm de papel
10 Whatman No. 1 filtro de papel, prensada suavemente pela mão por aproximadamente 20 segundos, e a matriz então removida.

O polímero é então subsequentemente tratado, por exemplo, curado 1340. Continuando o exemplo acima, o PDMS no papel foi curado por 8 horas à temperatura ambiente antes do uso.

15 As dimensões das características modeladas formadas usando-se os procedimentos exemplares acima descritos para litografia de ambiente limpo, litografia de laboratório/bancada superior, e litografia suave foram quantificadas por formação de imagem dos modelos usando-se uma câmera digital Nikon DXM1200 fixada a um estereomicroscópio (Leica MZ12), ampli-
20 ando-se as imagens em Microsoft Powerpoint, imprimindo-se as imagens, e medindo-se as características usando uma régua. As figuras 14A e 14B são imagens de características formadas usando-se litografia de ambiente limpo e litografia de laboratório, respectivamente. A Tabela 3 resume as medições feitas a partir das imagens; os valores reportados na Tabela 3 são calibrados
25 para ampliação, e representam dimensões reais; eles também são a média de 3 réplicas do mesmo medido 10 vezes em posições distribuídas através de todo modelo total.

Tabela 3. Fidelidade de transferência para dois métodos exemplares de mo-
delagem de papel. Em todos os casos, os canais hidrofílicos e as paredes
30 hidrofóbicas foram designados para serem 1 mm.

		Largura de Papel Hi- drofílico (mm)		Largura de Polímero Hidrofóbico (mm)	
Método	Arc	Canal Ver- tical	Ângulo de 90°	Canal Verti- cal	
Fotolitografia (ambien- te limpo)	1,01±0,02	1,03±0,02	1,03±0,02		0,95±0,01
Fotolitografia (banca- da superior)	0,95±0,03	0,99±0,03	0,99±0,03		1,02±0,03

O procedimento exemplar para modelagem de barreiras hidrofóbicas com litografia de ambiente limpo acima descrito com relação a figura 11 gera características relativamente bem definidas que, em algumas concretizações, pode ser feita menores do que cerca de 150 μm em largura para o canal hidrofílico (experimental: $158 \pm 13 \mu\text{m}$), e cerca de 300 μm em largura para paredes hidrofóbicas (experimental: $297 \pm 27 \mu\text{m}$), conforme mostrado na figura 16A. Em geral, as paredes hidrofóbicas podem ser produzidas ainda menores do que cerca de 150 μm , contudo, paredes mais delgadas são menos eficientes na limitação da difusão de água fora dos canais hidrofílicos do que paredes mais espessas.

Embora a fotolitografia de ambiente limpo gere características de alta qualidade, ela é um tanto menos eficiente do que litografia de bancada superior e estampagem de bancada superior, em termos de produção, despesa e o número de etapas requeridas para produzir um modelo. Por exemplo, em um processo exemplar, litografia de ambiente limpo usa cerca de 0,5 g de fotorrevestimento protetor SU-8 2010 para produzir uma grade de 5×5 cm de $3,6 \times 3,6$ mm quadrados em uma peça de filtro de papel de 7,5 cm (mostrada na figura 15A); esta quantidade de fotorrevestimento protetor sozinha custa ~\$0.26. O processo de fabricação exemplar usado para produzir a grade mostrada na figura 15A requer nove etapas antes do dispositivo estar completo e pronto para uso.

A fotolitografia no ambiente limpo também tem uma limitação prática, em que o equipamento é tipicamente designado para um tamanho máximo particular de substrato. Por exemplo, o equipamento usado durante o processo exemplar não pode ser usado para modelar peças circulares de
 5 papel maiores do que 7,5 cm de diâmetro porque o alinhador de máscara não pode acomodar substratos maiores. Alinhadores de máscara maiores permitiriam que substratos maiores fossem modelados.

A litografia de bancada superior tem uma fidelidade comparável a litografia de ambiente para transferência de características de uma máscara a uma peça de papel quando as características são em milímetros de tamanho. Por exemplo, conforme mostrado na Tabela 3, uma máscara com
 10 canais hidrofílicos e paredes hidrofóbicas de 1 mm dá modelos em papel que são $0,99 \pm 0,03$ mm de largura para os canais, e $1,02 \pm 0,03$ mm de largura para as paredes.

A litografia de bancada superior, contudo, pode ser um tanto menos consistente do que a litografia de ambiente limpo na provisão de características de tamanho igual através de todo um modelo. Por exemplo, em algumas concretizações, a largura de linha tem 50% de variação mais alta para litografia de bancada superior do que a litografia de ambiente limpo. A
 15 litografia de bancada superior pode também ser menos eficiente do que a litografia de ambiente limpo na produção de modelos com larguras de linha relativamente estreitas. Por exemplo, usando-se os processos exemplares acima descritos, as características mais estreitas produzidas que não vazaram usando-se litografia de bancada superior foram cerca de 100 μ m em
 20 largura (valor experimental 106 ± 23 μ m) (para o canal hidrofílico), e cerca de 150 μ m em largura (valor experimental 245 ± 31 μ m) (para as paredes hidrofóbicas), conforme mostrado na figura 16B.

A litografia de bancada superior, contudo, é significativamente menos oneroso e produção mais alta do que a litografia de ambiente limpo.
 30 Em um processo exemplar usando-se litografia de bancada superior, 0,5 g de fotorrevestimento protetor SC foi usado para produzir uma grade de 10,7 $\times$ 7,2 cm de 3,6 $\times$ 3,6 mm quadrados (figura 15B), que custa ~\$0.05 (\$0,21

menos do que com a litografia de ambiente limpo).

O mesmo revestimento protetor pode ser usado no processo também, de modo que uma característica útil do método de bancada superior não está no custo do revestimento protetor, mas no custo do equipamento, e na produção para o processo. Por exemplo, em alguns processos exemplares, a produção da mesma grade de 5×5 cm na bancada superior requer 6 etapas (3 menos do que o processo de ambiente limpo), e pode ser efetuada ~10 minutos mais rápida do que o tempo requerido para produzir a grade no ambiente limpo.

Em algumas concretizações, o método de estampagem é um método mais fácil e mais econômico de modelagem de papel do que a fotolitografia de ambiente limpo e de bancada superior, mas pode produzir modelos de qualidade um tanto inferior. A qualidade da própria matriz, em adição ao processo de transferência, pode afetar a qualidade do modelo resultante. Enquanto os processos exemplares descritos acima usem matrizes comercialmente vendidas, as matrizes podem também serem produzidas no laboratório, por exemplo, usando-se poli(dimetilsiloxano) (PDMS) por moldagem de réplica de um perito (produzido por fotolitografia), usando-se técnicas conhecidas na técnica.

Em algumas concretizações, o método de estampagem é significativamente menos oneroso do que os métodos fotolitográficos. Em um processo exemplar, uma grade de $10,7 \times 7,2$ cm de $3,6 \times 3,6$ mm quadrados (Figura 15C) pode ser produzida em cerca de 120 segundos usando-se somente 0,1 g de PDMS (que custa ~\$0,01, e é \$0,25 e \$0,04 menos oneroso do que os polímeros usados para produzir o mesmo modelo por métodos exemplares de bancada superior ou de ambiente limpo, respectivamente).

As concretizações do método de estampagem também permitem uma ampla variedade de materiais. A técnica foi demonstrada para gerar modelos, por exemplo, usando-se PDMS, cera de parafina (p.f. 58-60°C), e adesivo ótico Norland (NOA), um adesivo baseado em uretano que pode ser curado com luz UV (Norland Products, Inc.).

A Tabela 4 inclui informação comparando os custos estimados

para modelar meio hidrofílico poroso com barreiras hidrofóbicas, de acordo com várias concretizações exemplares. O custo dos métodos de resolução relativamente altos (fotolitografia de ambiente limpo e fotolitografia de bancada superior) pode ser reduzido, por exemplo, pelo uso de fotorrevestimento protetor negativo relativamente pouco oneroso (por exemplo, fotorrevestimento protetor SC, Arch Chemicals, Inc.), por máscaras de impressão usando uma impressora de jato de tinta (por exemplo, ao invés de comprá-los de um serviço de impressão), e/ou exposição do fotorrevestimento protetor usando uma lâmpada de mercúrio padrão de 100 W (por exemplo, uma lâmpada de UV de onda longa de Raio-Negro B100 AP, aproximadamente \$514). Para produzir cópias múltiplas de um modelo simples com características de resolução relativamente baixa (amplas), matrizes (borracha ou plástico) podem ser usadas, que podem ser compradas de fornecedores em quase qualquer desenho desejado (as matrizes de borracha custam ~\$25).

Em algumas concretizações, poli(dimetilsiloxano) (PDMS) é usado como o polímero hidrofóbico. Vários meios porosos são também comparados, por exemplo, toalhas de papel de rolo rígido Kimberly-Clark e filtro de papel Whatman No. 1, embora resultados similares, do mesmo modo, serão obtidos com outros papéis também. Toalhas de papel de Kimberly-Clark são uma fonte relativamente pouco onerosa de papel disponível do que dissolve cavidades de fluido.

Table 4. Comparação do equipamento necessário e despesas incorridas para três métodos exemplares de modelagem de meio poroso com barreiras hidrofóbicas

Método	Componentes ^a	Peças de Equipamento	Tempo Requerido para produzir 1 Réplica (min)	Custo de Polímero para uma Réplica ^d
	1. wafer de silicone			
	2. Fotorreves-			

	timento protetor SU-8 2010			
Fotolitografia (ambiente limpo)	3. revestidor de rotação	5	~40 ^b	\$0,26
	4. placa quente			
	5. alinhador de máscara			
	6. lâmpada de mercúrio de 1000 W			
	1. Fotorrevestimento protetor SC			
Fotolitografia (bancada superior)	2. placa quente	3	~30 ^c	\$0,50
	3. lâmpada de mercúrio de 100W			
Estampagem	1. matriz	1	~2 ^d	\$0,01
	2. PDMS			

^aTodos os métodos usam toalha de papel de rolo rígido de Kimberly-Clark ou filtro de papel Whatman No. 1.

^bLeva um adicional de 10 minutos para produzir uma segunda réplica.

^cLeva um adicional de aproximadamente 8 minutos para produzir uma segunda réplica.

^dEste tempo estimado não inclui o tempo requerido para os modelos secarem.

^eEste custo estimado é somente o custo do polímero (fotorrevestimento protetor ou PDMS); ele não inclui o custo do papel, o solvente, ou o uso de ele-

tricidade.

Outros métodos podem também serem usados para formar barreiras hidrofóbicas no meio hidrofílico poroso. Por exemplo, líquidos podem ser aplicados ao meio de acordo com um modelo. O líquido pode por si ser

5 hidrofóbico, ou pode ser capaz de mudar para um sólido hidrofóbico após secagem, ou após outro tratamento. Por exemplo, o líquido pode ser uma solução à prova d'água comercialmente disponível, que é hidrofílica e, desse modo, molhará o papel, mas forma um sólido hidrofóbico após secagem, ou o líquido pode ser um monômero, que, após polimerização, forma um sólido

10 hidrofóbico.

O líquido pode ser aplicado de acordo com um modelo em muitos modos diferentes. Por exemplo, o líquido pode ser pulverizado, por exemplo, escovado a ar, ou, de outro modo, depositado através de um estêncil. Ou, por exemplo, o líquido pode ser depositado usando-se técnicas de

15 "silk screening" bem conhecidas. Alternativamente, uma peça litograficamente modelada de papel pode ser usada como uma "matriz" para outra peça de papel. Por exemplo, a peça modelada de papel pode ser litograficamente modelada, por exemplo, conforme descrito acima, para criar regiões hidrofóbicas e hidrofílicas. O papel modelado pode então ser encharcado com um

20 líquido de modo que somente partes designadas do papel, tipicamente as partes hidrofílicas, são molhadas pela solução. O papel modelado e encharcado é então posto em contato com outra peça de papel (não-modelada), que o líquido encharca, transferindo, desse modo, o modelo. Impressão de jato de tinta é outro método que pode ser usado para depositar líquido no

25 papel de acordo com um modelo. Alternativamente, um traçador gráfico pode ser usado para "desenhar" um modelo no papel. Uma característica comum das concretizações acima descritas é a necessidade de depositar líquido suficiente no papel para substancialmente permeá-lo, para criar uma barreira a fluxo de fluido lateral através da região modelada.

