



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

**(21) PI 0806582-9 A2**



(22) Data de Depósito: 11/01/2008  
(43) Data da Publicação: 06/05/2014  
(RPI 2261)

(51) *Int.Cl.*:  
B01L 3/00  
B01F 13/00

**(54) Título:** DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO, SISTEMA LAB-ON-CHIP PARA PREPARAR UMA AMOSTRA QUE COMPREENDE UMA MOLÉCULA BIOLÓGICA, E, MÉTODO PARA O ISOLAMENTO DE UM ANALITO. **(57) Resumo:**

**(30) Prioridade Unionista:** 12/01/2007 GB 0700653.9

**(66) Prioridade Interna:** 860446

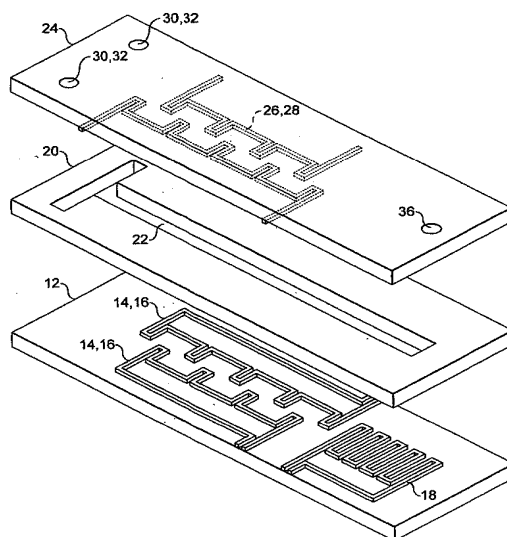
**(73) Titular(es):** Brunel University

**(72) Inventor(es):** Jeremy Ahern, Massoud Zolgharni, Mohamad Reza Bahmanyar, Predrag Slijepcevic, Sayad Mohamad Azimi, Wamadeva Balachandran

**(74) Procurador(es):** Momsen, Leonardos & CIA.

**(86) Pedido Internacional:** PCT GB2008000094 de 11/01/2008

**(87) Publicação Internacional:** WO 2008/084245de 17/07/2008



“DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO, SISTEMA *LAB-ON-CHIP* PARA PREPARAR UMA AMOSTRA QUE COMPREENDE UMA MOLÉCULA BIOLÓGICA, E, MÉTODO PARA O ISOLAMENTO DE UM ANALITO”

Sumário

5                   A corrente invenção diz respeito a um dispositivo microfluídico e a métodos de seu uso para isolar e detectar um analito de uma amostra biológica.

Introdução

10                   Na década passada, o advento de Sistemas Micro-Eleto-Mecânicos (MEMS) que é fundamentado na miniaturização de componentes mecânicos e a sua integração com sistemas micro-elétricos, tem criado o potencial para fabricar várias estruturas e dispositivos da ordem de micrômetros. Esta tecnologia leva vantagem de quase as mesmas técnicas de fabricação, equipamento e materiais que foram desenvolvidos pelas indústrias  
15                   semi-condutoras. A faixa de aplicações de MEMS está crescendo significativamente e está principalmente na área de micro-sensores e micro-atuadores. Em anos recentes, a miniaturização e integração de sistemas de análise bio-química aos dispositivos de MEMS foi de enorme interesse que levou à invenção de Sistemas de Análise Micro Total (p-TAS) ou sistemas  
20                   Lab-on-a-Chip (LOC).

                    A principais vantagens de p-TAS em dispositivos tradicionais reside em custos de fabricação mais baixos, melhora de desempenho analítico com respeito à qualidade e tempo de operação, tamanho pequeno, descartabilidade, detecção precisa, interferência humana mínima e consumo  
25                   de energia mais baixo. Além disso, o problema de produtos químicos raros e amostras que restringem a aplicação da tipagem genética e outras análises moleculares foi resolvida pela utilização de  $\mu$ -TAS.

                    Entretanto, embora tenha havido uma grande quantidade de trabalho em áreas de núcleo, por exemplo, miniaturização da PCR para

amplificação acelerada de DNA no formato de microchip, menos esforço tem sido exercido para a miniaturização de métodos de purificação de DNA. De fato, a maior parte dos dispositivos microfluídicos ou de microarranjo correntemente demonstrados adotam funcionalidade única e usam DNA purificado ou amostra homogênea como uma amostra de entrada. Por outro lado, aplicações práticas na análise clínica e ambiental requer o processamento de amostras tanto complexas quanto heterogêneas como sangue integral ou fluidos ambientais contaminados. Devido à complexidade da preparação de amostra, a maior parte dos sistemas de biochip disponíveis ainda realizam esta etapa inicial fora do chip usando métodos de bancada tradicionais. Como um resultado, desenvolvimentos rápidos em plataformas de detecção *back-end* têm mudado o gargalo, impedindo progresso adicional em dispositivos de análise rápida, para a preparação de amostras *front-end* onde as amostras “reais” são usadas. Um problema com os dispositivos microfluídicos correntemente conhecidos é realizar mistura caótica eficiente nestas plataformas, isto usualmente necessita da existência de partes móveis, obstáculos, ranhuras e canais de serpentina em bobina ou tridimensionais. As estruturas destes componentes tendem a ser complexas, entretanto, requerendo processos de fabricação complicados tais como empilhamento de camada múltipla ou fotolitografia de etapa múltipla.

Suzuki, H., *et al* (J. microelectromechanical systems, 2004, vol 13, nº 5 779-790) divulgam um misturador caótico acionado por força magnética em que obstáculos físicos no microcanal são usados em conjunção com microcondutores embutidos na base do canal, que atuam para manipular pérolas magnéticas para frente e para trás, para facilitar a mistura da amostra e as pérolas.

A EP 1462174 A1 divulga um dispositivo para o transporte controlado de pérolas magnéticas entre uma posição X e uma posição Y, em que as pérolas são transportadas aplicando-se sucessivamente uma série de

campos magnéticos locais gerados pelas estruturas triangulares que carregam corrente em que a densidade de corrente não é constante, resultando nas pérolas acumulando nas pontas das estruturas que carregam corrente na região tendo a densidade de carga mais alta.

5 A WO 2006004558 divulga um biochip para classificação e lisagem de amostra biológicas que faz uso de forças dieletroréticas para reter e recuperar células desejadas de uma amostra.

É um objetivo da corrente invenção fornecer um dispositivo microfluídico que fornece mistura melhorada de líquidos, por exemplo em um  
10 microcanal ou câmara e também fornece fabricação mais simples e que supera ou mitiga os problemas da técnica anterior particularmente a coagulação de amostras de sangue integral.

#### Sumário da Invenção

De acordo com a presente invenção é fornecido um dispositivo  
15 microfluídico que compreende;

i) uma entrada;

ii) uma primeira camada que compreende pelo menos primeira e segunda estruturas que carregam corrente, em que as pelo menos primeira e segunda estruturas que carregam corrente cada uma compreende uma  
20 pluralidade de dentes e em que os dentes das primeira e segunda estruturas que carregam corrente são opcionalmente deslocados tal que os dentes da primeira estrutura que carrega corrente são posicionados entre os dentes da segunda estrutura que carrega corrente;

iii) uma segunda camada que compreende uma primeira  
25 câmara microfluídica em comunicação fluida com a entrada e posicionados acima das pelo menos primeira e segunda estruturas que carregam corrente da primeira camada; e

iv) uma terceira camada que compreende pelo menos as terceira e quarta estruturas que carregam corrente em que as pelo menos

terceira e quarta estruturas que carregam corrente cada uma compreende uma pluralidade de dentes e em que os dentes das terceira e quarta estruturas que carregam corrente são opcionalmente deslocados tal que os dentes da terceira estrutura que carrega corrente são posicionados entre os dentes da quarta estrutura que carrega corrente;

e em que as pelo menos terceira e quarta estruturas que carregam corrente são posicionadas na terceira camada de modo a estar acima da primeira câmara microfluídica e tal que os dentes da terceira estrutura que carrega corrente são posicionados de modo substancialmente vertical acima ou deslocados a partir dos dentes da primeira estrutura que carrega corrente e os dentes da quarta estrutura que carrega corrente são posicionados de modo substancialmente vertical acima ou deslocados a partir dos dentes da segunda estrutura que carrega corrente;

em que os dentes têm uma haste tendo ponta substancialmente elíptica.