30 Um fator que pode limitar o tamanho de resolução quando se aplica um líquido ao papel, de acordo com um modelo, é que o líquido pode também escoar lateralmente a medida que ele encharca através da espes-

sura do papel, manchando, desse modo, as bordas da característica pretendida. Este problema pode ser aliviado um tanto pela aplicação de um vácuo à superfície de fundo do papel que pode acelerar o transporte do líquido através da espessura do papel, limitando, desse modo, a quantidade de tempo que o líquido pode lateralmente espalhar.

Cera é uma alternativa pouco onerosa, prontamente disponível, ao fotorrevestimento protetor, que pode ser potencialmente usada para formar canais hidrofóbicos dentro do papel cromatográfico. Por exemplo, cera de papel de cera pode ser transferida para o papel cromatográfico de acordo com um modelo. Em algumas concretizações, isto é feito por intercalamento do papel a ser modelado entre duas peças de papel de cera, e o modelo desejado “escrito” no papel de cera usando-se um instrumento aquecido. Este processo transfere uma pequena quantidade de cera a partir das duas peças de papel de cera em ambos os lados do papel. O papel pode então ser aquecido em uma placa quente para fundir a cera através da espessura do papel, criando uma barreira hidrofóbica. Ou, por exemplo, um fio encharcado em cera pode ser esticado através do papel cromatográfico de acordo com um modelo, e a cera subsequentemente fundida de modo que ela satura localmente o papel.

Será apreciado que o escopo da presente invenção não é limitado às concretizações acima descritas, e que a invenção envolve modificações e aperfeiçoamentos ao o que foi descrito. Outras concretizações estão dentro do escopo das reivindicações que se seguem.

REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivo de ensaio, compreendendo:
um meio hidrofílico poroso;
uma barreira impenetrável por fluido compreendendo fotorreves-
5 timento protetor polimerizado, a barreira permeando substancialmente a es-
pessura do meio hidrofílico poroso, e definindo um limite de uma região de
ensaio no interior do meio hidrofílico poroso; e
um reagente de ensaio na região de ensaio.
2. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 1, em
10 que a barreira adicionalmente define um limite de uma região de canal no
interior do meio hidrofílico poroso, a região de canal fluidamente ligada à
região de ensaio.
3. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 2, em
que a barreira adicionalmente define um limite de uma região de deposição
15 de amostra no interior do meio hidrofílico poroso, o canal proporcionando
uma trajetória fluida no interior do meio hidrofílico poroso entre a região de
deposição de amostra e a região de ensaio.
4. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 1, em
que a barreira adicionalmente define limites de uma pluralidade de regiões
20 de ensaio.
5. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 4, em
que a barreira adicionalmente define limites de uma pluralidade de regiões
de canal no interior do meio hidrofílico poroso, e adicionalmente define um
limite de uma região de deposição de amostra, cada canal proporcionando
25 uma trajetória fluida no interior do meio hidrofílico poroso entre a região de
deposição de amostra, e uma região de ensaio correspondente da pluralida-
de de regiões de ensaio.
6. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 4, com-
preendendo adicionalmente reagentes de ensaio em pelo menos algumas
30 das regiões de ensaio.
7. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 4, em
que a barreira separa fisicamente as regiões de ensaio da pluralidade de

regiões de ensaio de uma outra.

8. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 1, em que o reagente de ensaio é covalentemente ligado ao meio hidrofílico poroso na região de ensaio.

5 9. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 1, em que o reagente de ensaio é não-covalentemente ligado ao meio hidrofílico poroso na região de ensaio.

10 10. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 1, em que o reagente de ensaio é selecionado para proporcionar uma indicação visível da presença de analito.

11. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 1, em que o reagente de ensaio é selecionado para reagir à presença de pelo menos um de glicose, proteína, gordura, fator de crescimento endotelial vascular, fator 1 de crescimento similar à insulina, anticorpos, e citoquinas.

15 12. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 1, em que o fotorrevestimento protetor compreende fotorrevestimento protetor negativo.

20 13. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 1, em que o meio hidrofílico poroso compreende um de acetato de nitrocelulose, acetato de celulose, papel celulósico, papel de filtro, papel de tecido, papel de escrita, toalha de papel, tecido, e película de polímero porosa.

14. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 1, em que o meio hidrofílico poroso é flexível.

25 15. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 1, em que a barreira tem pelo menos uma dimensão entre cerca de 5 cm e cerca de 100 μm .

16. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 1, em que a barreira tem pelo menos uma dimensão entre cerca de 300 μm e cerca de 100 μm .

30 17. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 1, em que a barreira tem pelo menos uma dimensão menor do que cerca de 300 μm .

18. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 2, em que o canal tem pelo menos uma dimensão lateral que está entre cerca de 750 μm e cerca de 100 μm .
- 5 19. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 2, em que o canal tem pelo menos uma dimensão lateral que está entre cerca de 250 μm e cerca de 100 μm .
20. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 2, em que o canal tem pelo menos uma dimensão lateral que é menor do que cerca de 250 μm .
- 10 21. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 1, compreendendo adicionalmente um dispositivo de imagem capaz de obter uma imagem digital da região de ensaio.
22. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 21, compreendendo adicionalmente um processador em comunicação com o
- 15 dispositivo de imagem, e capaz de obter informação sobre um analito na região de ensaio baseada na imagem digital da região de ensaio.
23. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 22, em que o processador é capaz de obter a informação sobre o analito baseada em uma intensidade na imagem digital da região de ensaio.
- 20 24. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 1, compreendendo adicionalmente uma camada sobre o meio hidrofílico poroso, a camada incluindo pelo menos uma abertura.
- 25 25. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 24, em que a abertura proporciona pelo menos parte de uma trajetória fluida para a região de ensaio.
26. Dispositivo de ensaio, compreendendo:
- um meio hidrofílico poroso;
- uma barreira impenetrável por fluido permeando substancialmente a espessura do meio hidrofílico poroso, e tendo uma largura entre
- 30 cerca de 1 mm e cerca de 100 μm , a barreira definindo completamente um limite de uma região de ensaio no interior do meio hidrofílico poroso; e
- um reagente de ensaio na região de ensaio.

27. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 26, em que o reagente de ensaio é selecionado para proporcionar uma indicação visível da presença de analito.

28. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 26, em que o reagente de ensaio é selecionado para reagir à presença de pelo menos um de glicose, proteína, gordura, fator de crescimento endotelial vascular, fator 1 de crescimento similar à insulina, anticorpos, e citocinas.

29. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 26, em que a barreira compreende um de fotorrevestimento protetor e polímero curável.

30. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 26, em que o meio hidrofílico poroso compreende um de acetato de nitrocelulose, acetato de celulose, papel celulósico, papel de filtro, papel de tecido, papel de escrita, toalha de papel, tecido, e película de polímero porosa.

31. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 26, em que a barreira tem pelo menos uma dimensão lateral entre cerca de 300 μm e cerca de 100 μm .

32. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 26, em que a barreira tem pelo menos uma dimensão lateral menor do que cerca de 300 μm .

33. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 26, compreendendo adicionalmente uma pluralidade de barreiras impenetráveis de fluido permeando substancialmente a espessura do meio hidrofílico poroso, cada barreira tendo uma largura entre cerca de 1 mm e cerca de 100 μm , cada barreira definindo completamente um limite de uma região de ensaio correspondente no interior do meio hidrofílico poroso; e um reagente de ensaio em cada região de ensaio.

34. Dispositivo de ensaio, compreendendo:

um meio hidrofílico poroso;

uma barreira impenetrável por fluido permeando substancialmente a espessura do meio hidrofílico poroso, e tendo um comprimento e uma largura que variam por menos do que cerca de 10% ao longo do com-

primento da barreira, a barreira definindo um limite de uma região de ensaio no interior do meio hidrofílico poroso; e

um reagente de ensaio na região de ensaio.

35. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 34, em que a barreira adicionalmente define um limite de uma região de canal no interior do meio hidrofílico poroso, a região de canal fluidamente ligada à região de ensaio.

36. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 35, em que a barreira adicionalmente define um limite de uma região de deposição de amostra no interior do meio hidrofílico poroso, o canal proporcionando uma trajetória fluida no interior do meio hidrofílico poroso entre a região de deposição de amostra e a região de ensaio.

37. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 34, em que o reagente de ensaio é selecionado para proporcionar uma indicação visível da presença de analito.

38. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 34, em que o reagente de ensaio é selecionado para reagir à presença de pelo menos um de glicose, proteína, gordura, fator de crescimento endotelial vascular, fator 1 de crescimento similar à insulina, anticorpos, e citoquinas.

39. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 34, em que a barreira compreende um de fotorrevestimento protetor e polímero curável.

40. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 34, em que o meio hidrofílico poroso compreende um de acetato de nitrocelulose, acetato de celulose, papel celulósico, papel de filtro, papel de tecido, papel de escrita, toalha de papel, tecido, e película de polímero porosa.

41. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 34, em que a largura da barreira é menor do que cerca de 300 μm .

42. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 34, em que a largura da barreira varia por menos do que cerca de 5% ao longo do comprimento da barreira.

43. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 35, em

que a região de canal tem uma largura entre cerca de 750 μm e cerca de 300 μm .

44. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 35, em que a região de canal tem um comprimento e uma largura que variam por
5 menos do que cerca de 10% ao longo do comprimento do canal.

45. Dispositivo de ensaio, de acordo com a reivindicação 35, em que a região de canal tem um comprimento e uma largura que variam por menos do que cerca de 5% ao longo do comprimento do canal.

46. Método de produção de um dispositivo, o método compreendendo:
10

 saturação de um meio hidrofílico poroso com fotorrevestimento protetor;

 exposição do meio saturado a um modelo predeterminado de luz;

15 remoção do fotorrevestimento protetor de uma região do meio baseada no modelo predeterminado de luz para definir uma barreira de fotorrevestimento protetor residual que forma um limite da região, em que o modelo predeterminado de luz é selecionado de modo que a barreira define uma região de ensaio na região; e

20 provisão de um reagente de ensaio na região de ensaio.

47. Método, de acordo com a reivindicação 46, em que a barreira é substancialmente impenetrável por fluido.

48. Método, de acordo com a reivindicação 46, compreendendo selecionar o modelo predeterminado de luz de modo que a barreira envolve
25 completamente a região.

49. Método, de acordo com a reivindicação 46, compreendendo selecionar o modelo predeterminado de luz de modo que a barreira limita uma primeira porção da região, e em que uma borda do meio hidrofílico poroso limita uma segunda porção da região.

30 50. Método, de acordo com a reivindicação 46, em que a provisão do reagente compreende ligar covalentemente o reagente à região de ensaio.

51. Método, de acordo com a reivindicação 46, em que a provisão do reagente compreende ligar não-covalentemente o reagente à região de ensaio.

52. Método, de acordo com a reivindicação 46, compreendendo
5 selecionar o modelo predeterminado de luz de modo que a região de ensaio tem uma forma baseada nas características de transporte do reagente na presença de um líquido.

53. Método, de acordo com a reivindicação 46, em que o reagente é selecionado para proporcionar uma indicação visível da presença de
10 analito.

54. Método, de acordo com a reivindicação 46, em que o reagente de ensaio é selecionado para reagir à presença de um de glicose, proteína, gordura, fator de crescimento endotelial vascular, fator 1 de crescimento similar à insulina, anticorpos, e citoquinas.

55. Método, de acordo com a reivindicação 46, compreendendo
15 selecionar o modelo predeterminado de luz de modo que a barreira define uma região de canal na região.

56. Método, de acordo com a reivindicação 46, em que a região de canal tem pelo menos uma dimensão lateral que é entre cerca de 750 μm
20 e cerca de 100 μm .

57. Método, de acordo com a reivindicação 46, compreendendo selecionar o modelo predeterminado de luz de modo que a barreira define uma região de deposição de amostra na região.

58. Método, de acordo com a reivindicação 46, em que a saturação do meio hidrofílico poroso com fotorrevestimento protetor compreende
25 aplicar uma solução do fotorrevestimento protetor em um solvente ao meio, e substancialmente evaporando o solvente.

59. Método, de acordo com a reivindicação 46, em que a exposição do meio saturado a um modelo predeterminado de luz compreende irradiar a região com a luz, e não irradiar substancialmente a barreira com a luz.
30

60. Método, de acordo com a reivindicação 46, em que a exposição do meio saturado a um modelo predeterminado de luz compreende irra-

diar a barreira com a luz, e substancialmente não irradiar a região com a luz.

61. Método, de acordo com a reivindicação 46, em que a remoção do fotorrevestimento protetor compreende remover o fotorrevestimento protetor de uma pluralidade de regiões no meio baseado no modelo predeterminado de luz para definir uma pluralidade de barreiras de fotorrevestimento protetor residual que forma limites de regiões correspondentes.

62. Método, de acordo com a reivindicação 46, compreendendo adicionalmente:

10 saturação de um segundo meio hidrofílico poroso com fotorrevestimento protetor;

- exposição do meio saturado a um modelo predeterminado de luz;

15 remoção do fotorrevestimento protetor de uma região do segundo meio baseada no modelo predeterminado de luz para definir uma barreira de fotorrevestimento protetor residual que forma um limite da região;

alinhamento substancialmente da barreira do segundo meio com a barreira do primeiro meio mencionado; e

ligação do primeiro meio ao segundo meio.

20 63. Método, de acordo com a reivindicação 62, compreendendo aplicar um reagente na região do primeiro meio, o reagente selecionado para reagir a um analito alvo.

25 64. Método, de acordo com a reivindicação 63, compreendendo adicionalmente provisão de um de um anticorpo etiquetado e uma proteína etiquetada na região do segundo meio, o um do anticorpo etiquetado e a proteína etiquetada selecionados para proporcionar uma indicação de cor de uma reação entre o reagente e o analito alvo.

30 65. Método, de acordo com a reivindicação 46, compreendendo adicionalmente provisão de uma camada sobre o meio hidrofílico poroso, a camada incluindo pelo menos uma abertura que é alinhada baseada em uma posição da barreira.

66. Método, de acordo com a reivindicação 46, compreendendo selecionar o modelo predeterminado de luz de modo que a barreira tem pelo

menos uma dimensão que está entre cerca de 5 cm e cerca de 100 μm .

67. Método, de acordo com a reivindicação 46, compreendendo selecionar o modelo predeterminado de luz de modo que a barreira tem pelo menos uma dimensão que é menor do que cerca de 250 μm .

5 68. Método, de acordo com a reivindicação 46, em que o meio hidrofílico poroso compreende um de acetato de nitrocelulose, acetato de celulose, papel celulósico, papel de filtro, papel de tecido, papel de escrita, toalha de papel, tecido, e película de polímero porosa.

10 69. Método, de acordo com a reivindicação 46, compreendendo adicionalmente:

remoção do fotorrevestimento protetor de uma pluralidade de regiões do meio baseada no modelo predeterminado de luz para definir uma pluralidade de barreiras de fotorrevestimento protetor residual que forma limites de uma pluralidade correspondente de regiões, em que o modelo predeterminado de luz é selecionado de modo que a pluralidade de barreiras define uma pluralidade correspondente de regiões de ensaio nas regiões; e
15 provisão de um reagente de ensaio em pelo menos algumas das regiões de ensaio.

20 70. Método de produção de um dispositivo, o método compreendendo:

revestimento de uma matriz de modelo predeterminado com um polímero curável;

25 prensagem da matriz revestida em um meio hidrofílico poroso, o meio tendo uma espessura e o polímero curável permeando substancialmente o meio através de sua espessura de acordo com o modelo predeterminado;

cura do polímero curável de modo a formar uma barreira impenetrável por fluido embutida no meio, a barreira impenetrável por fluido definindo uma região de ensaio no meio; e

30 provisão de um reagente na região de ensaio.

71. Método, de acordo com a reivindicação 70, em que o polímero curável compreende poli(dimetil-siloxano) (PDMS).

72. Método, de acordo com a reivindicação 70, compreendendo selecionar o modelo predeterminado de modo que a barreira envolve completamente a região.

5 73. Método de realizar um ensaio para determinar a presença de um analito em uma amostra líquida, o método compreendendo:

deposição da amostra líquida em um dispositivo de ensaio, o dispositivo de ensaio compreendendo um meio hidrofílico poroso, uma barreira impenetrável por fluido compreendendo fotorrevestimento protetor polimerizado, a barreira substancialmente permeando a espessura do meio
10 hidrofílico poroso, e definindo um limite de uma região de ensaio no interior do meio hidrofílico poroso, e um reagente de ensaio na região de ensaio, o reagente de ensaio selecionado para proporcionar uma reposta visível à presença do analito;

obtenção de uma imagem da região de ensaio; e
15 determinação da presença do analito no líquido baseada na imagem da região de ensaio.

74. Método, de acordo com a reivindicação 73, em que a determinação da presença do analito no líquido compreende obtenção de uma intensidade média de pelo menos uma porção da imagem da região de ensaio, e determinação da presença do analito no líquido baseado na intensidade média.
20

75. Método, de acordo com a reivindicação 73, em que a obtenção da imagem da região de ensaio compreende a imagem da região de ensaio com um de um fone de câmera, uma câmera digital, e um escaneador.
25

76. Método, de acordo com a reivindicação 73, em que a determinação da presença do analito baseada na imagem da região de ensaio compreende a transmissão da imagem para um laboratório remoto, e obtenção da informação a partir do laboratório remoto com relação à presença do analito no líquido.
30

77. Método, de acordo com a reivindicação 73, em que a obtenção da imagem da região de ensaio compreende a imagem da região de

ensaio com um fone de câmera, e em que a determinação da presença do analito baseada na imagem da região de ensaio compreende a transmissão da imagem para a um laboratório remoto, via o fone de câmera.

78. Dispositivo microfluídico tridimensional, compreendendo:

5 uma pluralidade de camadas hidrofílicas porosas modeladas, em que cada referida camada hidrofílica porosa modelada compreende uma barreira impermeável à fluido que permeia substancialmente a espessura de referida camada hidrofílica porosa modelada, e define um limite de uma ou mais regiões hidrofílicas no interior de cada referida camada hidrofílica porosa modelada; e

10 uma camada impermeável à fluido disposta entre todas as duas adjacentes referidas camadas hidrofílicas porosas modeladas, em que referida camada impermeável à fluido compreende uma ou mais aberturas, referidas aberturas em comunicação de fluxo com pelo menos uma região hidrofílica em pelo menos uma camada hidrofílica porosas modelada.

79. Dispositivo microfluídico tridimensional, de acordo com a reivindicação 78, em que referida camada hidrofílica porosa é selecionada a partir do grupo consistindo de acetato de nitrocelulose, acetato de celulose, papel celulósico, papel de filtro, papel de tecido, papel de escrita, toalha de papel, tecido, e película de polímero porosa.

80. Dispositivo microfluídico tridimensional, de acordo com a reivindicação 78, em que referida camada hidrofílica porosa compreende papel cromatográfico.

81. Dispositivo microfluídico tridimensional, de acordo com a reivindicação 78, em que referida barreira compreende fotorrevestimento protetor.

82. Dispositivo microfluídico tridimensional, de acordo com a reivindicação 78, em que referida camada impermeável à fluido compreende uma folha plástica.

30 83. Dispositivo microfluídico tridimensional, de acordo com a reivindicação 82, em que referida folha plástica compreende fita adesiva.

84. Dispositivo microfluídico tridimensional, de acordo com a rei-

vindicação 83, em que referida fita adesiva compreende fita adesiva de lado duplo.

85. Dispositivo microfluídico tridimensional, de acordo com a reivindicação 78, em que referidas regiões hidrofílicas compreendem:

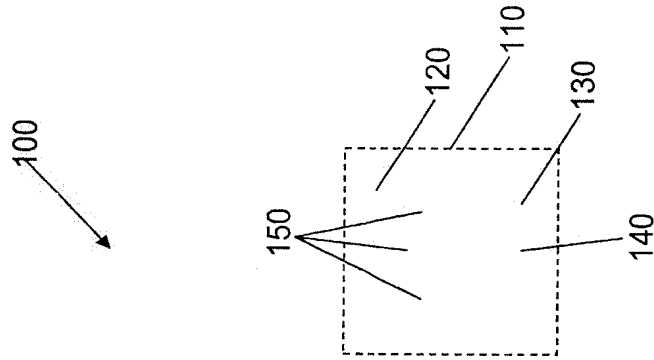
5 uma primeira região hidrofílica compreendendo um reservatório para recebimento de um primeiro fluido;

 uma segunda região hidrofílica compreendendo uma ou mais regiões de distribuição para recebimento de referido primeiro fluido de referido reservatório; e

10 uma pluralidade de regiões hidrofílicas para recebimento de referido primeiro fluido de referida(s) região(ões) de distribuição.

86. Dispositivo microfluídico tridimensional, de acordo com a reivindicação 85, em que cada região hidrofílica de referida pluralidade de regiões hidrofílicas compreende adicionalmente um reagente de ensaio para

15 ensaio de referido primeiro fluido.



1 cm

Fig. 1A

Fig. 1B

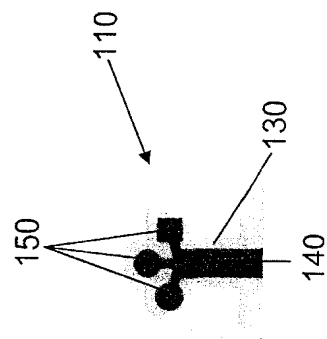


Fig. 1C

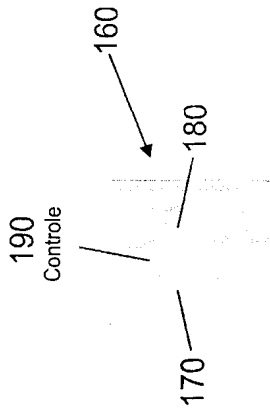


Fig. 1D

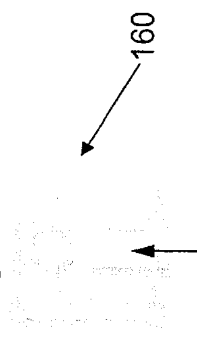
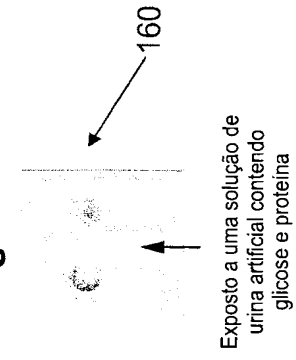