Em uma variação deste aspecto, é fornecido um dispositivo microfluídico que compreende;

i) uma entrada;

ii) uma primeira camada que compreende pelo menos um primeira estrutura que carrega corrente que compreende uma pluralidade de dentes;

iii) uma segunda camada que compreende uma primeira câmara microfluídica em comunicação fluida com a entrada e posicionados acima das pelo menos primeira e segunda estruturas que carregam corrente da primeira camada; e

iv) uma terceira camada que compreende pelo menos uma segunda estrutura que carrega corrente que compreende uma pluralidade de dentes;

e em que a segunda estrutura que carrega corrente é

posicionada na terceira camada de modo a estar acima da primeira câmara microfluídica e tal que os dentes da segunda estrutura que carrega corrente são posicionados de modo substancialmente vertical acima ou deslocados a partir dos dentes da primeira estrutura que carrega corrente;

5                                   em que os dentes têm uma haste tendo ponta substancialmente elíptica.

Pode ser observado que esta variação difere na medida em que a primeira e terceira camadas do dispositivo cada uma compreende uma estrutura que carrega corrente, ao invés da primeira e segunda e terceira e  
10                                   quarta estruturas que carregam corrente respectivamente. Isto entretanto não impede a inclusão possível de outras estruturas que carregam corrente na primeira e terceira camadas.

A estrutura que carrega corrente da primeira ou da terceira camadas pode ser orientada para incluir alterações ou mudanças na direção tal  
15                                   que dentes individuais da estrutura possam ser orientados tal que eles estejam frente a frente entre si. Os dentes individuais também podem ser deslocados entre si.

No seguinte debate do primeiro aspecto da invenção (que inclui dispositivos de acordo com cada variação como definido acima) será  
20                                   entendido que as características preferidas descritas podem ser aplicadas *mutatis mutandis* a cada versão deste aspecto da invenção.

Será entendido que o termo deslocado abrange uma faixa de espaçamentos possíveis para os dentes das primeira e segunda estruturas que carregam corrente. Os dentes por exemplo podem ser regularmente espaçados  
25                                   e com o mesmo intervalo espacial entre os dentes na primeira e na segunda estruturas que carregam corrente, embora esta necessidade não seja o caso. Os dentes da primeira estrutura que carrega corrente por exemplo podem ser deslocados tal que estejam presentes na metade do caminho entre os dentes da segunda estrutura que carrega corrente ou alternativamente uma outra fração

da distância entre os dentes. O termo deslocado também abrange o espaçamento irregular entre os dentes das estruturas que carregam corrente e entre as próprias estruturas que carregam corrente.

5 Dentes serão entendidos referir-se às projeções ao longo do caminho da estrutura que carrega corrente. A forma de cada um dos dentes portanto pode compreender outras formas e estrutura, por exemplo a porção de haste da projeção pode terminar em uma ponta elíptica.

10 As estruturas que carregam corrente podem ser do tipo descrito como “tipo chave” ou “tipo chave de volta múltipla”. Os esboços espaciais dos exemplos de tais configurações são ilustrados nas figuras 18 a 20.

Será entendido que o termo elíptica refere-se a uma ponta tendo uma conformação ovóide ou circular. Em uma forma de realização preferida, a ponta é circular.

15 Os inventores descobriram que a configuração elíptica dos dentes do dispositivo resulta em um campo magnético que é mais uniformemente distribuído em torno do dente, quando comparado com outras formas de dente, tais como triangular, onde o campo magnético é mais forte apenas na ponta.

20 Preferivelmente, as estruturas que carregam corrente são embutidas na primeira e terceira camadas. Mais preferivelmente, as estruturas que carregam corrente estão entre 0,1  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  abaixo da superfície da primeira e terceira camadas. Ainda mais preferivelmente, entre 0,1  $\mu\text{m}$  e 5  $\mu\text{m}$ . O mais preferivelmente, entre 0,1  $\mu\text{m}$  e 2  $\mu\text{m}$ .

25 Estará evidente para a pessoa habilitada que o dispositivo também pode incluir uma camada altamente permeável (por exemplo, permalloy) localizada dentro ou adjacente à primeira e/ou terceira camadas distal ao microcanal para aumentar o campo magnético gerado pelo dispositivo.

Em uma forma de realização preferida, a primeira câmara

microfluídica é um canal substancialmente reto. Em uma outra forma de realização preferida, o canal substancialmente reto tem uma região tendo dimensões aumentadas que formam uma câmara próxima à entrada.

5 Foi verificado que quando o dispositivo está em uso, esta região atua para aumentar a taxa na qual uma amostra líquida pode ser misturada. Isto é de uso particular onde a amostra é um líquido que é propenso a engrossar ou coagular, por exemplo sangue integral. O uso de sangue como a amostra é de interesse particular em dispositivos que são planejados como uso doméstico ou ponto de uso de assistência, porque a  
10 amostra pode ser facilmente obtida por uma simples picada de agulha.

Em uma forma de realização particularmente preferida a entrada abre diretamente na região tendo dimensões aumentadas e os dispositivos que carregam corrente estendem-se nesta região tal que a mistura caótica da amostra começa imediatamente que a amostra entra no dispositivo.

15 Preferivelmente, a primeira e/ou terceira camadas também compreendem uma quinta estrutura que carrega corrente. Mais preferivelmente, a quinta estrutura que carrega corrente é localizada de modo a estar distal à entrada.

20 Em uma forma de realização preferida a primeira câmara microfluídica forma uma unidade de lise e extração. Em uma forma de realização particularmente preferida o dispositivo é útil para a análise do sangue integral.

Preferivelmente, o dispositivo microfluídico também compreende uma segunda câmara microfluídica em comunicação fluida com  
25 a primeira câmara microfluídica, em que a segunda câmara microfluídica é uma câmara de amplificação. Mais preferivelmente, a câmara de amplificação é uma câmara PCR.

Será entendido que a pessoa habilitada seria capaz de incluir a segunda câmara ao passo que tais câmaras de amplificação são bem

conhecidas na técnica por exemplo como descrito por Young, S. S., *et al* (J. Micromechanics and Microengineering, 2003 13; 768-774).

5 Em uma outra forma de realização, o dispositivo microfluídico compreende uma terceira câmara microfluídica em comunicação fluida com a segunda câmara microfluídica, a dita terceira câmara microfluídica compreendendo um sensor para detectar a presença de um analito.

Em uma forma de realização particularmente preferida, o sensor compreende um dispositivo de indutância mútua.

10 Ainda em uma forma de realização preferida, o dispositivo microfluídico compreende pelo menos uma bomba integrada para efetuar o movimento de um fluido da câmara para a câmara. Preferivelmente, as bombas integradas são bombas magnéticas.

15 Preferivelmente, o dispositivo microfluídico também compreende meios para aplicar uma voltagem a cada uma das estruturas que carregam corrente independentemente em uma ordem predeterminada por um período predeterminado.

Preferivelmente, o período é na faixa de 1 a 10 segundos, mais preferivelmente, menos do que 5 segundos.

20 Preferivelmente, o dispositivo microfluídico também compreende pelo menos um primeiro reservatório de fluido.

Em uma forma de realização, o pelo menos um primeiro reservatório está em comunicação fluida com a primeira câmara microfluídica. Preferivelmente, o pelo menos primeiro reservatório é integrado no dispositivo.