Fig. 1E



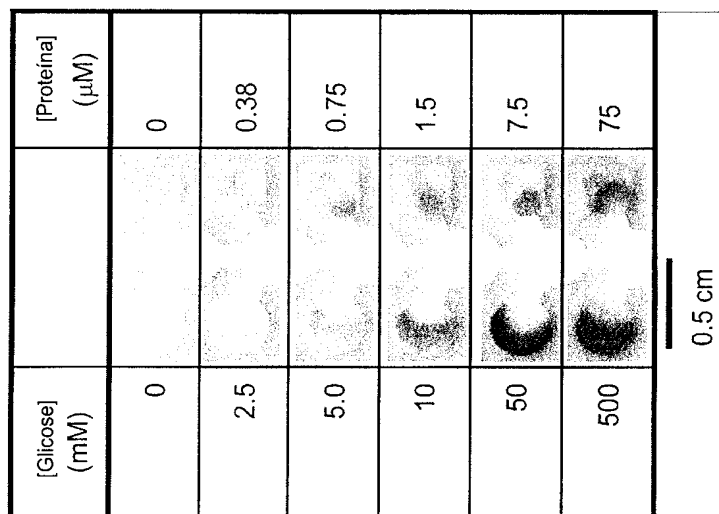
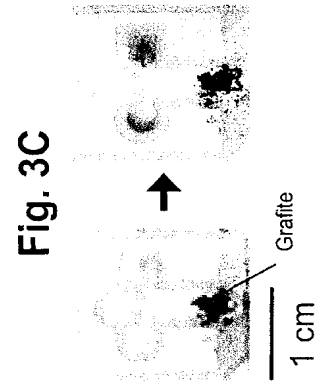
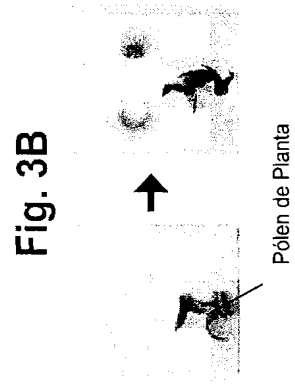
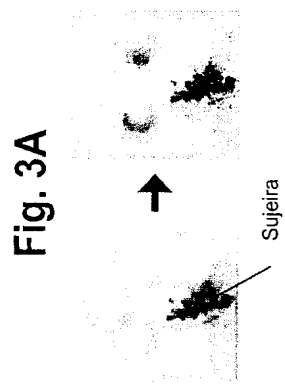


Fig. 2



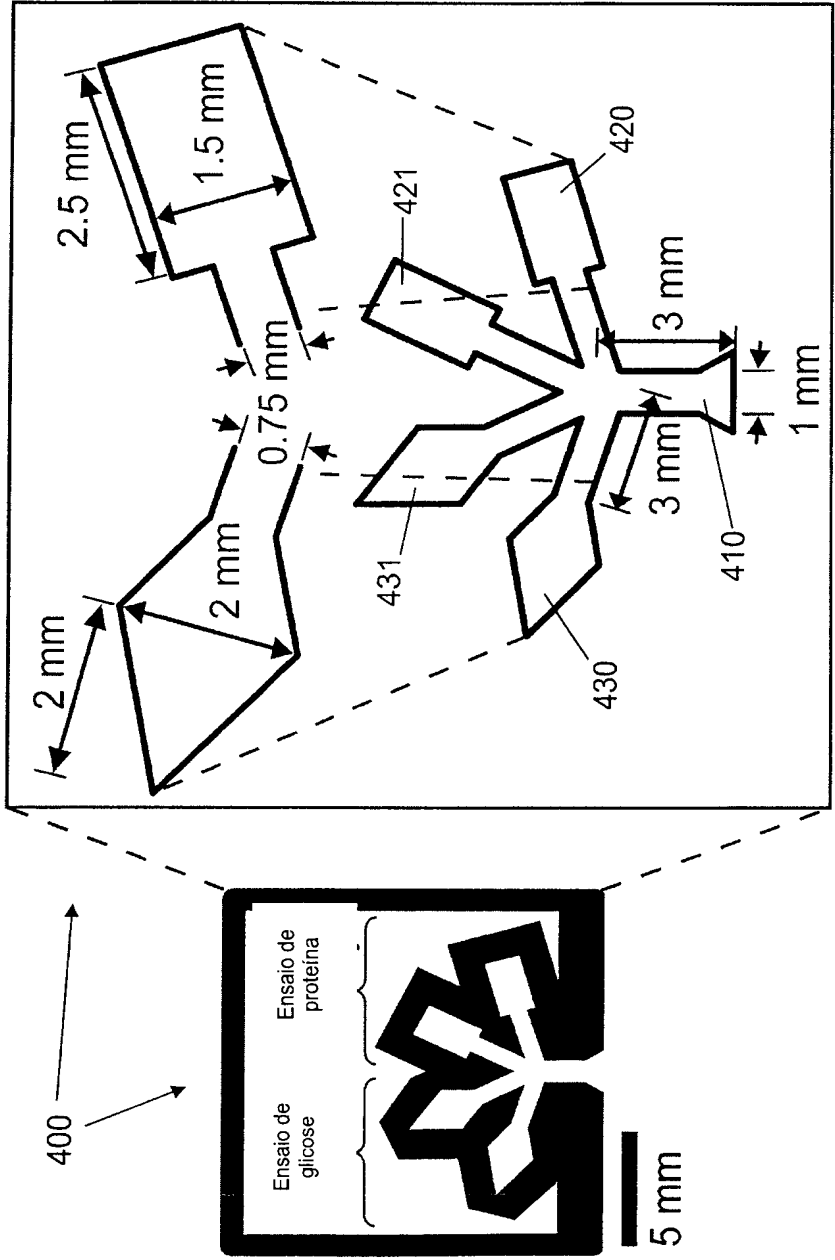


Fig. 4

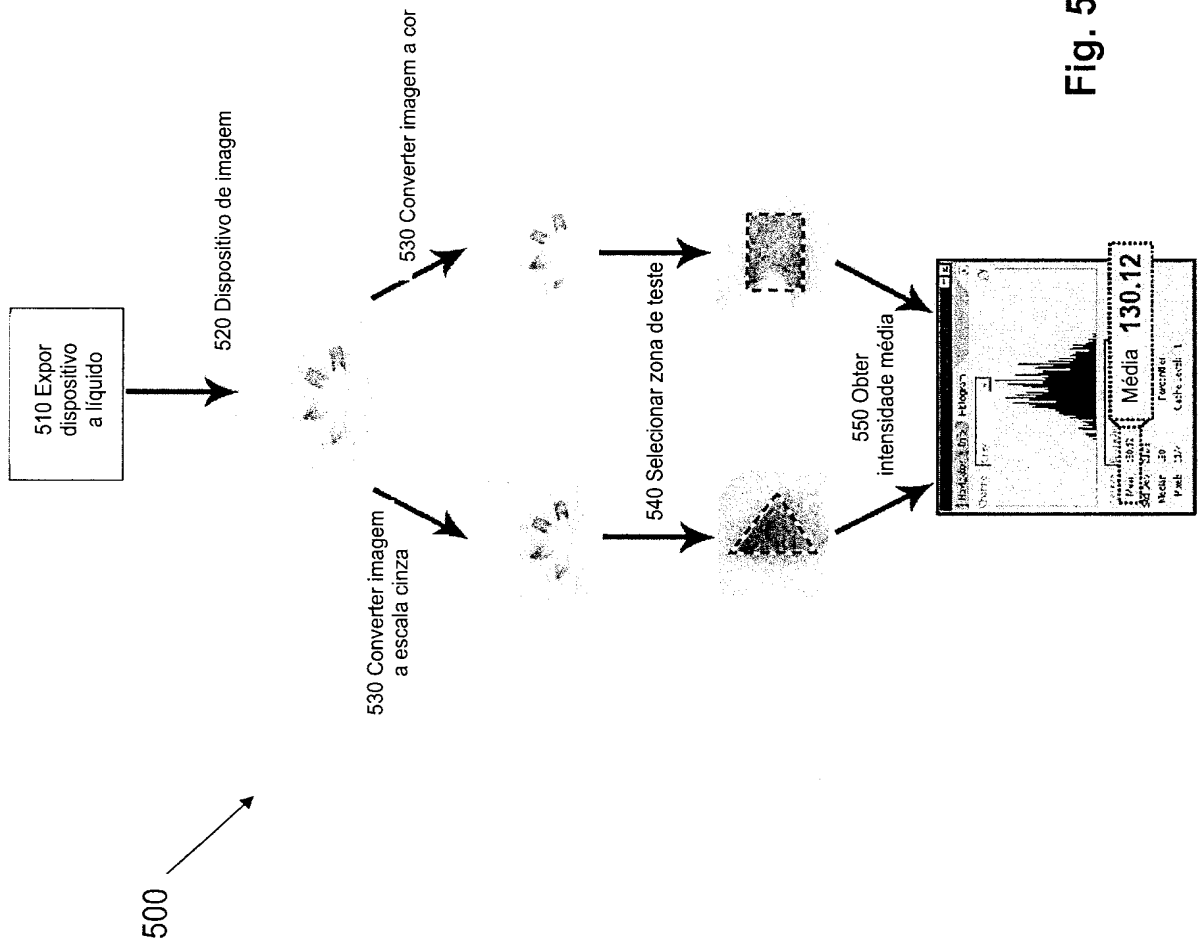


Fig. 5

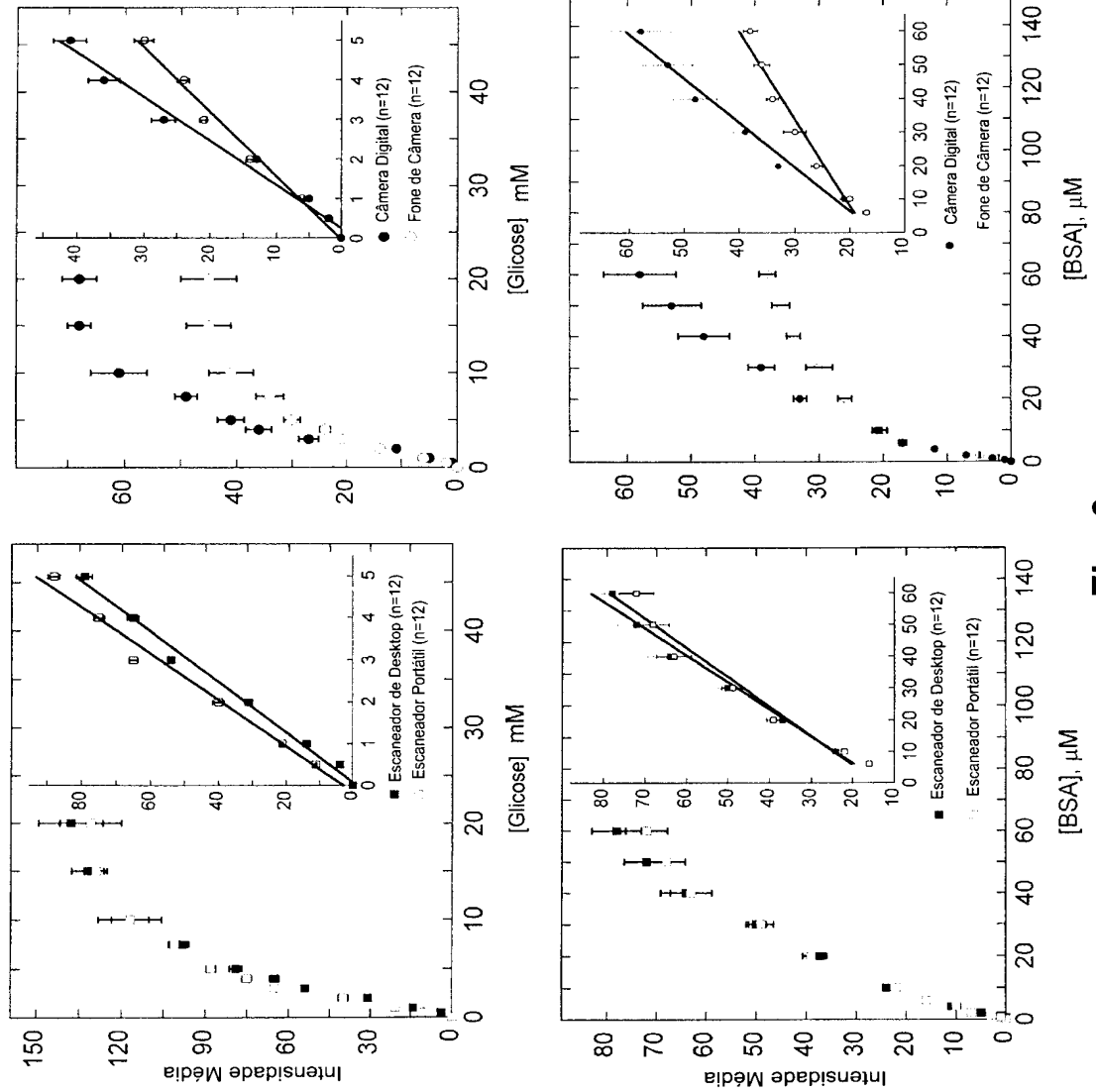


Fig. 6

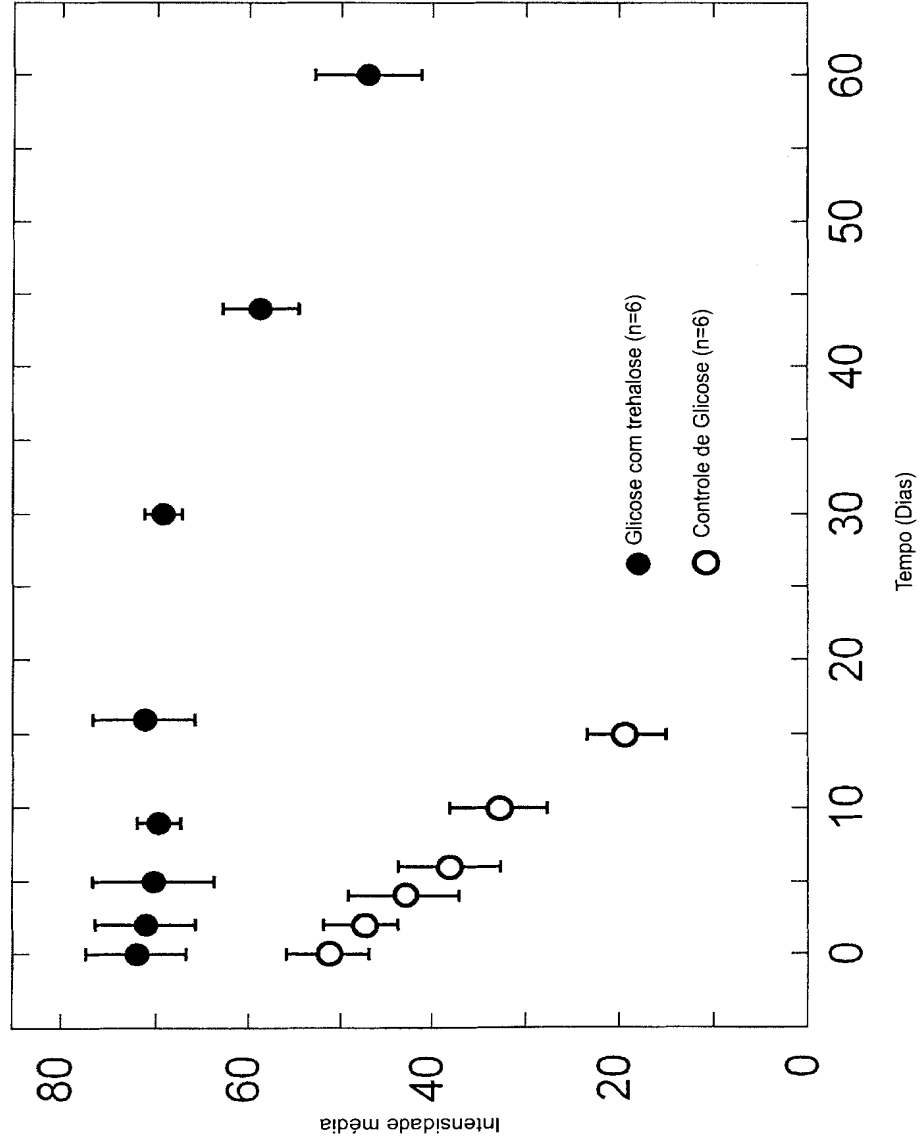


Fig. 7

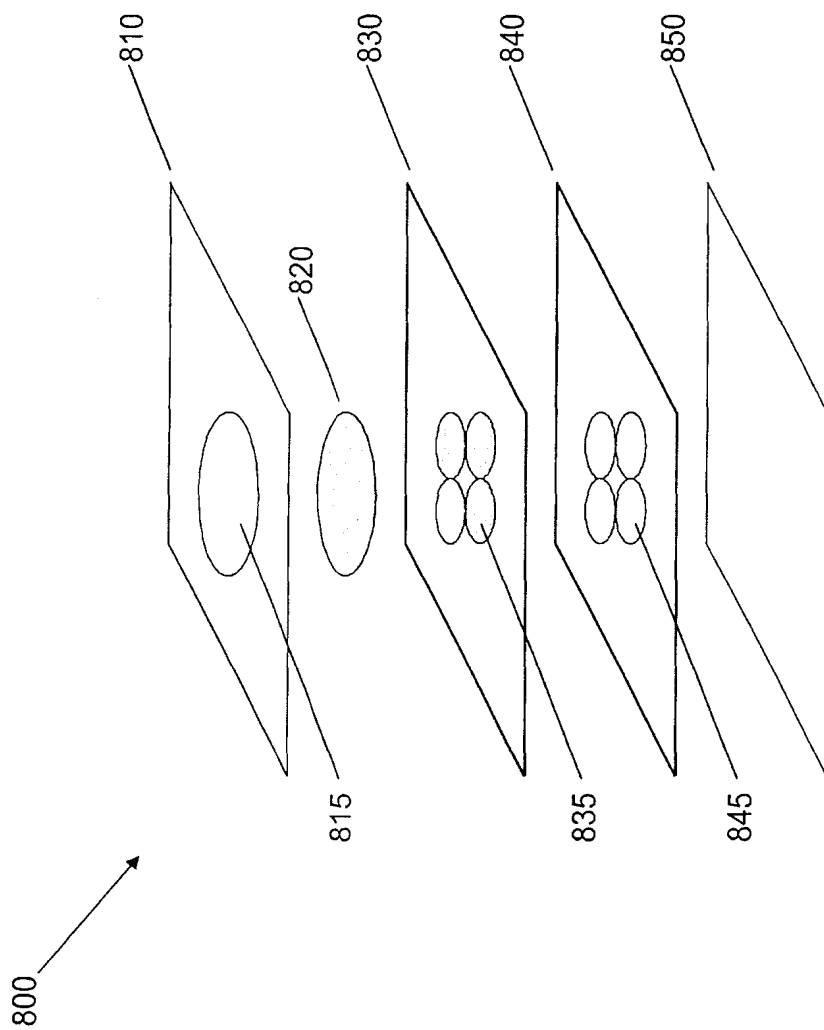


Fig. 8A

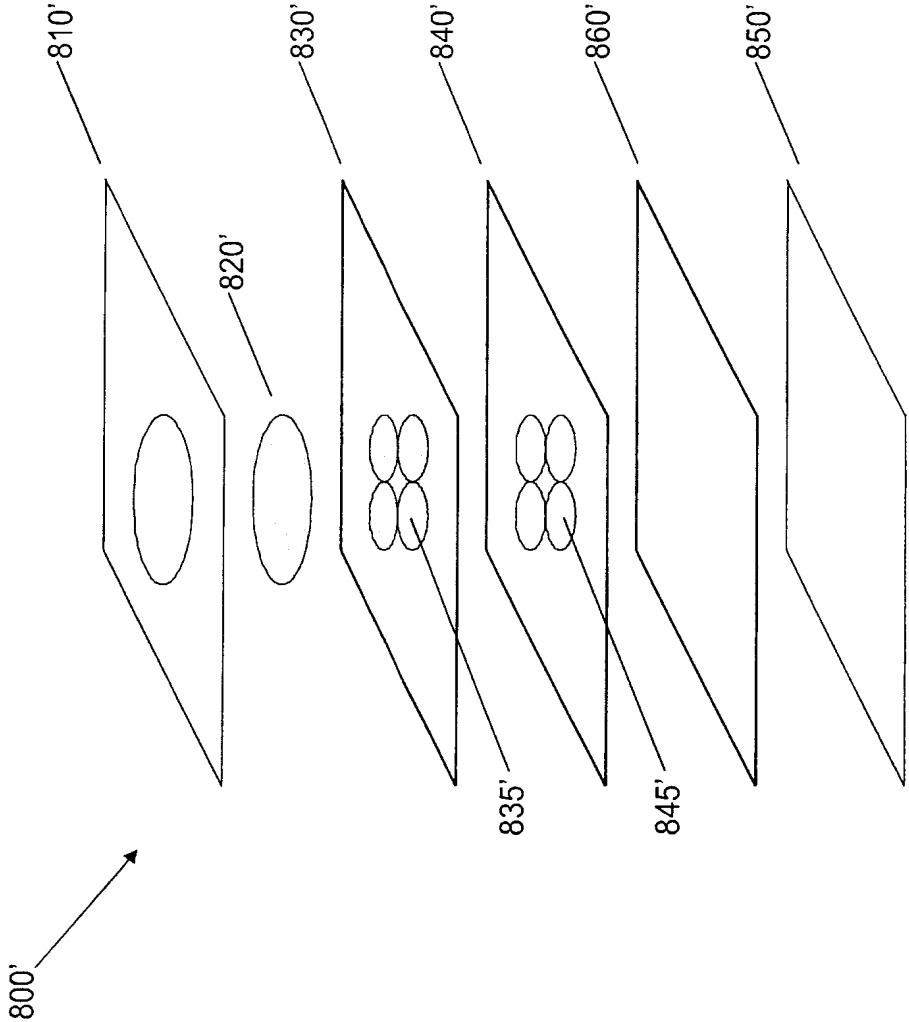


Fig. 8B