25 Em uma outra forma de realização, a primeira câmara microfluídica forma o primeiro reservatório de fluido.

Preferivelmente, o fluido compreende as pérolas superparamagnéticas. Mais preferivelmente, o fluido também compreende um tampão de lise.

Ainda em outra forma de realização, o dispositivo microfluídico compreende ainda pelo menos uma segunda reservatório de fluido.

5       Estará evidente que o fluido pode compreender outros constituintes, por exemplo, pode opcionalmente compreender um anticoagulante.

De acordo com um segundo aspecto da corrente invenção, é fornecido um sistema *lab-on-chip* para preparar uma amostra que compreende uma molécula biológica, o sistema compreendendo;

- 10       a) o dispositivo de acordo com o primeiro aspecto;  
b) meios para introduzir a amostra e o fluido na primeira câmara microfluídica.

Em uma variação deste aspecto, é fornecido um sistema *lab-on-chip* para preparar uma amostra que compreende uma molécula biológica, o sistema compreendendo;

- 15       a) o dispositivo da variação do primeiro aspecto;  
b) meios para introduzir a amostra e o fluido na primeira câmara microfluídica.

Pode ser observado que esta variação difere na medida em que o dispositivo tratado é o dispositivo de acordo com a variação do primeiro aspecto como acima descrito.

Na seguinte divulgação do segundo aspecto da invenção (que inclui os sistemas que compreendem a variação do dispositivo da invenção) será entendido que as características preferidas descritas podem ser aplicadas *mutatis mutandis* a cada versão deste aspecto da invenção.

25       Preferivelmente, a primeira, segunda, terceira e quarta estruturas que carregam a corrente do dispositivo têm uma voltagem aplicada nestas em uma sequência predeterminada.

Em uma forma de realização preferida, uma quinta estrutura

que carrega corrente age para reter as partículas superparamagnéticas na primeira câmara microfluídica.

5 Será entendido que as partículas superparamagnéticas podem ter qualquer diâmetro preferido, preferivelmente estas têm um diâmetro médio de 50 nm a 10  $\mu$ m. Por exemplo um diâmetro médio de 3  $\mu$ m é pretendido. Outros diâmetros são possíveis.

Preferivelmente, as partículas superparamagnéticas são funcionalizadas de modo a ligar a um analito de interesse. Mais preferivelmente, o analito é um ácido nucleico.

10 Em uma forma de realização preferida o sistema também compreende um segundo reservatório contendo um tampão de lavagem em comunicação fluida com a primeira câmara microfluídica. Ainda mais preferivelmente, o sistema também compreende um terceiro reservatório contendo um tampão de eluição em comunicação fluida com a primeira  
15 câmara microfluídica.

Será entendido que a amostra pode ser qualquer material biológico adequado. Preferivelmente, a amostra compreende pelo menos uma célula. Mais preferivelmente, a amostra compreende uma amostra de sangue integral.

20 Em uma forma de realização preferida, o fluido também compreende um tampão de lise.

Em uma forma de realização ainda mais preferida, o fluido também compreende um anticoagulante.

25 De acordo com um terceiro aspecto da corrente invenção é fornecido um método para o isolamento de um analito que compreende uma molécula biológica de uma amostra, o dito método que compreende as etapas de:

i) introduzir a amostra na entrada do dispositivo de acordo com o primeiro aspecto:

ii) introduzir um fluido que compreende as partículas superparamagnéticas na primeira câmara microfluídica do dispositivo;

5       iii) aplicar uma voltagem à primeira, segunda, terceira e quarta estruturas que carregam a corrente do dispositivo em uma ordem sequencial predeterminada de modo a causar que as correntes elétricas passem através destas;

10       em que, a etapa i) pode ser realizada antes de, junto com ou subsequentemente à etapa ii); e em que, as ditas partículas superparamagnéticas são funcionalizadas de modo a ligar ao analito de interesse;

      e em que etapa iii) é realizada junto com ou imediatamente depois à etapa i);

15       em que a dita corrente elétrica faz com que as estruturas que carregam corrente se tornem não permanentemente magnetizadas resultando no acionamento magnético das ditas partículas superpara-magnéticas em 3 dimensões dentro da câmara microfluídica, a dita atração magnética das ditas partículas superparamagnéticas resultando na mistura caótica da dita amostra e o dito fluido resultando em uma chance aumentada das partículas superparamagnéticas funcionalizadas entrarem em contato com o analito.

20       Em uma variação deste aspecto, é fornecido um método para o isolamento de um analito que compreende uma molécula biológica de uma amostra, o dito método compreendendo as etapas de:

      i) introduzir a amostra na entrada do dispositivo de acordo com a variação do primeiro aspecto:

25       ii) introduzir um fluido que compreende as partículas superparamagnéticas na primeira câmara microfluídica do dispositivo;

      iii) aplicar uma voltagem às estruturas que carregam a corrente do dispositivo em uma ordem sequencial predeterminada de modo a causar que as correntes elétricas passem através destas;

em que, a etapa i) pode ser realizada antes da, junto com ou subsequentemente à etapa ii); e em que, as ditas partículas superparamagnéticas são funcionalizadas de modo a ligar ao analito de interesse;

5 e em que a etapa iii) é realizada junto com ou imediatamente depois da etapa i);

em que a dita corrente elétrica faz com que as estruturas que carregam corrente se tornem não permanentemente magnetizadas resultando no acionamento magnético das ditas partículas superparamagnéticas em 3  
10 dimensões dentro da câmara microfluídica, o dito acionamento magnético das ditas partículas superparamagnéticas que resultam em uma mistura caótica da dita amostra e do dito fluido resultando em uma chance aumentada das partículas superpara-magnéticas funcionalizadas entrarem em contato com o analito.

15 Pode ser observado que esta variação difere na medida em que o dispositivo tratado é o dispositivo de acordo com a variação do primeiro aspecto como acima descrito.

Na seguinte divulgação do segundo aspecto da invenção (que inclui os sistemas que compreendem a variação do dispositivo da invenção)  
20 será entendido que as características preferidas descritas podem ser aplicadas *mutatis mutandis* a cada versão deste aspecto da invenção.

Como mencionado acima, a configuração elíptica dos dentes do dispositivo resulta em um campo magnético que é mais uniformemente distribuído em torno do dente, como apostado às outras formas de dente, tais  
25 como triangular, onde o campo magnético é mais forte somente na ponta. Isto resulta em uma maior mistura devido ao movimento caótico das pérolas.

Em uma forma de realização preferida o dispositivo também compreende um quinta estrutura que carrega corrente, a quinta estrutura que carrega corrente tendo uma voltagem aplicada à esta subsequentemente à

etapa iii) em que as partículas superparamagnéticas são atraídas a e retidas na quinta estrutura que carrega corrente através das interações magnéticas.

Preferivelmente, a corrente que passa através de cada uma estrutura que carrega corrente e é na faixa de 100 mA a 10A. Mais preferivelmente, 100 mA a 750 mA. Mais preferivelmente, menos do que 500 mA

Em uma forma de realização preferida, o método compreende a outra etapa de introduzir uma solução de lavagem na primeira câmara microfluídica do dispositivo, preferivelmente, uma vez que as partículas superparamagnéticas foram retidas na quinta estrutura que carrega corrente.

O método opcionalmente compreende a outra etapa de introduzir um solução de eluição na primeira câmara microfluídica do dispositivo.

Em uma forma de realização preferida, a voltagem é aplicada a cada um do primeiro, segundo, terceiro e quarto dispositivos que carregam corrente por tempo suficientemente longo de modo a permitir que as pérolas se movam para um local predeterminado na primeira câmara microfluídica.

Em uma forma de realização do método do terceiro aspecto, as estruturas que carregam corrente têm a voltagem aplicada na ordem um, quatro, três, dois. Entretanto, será evidente para a pessoa habilitada que a voltagem pode ser fornecida às estruturas que carregam corrente em qualquer ordem desejada assim como obter uma mistura ótima do fluido que compreende as partículas superparamagnéticas e da amostra.