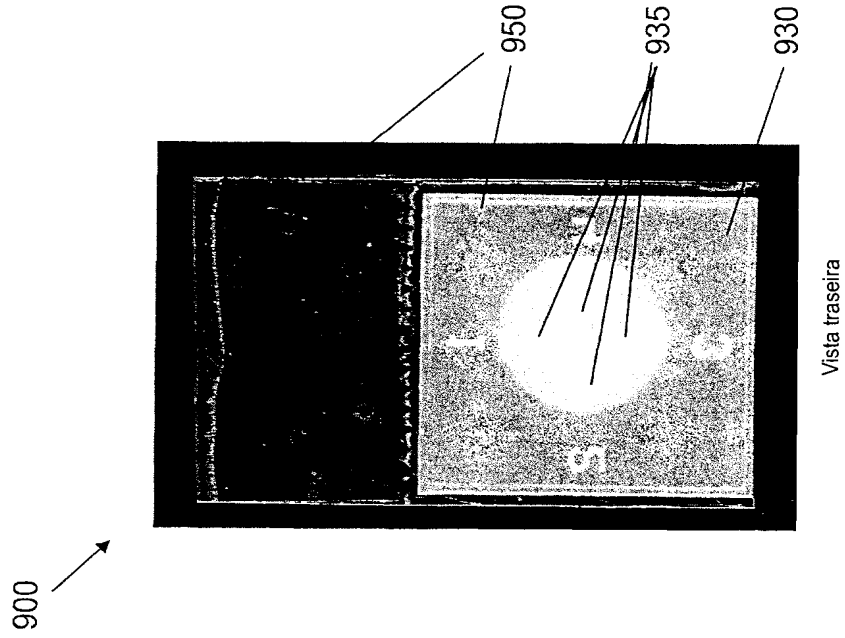


Fig. 9A

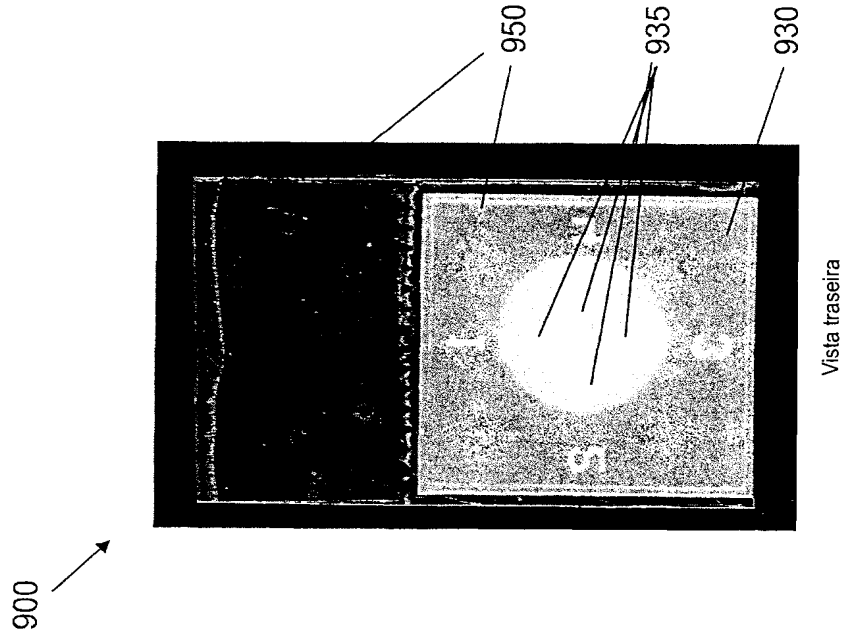


Fig. 9B

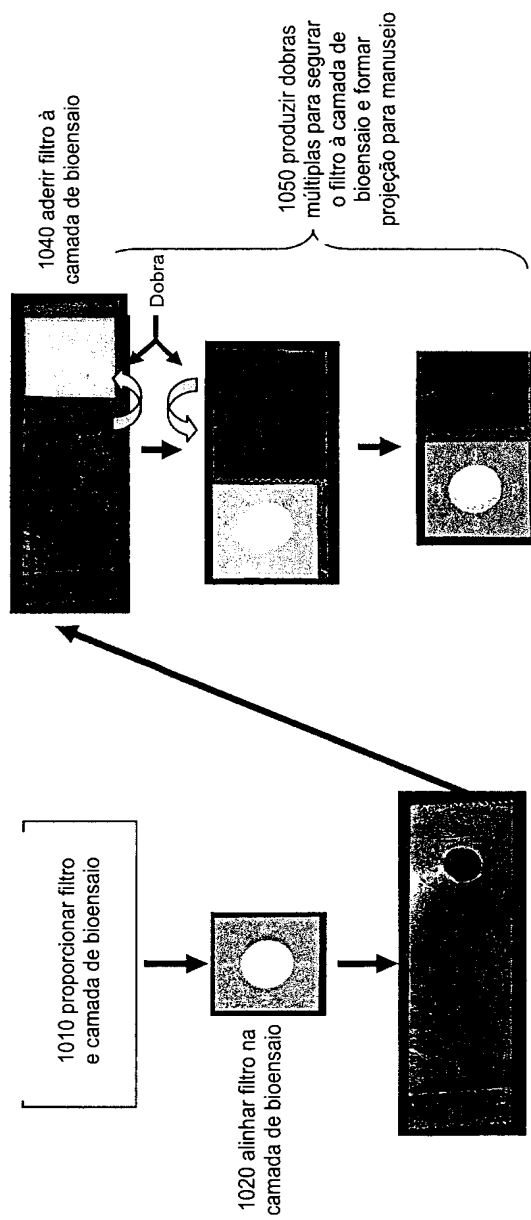


Fig. 10

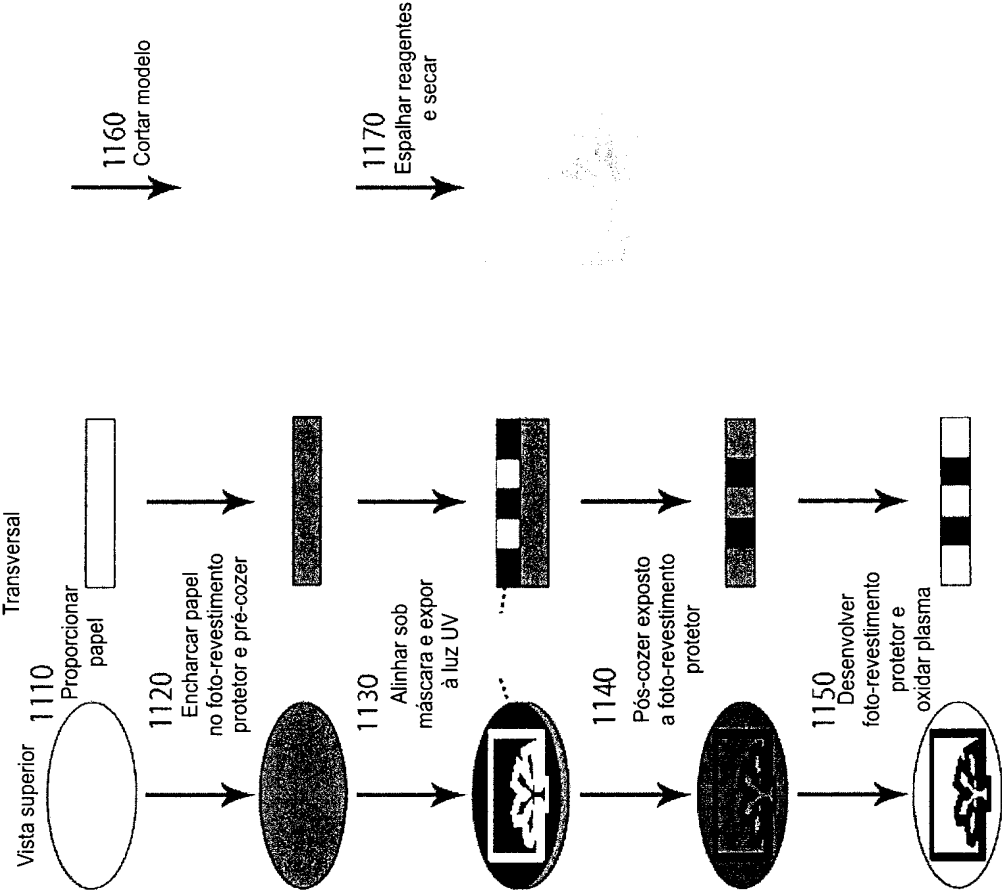


Fig. 11

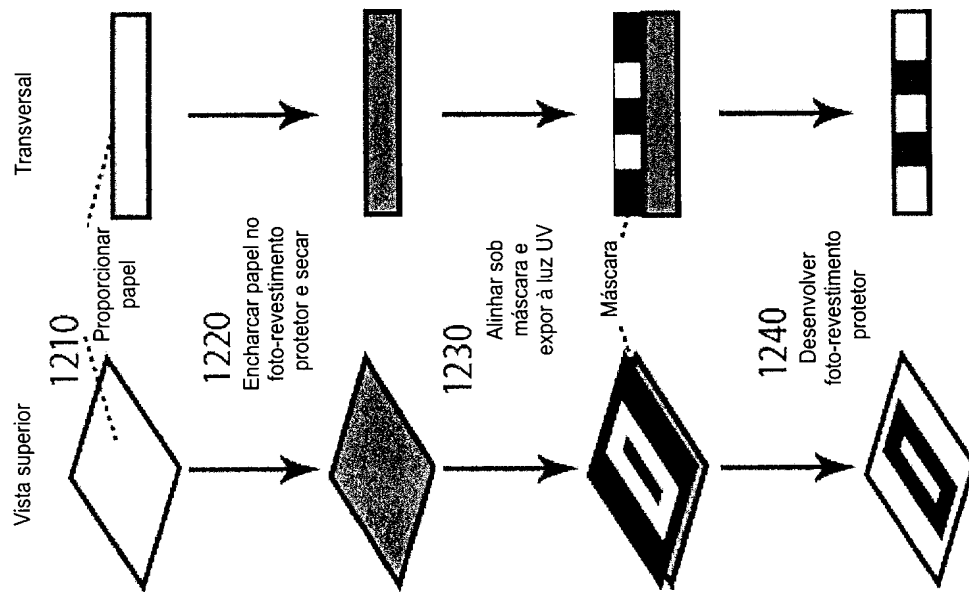


Fig. 12

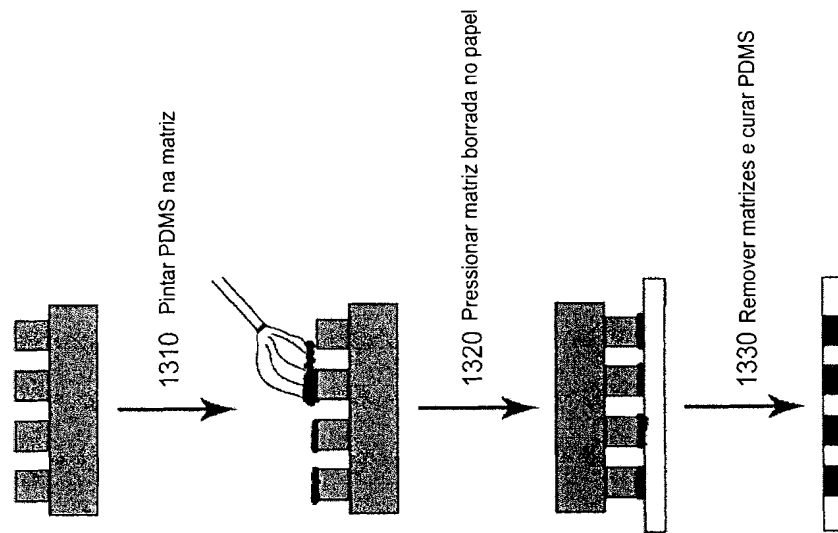
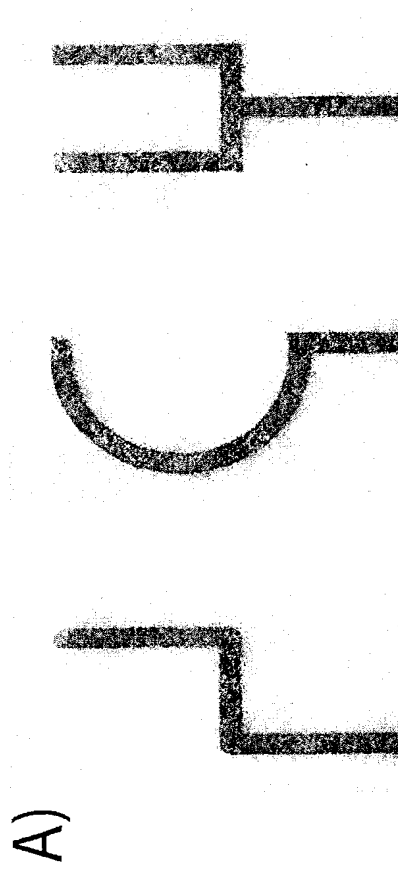