Em uma forma de realização preferida da corrente invenção a amostra compreende pelo menos uma célula. Mais preferivelmente, a amostra é uma amostra de sangue.

Preferivelmente, quando a amostra compreende pelo menos uma célula, o fluido também compreende tampão de lise e a mistura da amostra com o tampão faz com que a célula lise.

Preferivelmente, o analito é um ácido nucleico. Mais preferivelmente, DNA.

O método do terceiro aspecto preferivelmente compreende uma outra etapa de detectar a presença de o analito.

5 Preferivelmente a velocidade do fluxo da amostra através da primeira câmara microfluídica é na faixa de 20 a 100  $\mu\text{m/s}$ .

De acordo com um quarto aspecto da corrente invenção é fornecido um dispositivo para detectar a presença de um analito em uma amostra, que compreende;

10 i) um indutor mútuo

ii) uma camada isolante tendo uma primeira superfície adjacente ao indutor mútuo em espiral e uma segunda superfície oposta, ii) uma amostra comunicando a camada tendo uma primeira superfície tendo pelo menos uma sonda imobilizada nesta e uma segunda superfície oposta à primeira superfície e posicionada de modo a estar adjacente à segunda superfície da camada isolante,

15 em que o indutor mútuo compreende uma primeira bobina e uma segunda bobina.

20 Em uma forma de realização preferida do quarto aspecto o indutor mútuo compreende uma bobina espiralada circular, uma bobina espiralada em forma quadrada, bobinas espiraladas empilhadas em serpentina ou um condutor do tipo empilhado fortificado.

25 Em uma forma de realização preferida o primeira e segunda bobinas são posicionados tal que a primeira bobina é posicionada verticalmente acima da segunda bobina.

Em uma outra forma de realização preferida, a primeira e segunda bobinas são entrelaçadas.

Será entendido pelo técnico habilitado que a presença do analito é detectada passando-se uma corrente alternada através da primeira

bobina e monitorando a segunda bobina quanto mudanças na voltagem induzida.

Preferivelmente, a sonda é um ácido nucleico. Mais preferivelmente, a sonda é DNA.

5 Em uma forma de realização preferida o dispositivo também compreende uma camada de material de alta permeabilidade adequada, tal como permalloy, localizado adjacente ao indutor de bobina mútuo distal à camada isolante.

10 Preferivelmente, a camada isolante compreende dióxido de silício.

Será entendido que a camada de imobilização pode compreender qualquer material adequado, por exemplo, ouro, agarose ou  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . Preferivelmente, a camada de imobilização compreende ouro.

15 De acordo com um quinto aspecto da corrente invenção, é fornecido um método para detectar um analito em uma amostra líquida, que compreende as etapas de;

a) trazer a amostra contendo o analito em contato com as pérolas magnéticas funcionalizadas de modo a ligar ao analito,

b) isolar as pérolas magnéticas da amostra

20 c) trazer as pérolas em contato com o dispositivo do quarto aspecto, em que a pelo menos uma sonda imobilizada na amostra contendo camada liga ao analito de modo a reter as pérolas magnéticas na superfície;

d) medir a variação na indutância do indutor de bobina mútuo,

25 em que, um aumento na indutância mútua indica a presença de analito na amostra.

Preferivelmente, o analito é um ácido nucleico. Mais preferivelmente, a sonda é um ácido nucleico.

As pérolas magnéticas podem por exemplo ser pérolas paramagnéticas.

A invenção será agora descrita em maiores detalhes com referência às seguintes figuras, em que:

A Figura 1, é um vista expandida de um dispositivo microfluídico de acordo com o primeiro aspecto.

5 A Figura 2, mostra uma representação diagramática da configuração das estruturas que carregam corrente que formam uma unidade de mistura em uma camada do dispositivo.

A Figura 3, mostra um dente de uma estrutura que carrega corrente mostrando a variação na intensidade do campo magnético.

10 A Figura 4a, mostra uma representação diagramática de um dispositivo *lab-on-chip* que compreende o dispositivo microfluídico de acordo com o primeiro aspecto

A Figura 4b, mostra uma representação diagramática de uma forma de realização do dispositivo de acordo com o primeiro aspecto.

15 A Figura 5 mostra uma representação do método de Sprott para calcular o componente de Lyapunov.

As Figuras 6a e 6b, mostram a advecção das células dentro de três unidades de mistura e meia, a) sem perturbação das células e b) com perturbação magnética.

20 A Figura 7, mostra a advecção caótica simulada de quatro partículas.

A Figura 8, mostra as posições iniciais das partículas individuais para calcular o Expoente de Lyapunov.

25 A Figura 9, mostra a variação do LE maior contra os parâmetros motriz

A Figura 10, mostra a variação da eficiência de rotulação contra os parâmetros motriz

A Figura 11, mostra uma representação diagramática dos parâmetros de acionamento do dispositivo de acordo com a corrente invenção

mostrando o DNA hibridizado identificado com pérolas magnéticas.

A Figura 12, mostra uma representação diagramática do modelo de sensor usado em simulações do esquema a) visto do topo da bobina, b) seção transversal.

5 A Figura 13, mostra um modelo elétrico do sensor.

A Figura 14, mostra a mudança em porcentagem na indutância da bobina contra o diâmetro da bobina externo para permeabilidades diferentes da pérola.

10 A Figura 15a, é um gráfico que mostra o diâmetro de bobina externo ótimo em que o sinal de saída é maximizado contra a permeabilidade da pérola para diferentes valores de espessura do condutos.

A Figura 15b, é um gráfico que mostra a mudança da indutância maximizada correspondente em porcentagem para os indutores da Fig 15a.

15 A Figura 16a, é um gráfico que mostra o diâmetro da bobina externo ótimo em que o sinal de saída é maximizado contra a permeabilidade da pérola para diferentes frequências.

A Figura 16b é um gráfico que mostra a voltagem do sensor maximizada correspondente para as frequências da Fig 16a.

20 A Figura 17 mostra um chip de extração de DNA de acordo com a presente invenção em vista expandida.

A Figura 18 mostra uma vista tridimensional de um arranjo de eletrodos do tipo chave.

25 A Figura 19 mostra as dimensões do arranjo de eletrodos do tipo chave.

A Figura 20 mostra um arranjo de eletrodos do tipo chave de múltiplas rotações (dimensões: mesmas da Fig. 19, exceto que a extensão de cada rotação é de 100 micrômetros, o interespaçamento entre as rotações é de 50 micrômetros e a espessura de  $< 100$  micrômetros)

A Figura 21 mostra uma fotografia do chip de conceito de prova.

5 A Figura 22 mostra os resultados do PCR realizado nas amostras preparadas usando o chip de conceito de prova como mostrado na Figura 21.

A Figura 23 mostra um modelo elétrico de um indutor duplo que apresenta a resistência e indutância de enrolamentos primário e secundário.

10 A Figura 24 mostra tipos comuns de indutores duplos planares [Fig 24 (a) & (b) enrolamentos do tipo empilhado, Fig 24(c) & (d) enrolamentos inter-enrolados]

A Figura 25 mostra bobinas espiraladas empilhadas de forma quadrada adequados para o uso como indutores duplos planares na detecção do dispositivo da invenção

15 A Figura 26 mostra bobinas espiraladas de serpentina empilhada adequados para o uso como indutores duplos planares na detecção do dispositivo da invenção

20 A Figura 27 mostra condutores do tipo empilhado fortificados adequados para o uso como indutores duplos planares na detecção do dispositivo da invenção

#### Descrição Detalhada

O micromisturador 10, como apresentado na Fig. 1 compreende uma camada de base 12 formada de vidro tendo três condutores de serpentina 14, 16, 18 nesta embutidos. Uma camada central 20 formada de PDMS que compreende um canal reto 22 que está localizado acima dos condutores de serpentina 14, 16, 18 e uma camada superior 24 formada de vidro tendo dois outros condutores de serpentina 26, 28 nesta embutidos, duas portas de entrada 30, 32 e uma porta de saída 36.

25

Um exemplo das dimensões do dispositivo é apresentado na

Fig. 2 onde uma vista do topo de uma unidade de mistura com seus limites é ilustrada. Cada unidade de mistura compreende dois dentes adjacentes de cada condutor. O canal 22 é tem 150  $\mu\text{m}$  de largura e 50  $\mu\text{m}$  de profundidade. Os condutores 14, 16 estão na forma de dentes 38 tendo extremidades circulares 40 e tem 35  $\mu\text{m}$  de altura e 35  $\mu\text{m}$  de largura na seção e as distâncias entre os centros das extremidades circulares 40 dos condutores são de 100  $\mu\text{m}$  e 65  $\mu\text{m}$  nas direções x e y, respectivamente. Cada fileira dos condutores superiores e inferiores 14, 16 é conectada ao fornecimento de energia alternadamente. O ciclo da operação de mistura consiste de duas fases. No primeiro semi-ciclo, um dos arranjos do condutor ligado enquanto o outro está desligado. No próximo semi-ciclo, a condição dos arranjos do condutor é modificada em sentido oposto. Cada unidade de mistura consiste de dois dentes adjacentes 38 a partir dos arranjos do condutor opostos e o misturador é composto de uma série de tais unidades de mistura que são conectadas juntas. Em uma configuração 3-D, o chaveamento entre os condutores ocorrerá a cada 0,25 de um ciclo.

A Fig. 3 mostra um dente 38 com o campo magnético gerado próximo à ponta circular 40 do condutor quando uma corrente de 750 mA é injetada no arranjo do condutor e é desligada no arranjo oposto durante um semi-ciclo de ativação. O mapa em escala cinza representa as variações na intensidade do campo magnético a 10  $\mu\text{m}$  acima da superfície do condutor onde a magnitude máxima do campo é de cerca de 6000 A/m no centro da ponta circular (ponto P). A força máxima (5,5 pN) é aplicada nas partículas próximas ao condutor e dentro do círculo desta ponta onde a intensidade do campo magnético está no seu valor máximo. Embora o campo magnético seja máximo no ponto central P, a força nas partículas é relativamente pequena neste ponto. Isto é devido ao fato de que a força magnética é proporcional ao gradiente do campo que é quase constante nas adjacências do ponto P. Na mudança do condutor, a força cai significativamente devido a uma diminuição

dramática no campo magnético que por sua vez afeta o momento magnético.

O dispositivo microfluídico como apresentado nas Figuras 1 e 2 pode ser integrado nos dispositivos “*lab-on-chip*” tais como aqueles apresentados diagramaticamente nas Figuras 4a e b. Na Figura 4a, o dispositivo compreende um dispositivo de preparação de amostra 10, como apresentado na Fig 1, ligado em série a uma câmara de amplificação 50 e uma unidade análise de amostra 60 que compreende um detetor.

A Figura 4b, mostra a dispositivo de preparação de amostra 10 em maiores detalhes. O dispositivo compreende uma entrada para uma microbomba, ligada a uma região de mistura e a uma região de separação distal à entrada.

O uso do dispositivo *lab-on-chip* como apresentado na figura 4 para o isolamento e preparação de uma amostra de DNA envolve quatro etapas incluindo:

- lise celular
- ligação do DNA
- lavagem para purificar/separar os contaminantes
- recolocação em suspensão

As primeiras duas etapas são realizadas no misturador caótico seguido por processos a jusante no separador. Primeiramente, sangue humano e tampão de lise que carrega partícula são introduzidos ao dispositivo, por exemplo, no microcanal, através de duas portas de entrada, por exemplo através da injeção direta, sob gravidade, pela pressão negativa aplicada a jusante ou usando as bombas externas ou microbombas integradas. A mistura das partículas é realizada aplicando-se o campo magnético local e dependente de tempo gerado pelos micro-condutores para produzir a advecção caótica no deslocamento das partículas através das forças magnetoforéticas. Os condutores de alta razão de aspecto embutidos permitem uma corrente relativamente alta para gerar fortes campos magnéticos para mover as

partículas magnéticas. Os condutores tanto no topo quanto no fundo das placas de vidro são necessárias para realizar uma mistura espacial eficiente. Usando uma concentração própria de partículas em um tampão de lise, a advecção caótica das partículas pode ser transferida aos modelos de fluidos, deste modo, misturando o tampão de lise e sangue. Durante a mistura e lise celular, as moléculas de DNA liberadas são adsorvidas na superfície das partículas.

Depois da mistura, a solução inteira é depois fluida a jusante e o DNA intacto/partículas são separados de outros contaminantes usando-se outro condutor de serpentina fabricado no fundo do canal. Nas formas de realização que utilizam uma câmara, o fundo da bobina (ou bobinas) pode ser utilizado para este propósito. Este condutor é ativado por uma corrente DC constante e devido ao campo magnético gerado; as partículas são coletadas na superfície do fundo do canal enquanto outros contaminantes são lavados com o fluxo.

Subsequentemente, o tampão de lavagem é introduzido no canal, que lava e remove os contaminantes restantes. Finalmente, os condutores são desligados e o tampão de ressuspensão é bombeado no sistema e o DNA/partículas purificados são ressubmetidos à suspensão nestes. A amostra pode ser agora usada diretamente para PCR ao passo que o DNA é liberado no aquecimento do complexo DNA/partícula acima de 65° C como requerido por um protocolo PCR padrão.

#### Planejamento do misturador microfluídico caótico

As nano e micropartículas ou pérolas funcionalizadas oferecem uma grande superfície específica para a ligação química e podem ser vantajosamente usadas como um “substrato móvel” para os bioensaios e aplicações *in vivo* (Gijs 2004). Devido à presença de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ou sua forma oxidada magemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), as partículas magnéticas são magnetizadas em um campo magnético externo. Tal campo externo, gerado

por um magneto permanente ou um electromagneto, pode ser usado para manipular estas partículas através de forças magnetoforéticas e deste modo resulta na migração das partículas em líquidos. Devido ao seu pequeno tamanho; que varia de 100 µm até 5 µm (Pankhurst *et al.* 2003), as partículas perdem suas propriedades magnéticas quando o campo magnético externo é removido, apresentando características superparamagnéticas. Esta vantagem adicional foi explorada para a separação de entidades biológicas desejadas, por exemplo, células, DNA, RNA e proteínas, de seu ambiente nativo para análises subsequentes, onde as partículas são usadas como um rótulo para o acionamento. Antes da separação do complexo bio-célula/partícula dos contaminantes, as partículas magnéticas devem ser distribuídas por toda a solução bio-fluídica que contem as células alvo. Isto é feito através de processo de mistura que ajuda a identificar o alvo com as partículas. No próximo estágio, somente aquelas células ligadas às partículas magnéticas serão isoladas no processo de separação, enquanto o resto da mistura bio-fluídica permanece não afetada pela força magnética. A separação das partículas em microdispositivos com base nas forças magnetoforéticas foi relatado na literatura (Choi *et al.* 2001; Do *et al.* 2004; Ramadan *et al.* 2006).