Fig. 13



5 mm



Fig. 14

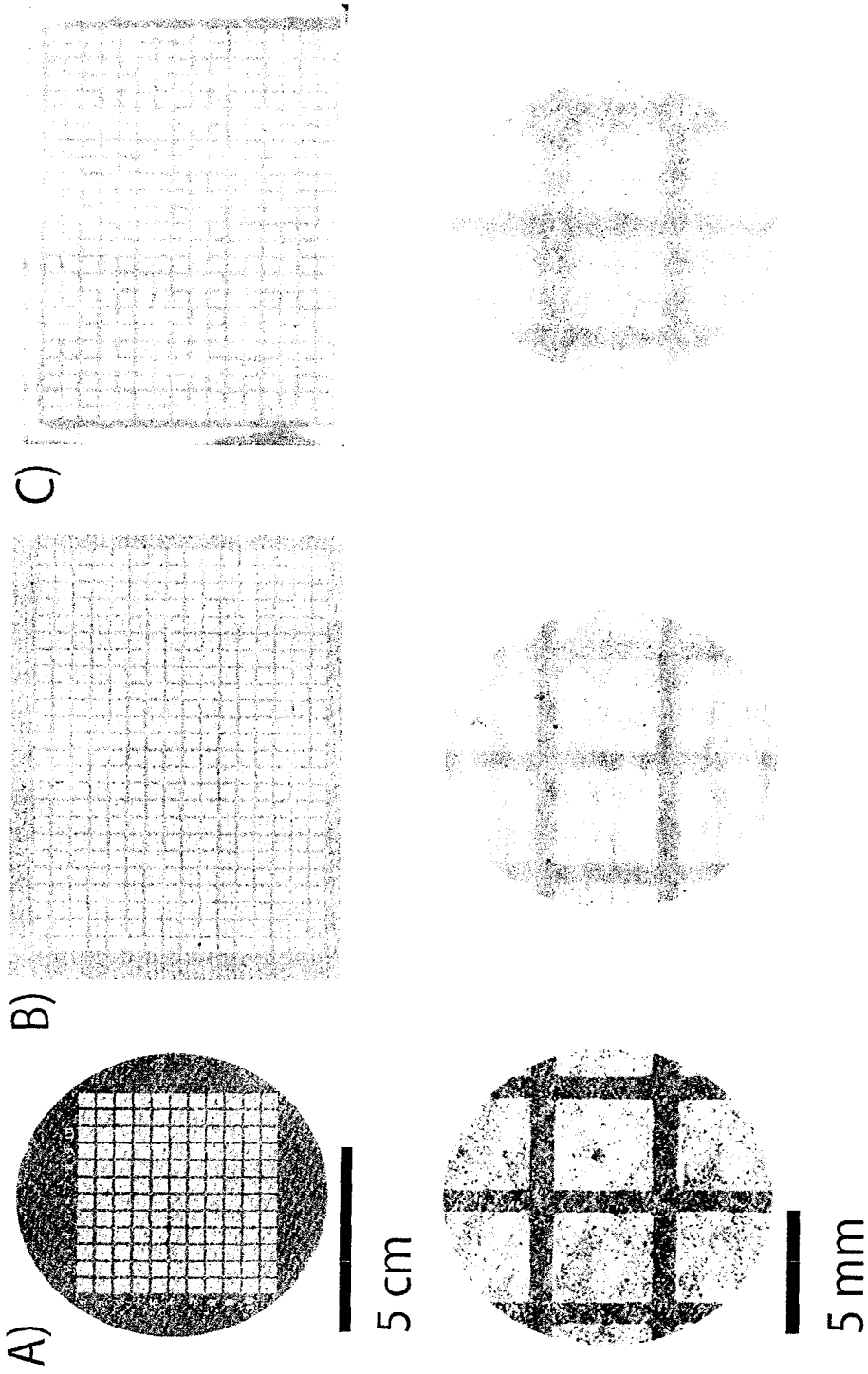


Fig. 15

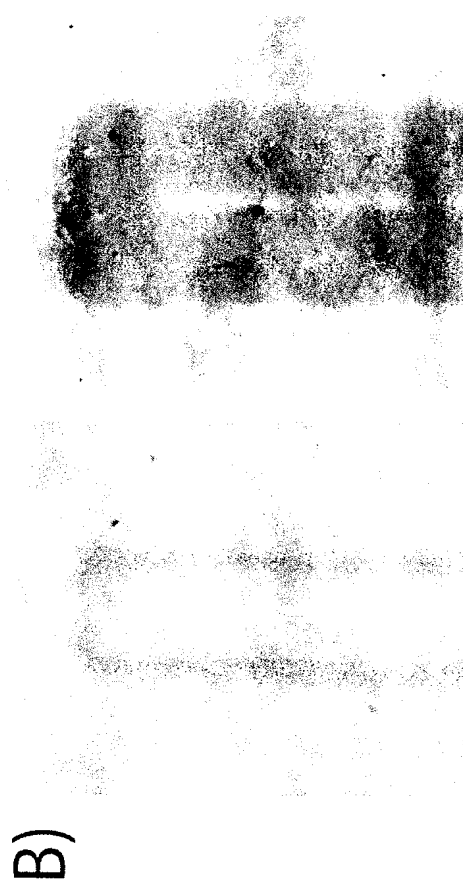
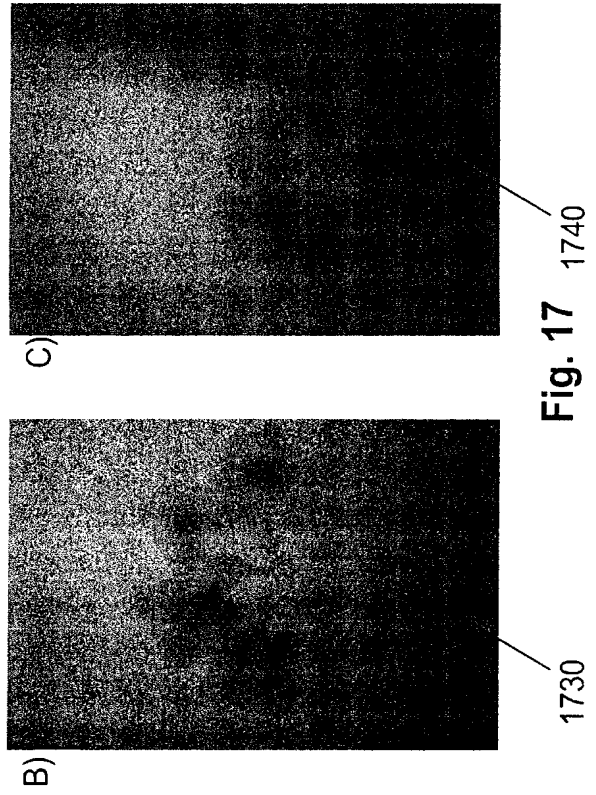
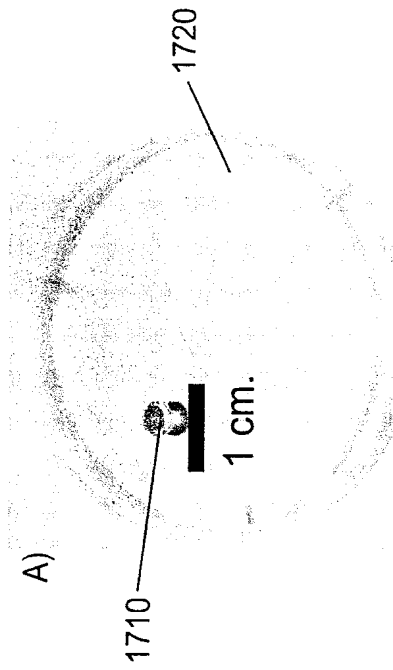