Todavia, nos dispositivos de micro-escala onde o número de Reynolds é muitas vezes de menos do que 1, a mistura não é uma tarefa trivial devido à ausência de turbulência. Em tais circunstâncias, a mistura conta meramente com a difusão molecular. O coeficiente de difusão para uma solução diluída de esferas relativamente grandes em moléculas esféricas é estimado pela equação de Stokes-Einstein como segue (Mitchell 2004):

$$D = \frac{\kappa_B T}{3\pi\mu d} \quad (1)$$

onde  $K_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura absoluta,  $p$  é a viscosidade dinâmica do solvente e  $d$  é o diâmetro da partícula de difusão. A constante do tempo de difusão é proporcional distância de

difusão ao quadrado ( $t=L^2/D$ ) que pode ser elevada para cerca de  $10^5$  segundos para as partículas com  $1\text{ }\mu\text{m}$  de diâmetro dispersadas em solução de água em difusão com uma distância de  $100\text{ }\mu\text{m}$ . Obviamente, um tal tempo de difusão não é realístico e alguns mecanismos de melhora precisam ser utilizados para facilitar o processo de mistura.

De modo a aumentar o processo de difusão, a (multi-) laminação com tipos diferentes de arranjos de alimentação foi usada em micromisturadores passivos (Koch *et al.* 1999). A idéia é reduzir a escala de duração da difusão usando canais de mistura próximos. As configurações de dividir-e-recombinar (SAR) (Haverkamp *et al.* 1999) também podem aumentar a mistura através da divisão e depois juntando as correntes. Tais configurações criam moldes de multi-laminações consecutivas e aumentam a área interfacial. Entretanto, uma desvantagem de usar a laminação para a mistura dos fluidos que carregam partículas é a alta probabilidade de entupimento em canais próximos. Outro método é gerar a advecção caótica através da fabricação de geometrias e estruturas especiais (por exemplo, obstáculos (Wang *et al.* 2002), canais 3D (Liu *et al.* 2000) e ondulações (Stroock *et al.* 2002)) ou aplicando-se as forças externas (por exemplo, dieletroforético (Deval *et al.* 2002), eletroosmótico (Lin *et al.* 2004), pressão (Deshmukh *et al.* 2000) e campos térmicos (Tsai *et al.* 2002)) em dispositivos passivos e ativos, respectivamente. A advecção caótica aumenta a área interfacial e, conseqüentemente, aumenta o processo de mistura. Recentemente, além da separação, as forças magnetoforéticas são exploradas para aumentar a mistura das partículas na solução (Rida *et al.* 2003); Rong *et al.* 2003; Suzuki *et al.* 2004). Descrevemos aqui o planejamento de um micromisturador magnético com base em partícula caótico e um modelo numérico de modo a caracterizar o dispositivo com diferentes parâmetros motriz. Para esta finalidade, uma combinação de modelos electromagnéticos, microfluídicos e de partículas dinâmicas foi usada.

Os condutores são utilizados para produzir forças magnetoforéticas (em seguida, magnéticas) e, deste modo, modelos caóticos na movimentação das partículas e intensificar a rotulação das bio-células. Dois fluxos, a suspensão de células alvo e tampão que carrega partículas, são introduzidos no canal e manipulados através do fluxo movido a pressão (ver a Fig. 2). Enquanto as células seguem o fluxo principal na semi-seção superior do canal (transportadas por convecção do bio-fluido em suspensão), a movimentação das partículas magnéticas é afetada tanto no campo de fluxo adjacente quanto no campo magnético dependente de tempo localizado gerado pela ativação periódica de dois arranjos de serpentina do condutor. As partículas de várias posições nos lados a montante e a jusante são ligadas para o centro da ponta ativada mais próxima onde o campo magnético máximo existe. Os modelos caóticos são produzidos na movimentação das partículas através da utilização de uma geometria estrutural própria e a injeção de corrente periódica nos condutores, aumenta deste modo a difusão das partículas no canal.

A força magnética nas partículas é uma função do gradiente do campo magnético externo e da magnetização da partícula. Em água desionizada, a força magnética projetada na partícula na área linear é descrita por:

$$r_p = \int V_p \cdot dt = \int (V_f + \frac{F_m}{3\pi\mu d}) \cdot dt$$

onde:  $d$  é o diâmetro da partícula esférica

$H$  é o campo magnético externo

$F_m$  é força magnética

$\mu_r$  é a permeabilidade relativa da partícula

$\mu_0$  é a permeabilidade do vácuo

A força magnética é aplicada junto com o gradiente do campo externo e as partículas são atraídas para as regiões de campo magnético mais

altas. A permeabilidade relativa e o diâmetro da partícula de referência usada neste estudo (M-280, Dynabeads, Dynal, Oslo, Noruega) são de 2,83  $\mu\text{m}$  e 1,76, respectivamente.

Deve ser mencionado que a força magnética é tri-dimensional e o componente z da força é decrescente, que junto com a gravidade, puxa as partículas na direção do fundo do canal e restringe o seu movimento a um padrão bidimensional. De fato, este componente não tem nenhuma contribuição para o movimento caótico das partículas e é assumido não ser influente sobre o processo de mistura. Portanto, neste estudo as forças planares próximas à superfície do fundo do canal são de interesse e o procedimento de simulação é conduzido em uma base bidimensional.

O movimento das partículas em relação ao meio pode ser assumido como um fluxo rastejante e portanto, a força de arrasto sobre as partículas pode ser avaliada pela lei de Stokes. A velocidade da partícula devido às forças magnética e de arrasto pode ser descrita pela segunda lei de Newton:

$$m_p \frac{\partial V}{\partial t} = F_m - 3\pi\mu dV \quad , \quad V_m = \frac{F_m}{3\pi\mu d} \quad (2)$$

onde  $m_p$  é a massa de partícula,  $V$  é a velocidade relativa da partícula com respeito ao fluido,  $t$  é a viscosidade dinâmica e  $d$  é o diâmetro da partícula. O termo  $V_m$  é a velocidade terminal, que é atingida pelas partículas depois de exercer a força magnética. O tempo de relaxamento da partícula ( $\tau = d^2\rho/18\mu$ ) para as partículas usadas (densidade de 1,4  $\text{g/cm}^3$ ) e viscosidade da água na temperatura ambiente (0,001  $\text{kg/ms}$ ), é da ordem de 0,1  $\mu\text{s}$ . Portanto, a fase de aceleração no movimento é negligenciável e a partícula é assumida reagir com as forças magnéticas sem nenhuma demora. A velocidade total da partícula em cada momento ( $V_p$ ) seria a soma da velocidade devido ao campo de fluido ( $V_f$ ) e a velocidade devido ao campo magnético ( $V_m$ ).

Uma simulação numérica bidimensional é realizada assumindo que não exista nenhuma interação magnética ou hidrodinâmica entre as partículas (ligação de uma via) e o movimento das partículas é tratada como se elas estivesse se movendo individualmente. Esta suposição é válida para partículas pequenas em concentração baixa em suspensão, a saber menos do que  $10^{15}$  partículas/m<sup>3</sup> (C. Mikkelsen e H. Bruus, “Microfluidic capturing-dynamics of paramagnetic beads suspensions,” Lab Chip, vol. 5, pp, 1293-7, 2005). O campo de fluido newtoniano (água) e campo magnético dependente do tempo são computados usando o pacote de elemento finito de multifísicas comerciais Comsol (COMSOL, UK) e as velocidades das partículas devido a estes campos são extraídos. Depois as trajetórias das partículas são avaliadas pela integração da soma das velocidades usando o método da integração de Euler em Matlab:

$$r_p = \int V_p \cdot dt = \int (V_f + \frac{F_m}{3\pi\mu d}) \cdot dt \quad (3)$$

As trajetórias das células são obtidas usando o mesmo método de rastreamento de Lagrangian com esta exceção de que as células são magneticamente inativas. Do mesmo modo otimizadas a geometria e as dimensões estruturais (como mencionado mais no início) e também uma magnitude de corrente permissível em que a geração de calor não é um problema (750 mA), obtida de estudos preliminares são considerados como parâmetros constantes e dois parâmetros de acionamento; frequência de ativação magnética e velocidade de fluxo, são variados. A razão da frequência para a velocidade é proporcional ao Número de Strouhal adimensional (St):

$$St = \frac{fL}{V} \quad (4)$$

onde f é a frequência, L é o comprimento característico (aqui, a distância entre dois dentes adjacentes) e V é a velocidade média do fluido.

As simulações são conduzidas para a faixa de  $St = 0,2-1$ . O tamanho das entidades biológicas podem variar de uns poucos nanômetros (proteínas) a

diversos micrômetros (células). Neste estudo, as células são consideradas ser esferas de 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro. A velocidade volumétrica de fluxo é da ordem de 10  $\mu\text{m/s}$ , que produz um número de Reynolds da ordem de  $10^{-3}$ , indicando que o fluxo é laminar.

5 De modo a avaliar quantitativamente o grau de mistura e eficiência do sistema, dois critérios são computados para a faixa investigada de parâmetros de simulação. A eficiência de rotulação das células alvo foi usada como o índice principal para caracterizar o misturador. Este método usa a idéia de monitorar as trajetórias das partículas e células para prognosticar a

10 sua colisão (se alguma) no domínio de mistura (H. Suzuki, *et al*, “A chaotic mixer for magnetic bead-based micro cell sorter,” J. Microelectromech. Syst., vol. 13, pp. 779-90, 2004). É assumido que a colisão acontece quando a distância entre o centro da partícula esférica e a célula se torna menor do que a soma dos seus raios, então a célula é ligada à partícula. A ligação de células

15 múltiplas a uma partícula única é possível e depois de cada colisão as trajetórias das partículas devem ser recalculadas usando novo diagrama de força de corpo livre. Embora a força acionadora seja a mesma para o complexo de célula/partícula (a força magnética é aplicada meramente sobre as partículas), os coeficientes de arrasto precisam ser modificados de acordo

20 com o número das células ligadas. Subsequentemente, a Eficiência de Rotulação (LE), isto é, a razão das células rotuladas para o número total de células admitidas, é calculada em um período específico de processo de mistura.

O suplemento para o índice estabelecido, o expoente de

25 Lyapunov maior (A) foi usado para quantificar a advecção caótica de partículas magnéticas como uma definição comum da qualidade de mistura. Aqui o método de Sprott (J. C. Sprott, *Chaos and Time-Series Analysis*, Oxford University Press, Oxford, 2003) é usado para calcular o expoente de Lyapunov maior (a seguir  $X_1$ ). Este método utiliza a idéia geral de rastrear

duas partículas inicialmente próximas e calcula a taxa logarítmica média de separação das partículas. O procedimento numérico é mostrado na Fig. 5. Para qualquer partícula arbitrária, uma partícula virtual é considerada com uma distância minúscula de  $d(0)$  a partir da partícula escolhida e as trajetórias destas partículas são rastreadas. No final de cada tempo-etapa, a nova distância,  $d(t)$ , entre as partículas real e virtual e também o valor de  $\ln|d(t)/d(0)|$  são calculados. A partícula virtual é depois colocada na distância  $d(0)$  junto com a sua linha de conexão com a partícula real. Depois de repetir este processo por diversos tempo-etapas,  $\lambda_1$  será convergido e é avaliado por:

$$\lambda_1 = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{1}{n\Delta t} \sum_{i=1}^n \ln \frac{|d_i(t)|}{|d(0)|} \quad (5)$$

onde  $\Delta t$  é a duração de um tempo-etapa e  $n$  é o número de etapas. A examination de  $\lambda_1$  para várias partículas revela que no geral depois de um período de 20 s,  $\lambda_1$  aproxima-se do seu valor convergido. Portanto, ambos os índices de LE e  $\lambda_1$  são calculados por um período de 20 s de mistura.

A Fig. 6a ilustra a posição das partículas e células enquanto adverte dentro de três unidades de mistura e meia. As biocélulas (pontos vermelhos, parte superior do diagrama) e partículas magnéticas (pontos azuis, parte inferior do diagrama) entram na primeira unidade de mistura (através da linha A-A) da esquerda nas metades superior e inferior da seção, respectivamente e com a mesma concentração. Quando não existe nenhuma atuação magnética, tanto as células quanto as partículas permanecem na sua seção inicial e simplesmente seguem as direções de fluxo do perfil de velocidade parabólica no fluxo de Poiseuille. Nesta situação, a rotulação pode ocorrer apenas na região central do canal ao longo da interface entre as duas metades. Todas as dimensões são normalizadas para o comprimento característico.

A Fig. 6b ilustra um efeito típico da atuação magnética ( $St =$

0,4,  $V = 40 \mu\text{m/s}$ ) dentro das mesmas unidades de mistura em instantâneos diferentes. Quando o campo externo é aplicado, as partículas viajam através das direções de fluxo assim como a interface. Portanto, elas encontram a oportunidade para espalhar na seção superior onde eles podem atingir e rotular as células. As células magneticamente inativas terão o mesmo comportamento como a situação anterior quando nenhuma perturbação foi aplicada. Como pode ser observado, algumas partículas longe da linha central do canal permanecem na seção mais baixa visto que as forças magnéticas nestas regiões não são fortes o bastante para atraí-las durante o semi-ciclo ativado pelo arranjo mais baixo.

DE modo a explicar a base para a advecção caótica no micromisturador proposto, as trajetórias de quatro partículas como mostrado na Fig. 7 são consideradas como trajetórias típicas no misturador. As partículas são liberadas na primeira unidade de mistura uniformemente com o espaçamento de  $10 \mu\text{m}$  quando  $St = 0,2$  e  $V = 45 \mu\text{m/s}$ . Durante o primeiro semi ciclo, o primeiro arranjo (condutor I) está ligado e o segundo arranjo (condutor II) está desligado. A Partícula I sente uma forte força magnética na direção  $y$  e tende a mover-se nesta direção enquanto é submetida à advecção pela tendência atual na direção  $x$ . Observe que dependendo da sua localização no canal que determina tanto a força de arrasto no fluxo de Poiseuille quanto a força magnética, a partícula I pode ter uma velocidade positiva ou negativa na direção  $x$ . A partícula 2 é mais afastada do condutor I e não encontra nenhuma chance para ser atraída adiante completamente durante o primeiro semi ciclo. Portanto, duas partículas inicialmente próximas divergem induzindo o mecanismo de estiramento que é marcado com um retângulo. Nesta fase a partícula I é exposta às células alvo através de direções de fluxo diferentes e as captura no caso em qualquer colisão.

No semi ciclo seguinte, a corrente elétrica é injetada no condutor II e desligada no condutor I. Nesta fase, a partícula 1 é livre para se

mover da localização anterior e é submetida ainda à advecção pela tendência atual até que se aproxime de uma região de força magnética suficientemente forte e, conseqüentemente, é puxada para o centro do condutor II. A partícula 2 é submetida a uma magnitude pequena de força magnética na direção  $y$  mas tende a mover-se mais rápido do que a tendência atual em virtude da força magnética na direção  $x$ . Nesta fase, a partícula 2 aproxima-se e rotula as células alvo, se alguma, ao longo de uma direção de fluxo. A dobra é obtida onde duas trajetórias distantes convergem e ainda em algumas condições de operação cruzam-se entre si. O estiramento e dobra consecutivos podem ser produzidos deste modo que é a base do caos.

As partículas 3 e 4 que estão muito longe do condutor I para serem atraídas, são arrastadas a jusante pelo fluido e gradualmente se move para a metade superior do canal. Depois de passar umas poucas unidades de mistura, quase todas as partículas penetram a região de células e flutuam em um regime caótico confinado para as pontas dos dois condutores.