Fig. 16

1 mm





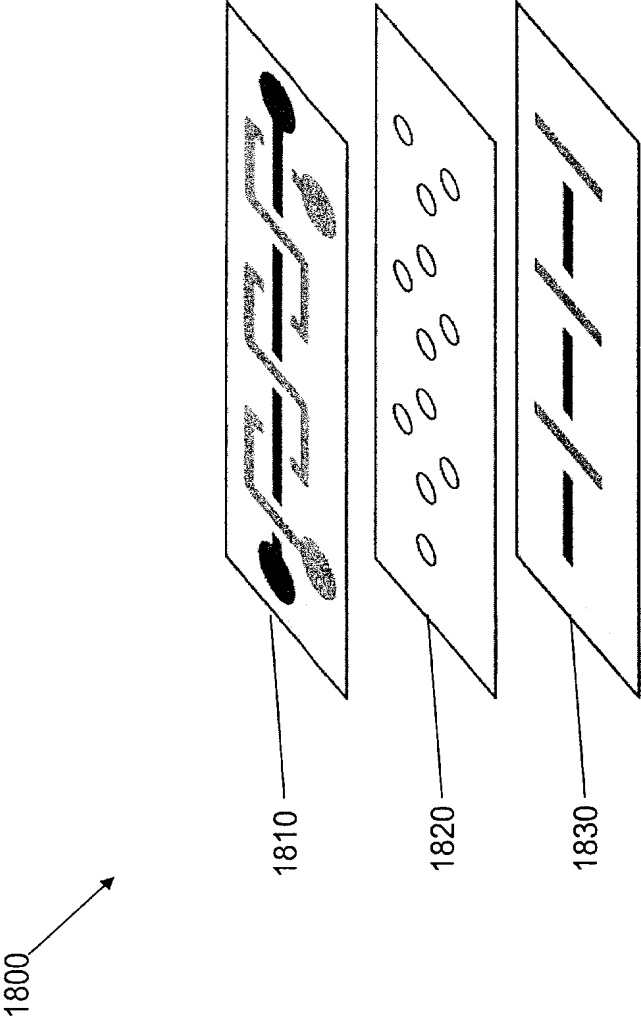


Fig. 18A

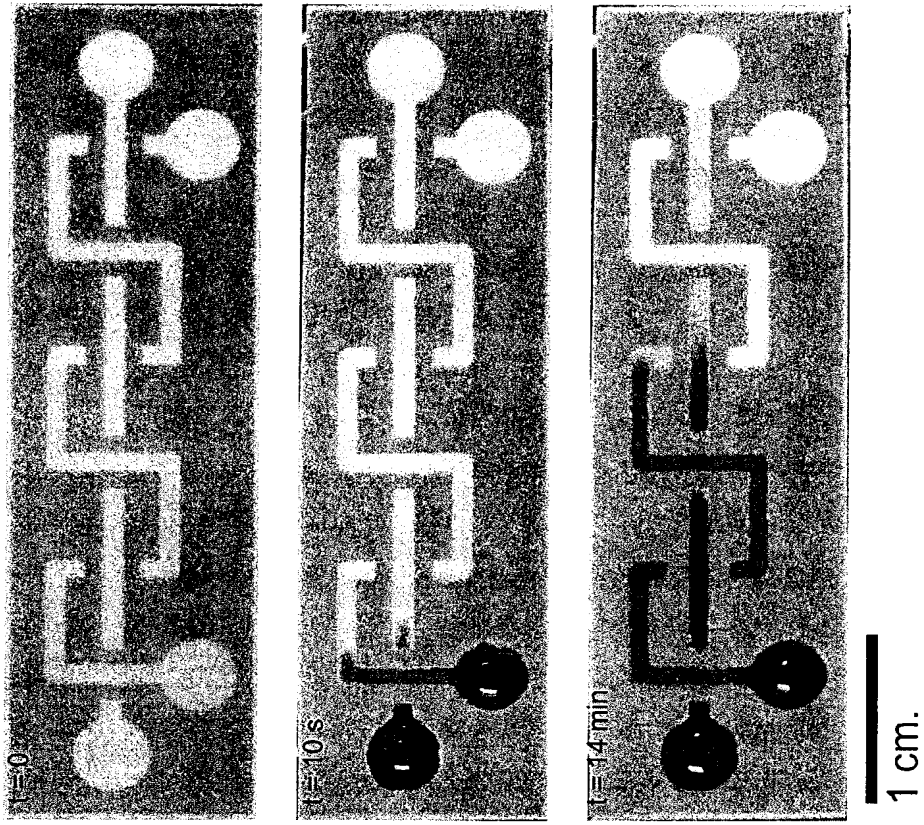


Fig. 18B

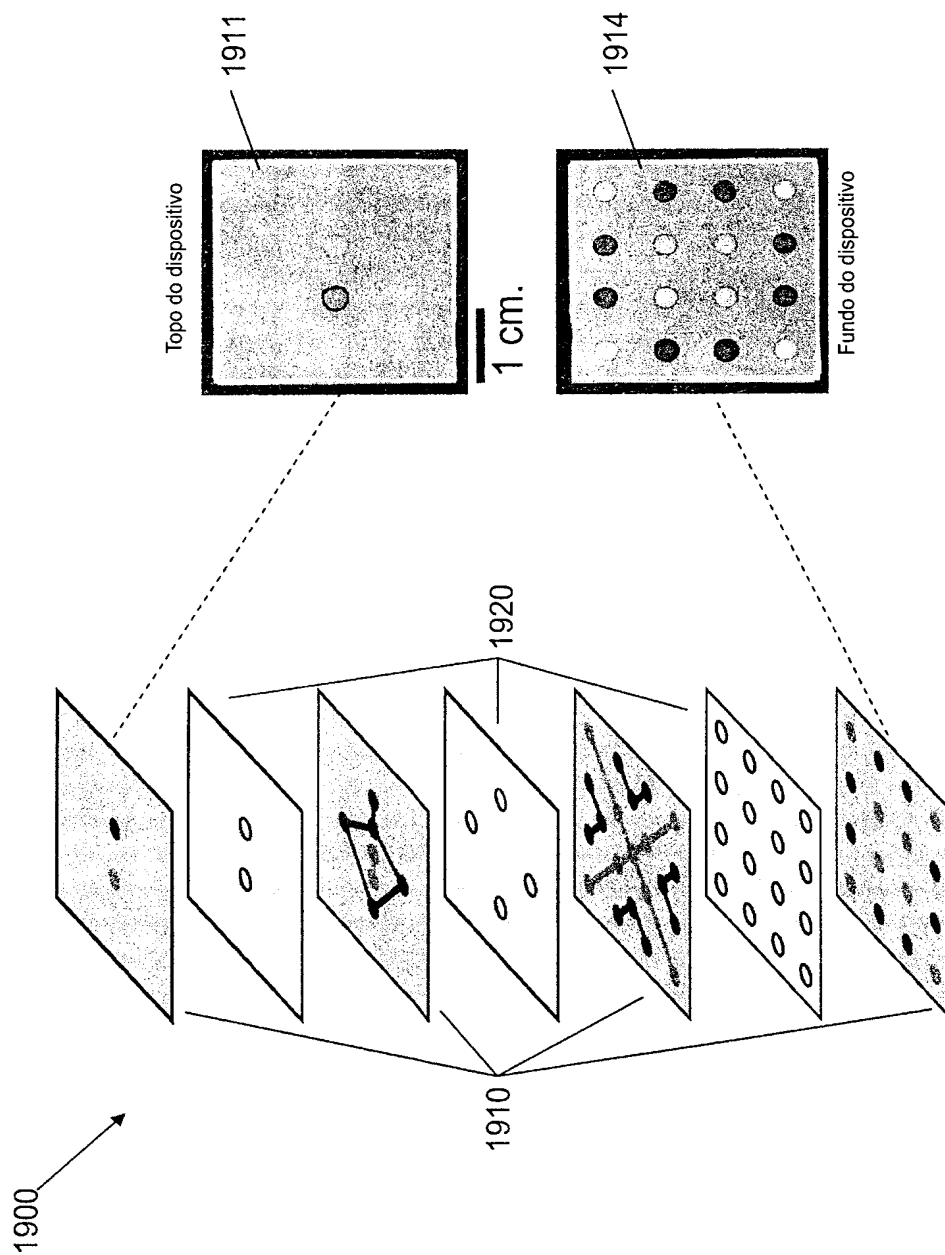


Fig. 19

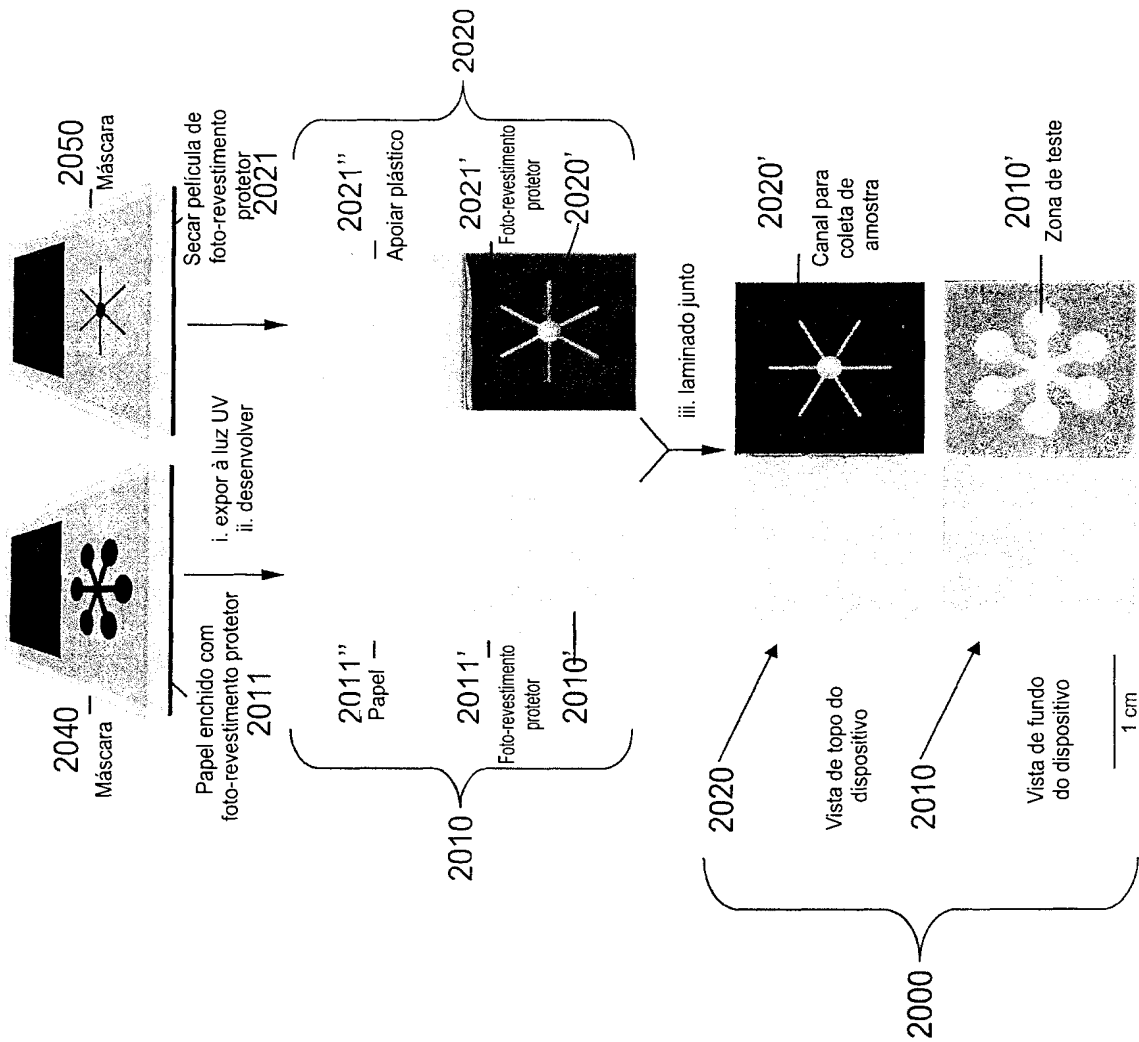


Fig. 20

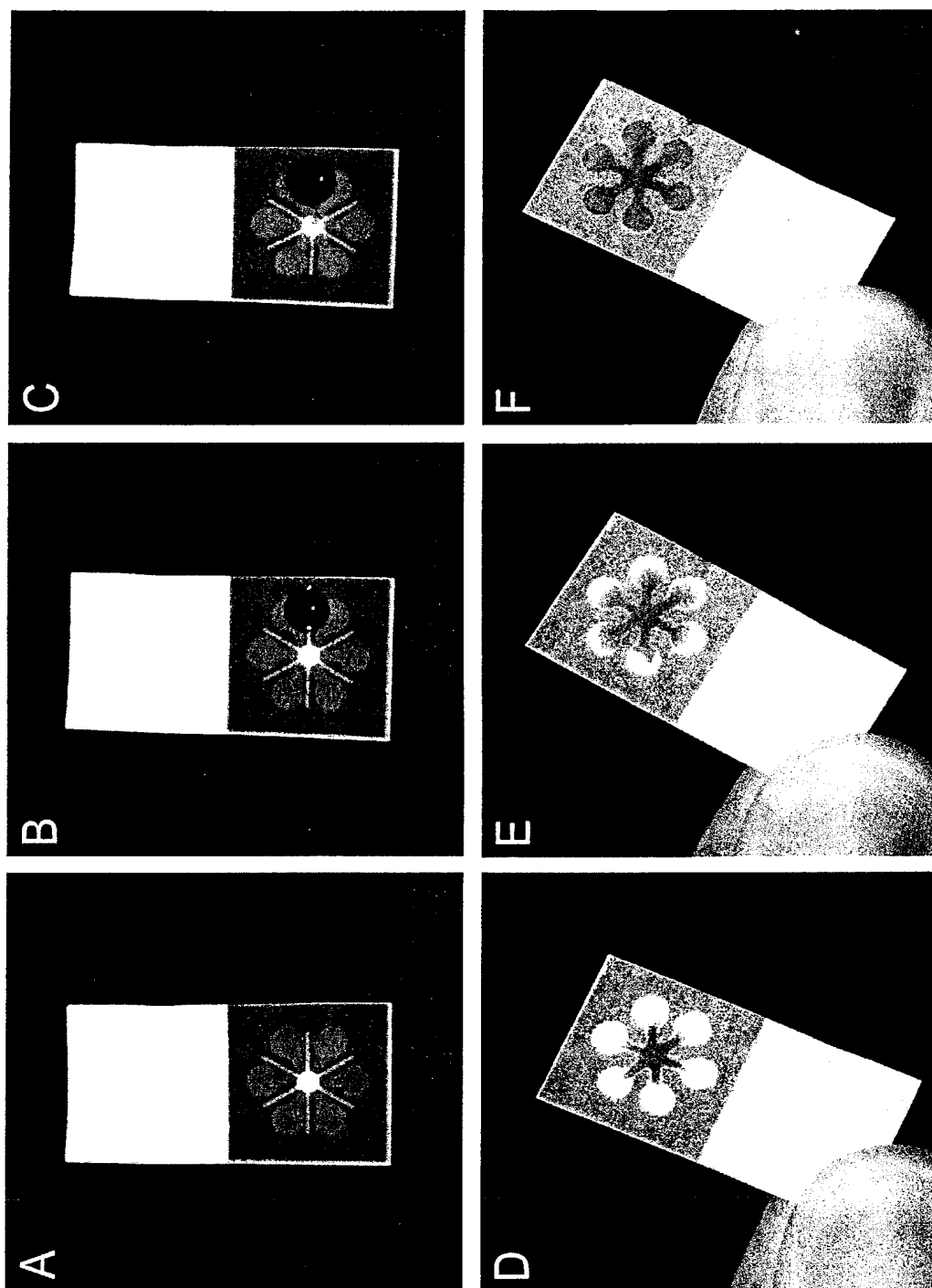


Fig. 21

RESUMO

Patente de Invenção: **"BIOENSAIO DE FLUXO DIRETO E FLUXO LATERAL BASEADO EM MEIO POROSO MODELADO, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DO MESMO, E MÉTODOS DE USO DO MESMO".**

5 A presente invenção refere-se a dispositivos de bioensaio de fluxo direto e fluxo lateral baseados em meio poroso modelado, métodos de produção dos mesmos, e métodos de uso dos mesmos. Sob um aspecto, um dispositivo de ensaio inclui um meio hidrofílico poroso; uma barreira impenetrável por fluido compreendendo foro-revestimento protetor polimerizado, a barreira permeando substancialmente a espessura do meio hidrofílico
10 poroso, e definindo um limite de uma região de ensaio no interior do meio hidrofílico poroso; e um reagente de ensaio na região de ensaio.