Para a computação do expoente de Lyapunov maior, 21 partículas são uniformemente distribuídas na metade superior da primeira unidade de mistura como as posições iniciais e  $(1)$  é calculado para cada partícula individual (ver a Fig. 8). O período de tempo é 20s quando as partículas se aproximam do seu valor constante de  $(1)$ . De modo a quantificar o grau de caos no domínio inteiro na seção superior (onde as células existem), a média de  $(1)$  de 21 partículas é tirada. A Fig. 9 ilustra a variação de LE para parâmetros de acionamento diferentes ( $St = 0,2-1$ ) onde cada gráfico representa os valores de LE para uma velocidade de fluido constante ( $V = 30-50 \mu\text{m/s}$ ). Os resultados para  $(1)$  calculados na mesma faixa de parâmetros de acionamento são mostrados na Fig. 10. As variações globais de  $(1)$  é quase idêntica para velocidades de fluxo de volume diferentes; o caos máximo acontece em  $St = 0,4$ , enquanto que o mínimo ocorre em  $St = 0,8$ . LE exhibe um comportamento similar em números de Strouhal menores do que 0,6 que

significa que um aumento no caos leva a um aumento nas células rotuladas.

Os valores máximos para (1 e LE são realizados em  $St = 0,4$ , que são 0,36 e 67 %, respectivamente. Em números de Strouhal mais altos (a saber 0,8), dois índices mostram variações diferentes. Embora nas velocidades de fluxo de volume altas (maiores do que  $40 \mu\text{m/s}$ ) uma boa conformidade entre dois índices pode ser ainda observada, no caso de velocidades mais baixas elas mostram comportamentos contraditórios. Em velocidades de fluxo baixo, algumas partículas são submetidas à advecção até que elas sejam atraídas para o centro de uma ponta no arranjo condutor superior. Na  
10 vicinidade da parede do canal, a velocidade de fluxo é muito menor do que a região central do canal. Visto que as forças magnéticas são significativamente maiores no centro do condutor, estas partículas serão presas nestas áreas. Mesmo depois da corrente ser comutada para o arranjo oposto, devido à velocidade de fluido baixo, as partículas não terão a oportunidade de escapar  
15 do condutor anterior. Portanto, no período seguinte, as partículas são arrastadas para a mesma região apressadamente e mais uma vez tornam-se aprisionadas. Em tais condições de operação, o misturador é apenas parcialmente caótico e a mistura é incompleta. Entretanto, as partículas aprisionadas atuam como postes fixos, que podem rotular células múltiplas,  
20 aumentando deste modo o valor de LE. Embora a eficiência seja relativamente alta, na prática é um problema desafiante onde as partículas aprisionadas podem entupir o canal. Entretanto, quando o número de Strouhal é baixo, isto é, no caso de períodos de tempo mais longos, as partículas têm a chance para se moverem para fora dos centros, mesmo que a velocidade seja  
25 baixa.

Um estudo numérico bidimensional é realizado de modo a caracterizar a eficiência do micromisturador. A eficiência de rotulação máxima é descoberta ser 67 %. O expoente de Lyapunov como um índice da advecção caótica é descoberto ser altamente dependente do número de

Strouhal onde a concentração caótica máxima é realizada em números de Strouhal próximos a 0,4. É mostrado que a eficiência de rotulação no misturador não pode ser usada como um índice isolado. Portanto, ambos os índices precisam ser levados em conta enquanto se caracteriza o dispositivo.

5                    Fabricação de um dispositivo de acordo com a presente invenção

Os dispositivos de acordo com a presente invenção (também conhecido como chips) podem ser fabricados por exemplo usando blocos de construção básicos em tecnologia MEMS. A tecnologia MEMS tem a  
10                    capacidade para depositar películas finas de materiais sobre o substrato, para aplicar uma máscara padronizada no topo das películas pela formação de imagem fotolitográfica e para gravar as películas seletivamente em relação à máscara. Esta é uma sequência estruturada destas operações para formar o dispositivo real.

15                    O processo MEMS começa com um material de substrato rígido tal como PMMA/Vidro/Silício/Poliestireno. Na superfície de topo do substrato, uma camada de permeabilidade alta (por exemplo, permalloy/Níquel) por exemplo pode ser gravada em relevo ou depositada usando o processo de feixe molecular. Uma camada isolante de  
20                    SiO<sub>2</sub>/PMMA/PDMS/Poliestireno pode ser depois depositada no topo da camada permeável. A estrutura que carrega corrente (também conhecida como uma estrutura em bobina) pode ser galvanizada sobre esta superfície usando uma máscara e litografia. Uma camada fina de PDMS/PMMA/Poliestireno pode ser depois revestida por rotação no topo das  
25                    bobinas para formar uma superfície planar.

Um canal/câmara microfluídicos por exemplo pode ser construído usando um molde de PDMA/PMMA/Poliestireno pré-preparado da espessura desejada, por exemplo de 150 microns e é perfurado desta placa. Esta última estrutura é intercalada entre duas construções de substrato rígido

idêntico contendo os elétrodos em bobina e unidas usando união de plasma. Os orifícios de entrada e saída por exemplo podem ser perfurados ou furados através da estrutura.

Chip de prova de conceito

5 O seguinte debate diz respeito às formas de realização da invenção como ilustradas nas figuras 17 a 22.

Nestas formas de realização um plano fino central de um material apropriadamente biocompatível (por exemplo, PDMS) e de alguns 150 micrômetros em espessura, tem um furo central formado através dele, 10 preferivelmente de formato retangular. O comprimento e largura deste furo são calculados para dar um volume de câmara final apropriado, diga-se de 20 microlitros. Este componente formou a parte central da câmara de lise/mistura principal e é fechada sendo intercalada entre duas camadas de material similar ou compatível de 10 a 100 micrômetros em espessura. Estas placas de 15 cobertura carregam furos para permitir passagens de entrada e saída para a câmara assim formada.

As estruturas que carregam corrente (isto é, uma bobina ou bobinas) são colocados sobre ou em cada uma destas camadas finas, por exemplo tal que elas estejam simetricamente dispostas em torno da cavidade. 20 Ver as Figuras 17 a 20. As conexões para estas bobinas são levadas para as bordas desta estrutura planar compósita.

Tais estruturas que carregam corrente, quando alimentadas com correntes apropriadamente comutadas, farão com que um campo magnético se forme e feche normalmente para o plano principal da cavidade.

25 A força do campo magnético se ainda amplificado pela introdução de um forro de um material magnético apropriadamente permeável, tal como uma liga Permalloy, níquel, metal mu ou similar. Para impedir o contato metálico entre esta camada e as bobinas eletromagnéticas planares, uma camada isolante < 100 micrômetros em espessura é

introduzida.

Finalmente, a montagem inteira é intercalada entre duas placas externas de um material tal como PMMA, que serve para as seguintes funções:

- 1) para dar rigidez estrutural ao sistema
- 2) para atuar como uma ancoragem para orifícios de entrada/saída
- 3) para garantir um ambiente limpo para a rede microfluídica e elétrica incluída neste.

#### Resultados de prova de conceito

A seguinte divulgação diz respeito ao chip de prova de conceito como apresentado na Figura 21 e os resultados obtidos usando o dito chip, como apresentado na Figura 22.

$4 \times 10^6$  células/ml em FCS e tampão de lise contendo pérolas superparamagnéticas (Dynabeads DNA Direct Universal Prod. Nº 630.06) foram usadas para testar este dispositivo. 10 microlitros de cada uma foram liberados diretamente na câmara de lise por intermédio das portas de entrada. As amostras injetadas foram submetidas a uma das seis seguintes condições de mistura por 1 minuto:

- Sem mistura (controle)
- 50 mA      4 HZ
- 100 mA     4 HZ
- 150 mA     4 HZ
- 200 mA     4 HZ
- 200 mA     0,2 HZ

Depois de cada condição de mistura, o DNA ligado às pérolas foi coletado a partir desta câmara de lise, lavado e o DNA adsorvido nas pérolas foi eluído aquecendo-se em um bloco de aquecimento por 5 minutos a 65° C. O sobrenadante (contendo o DNA eluído) foi removido usando um

campo magnético. Um PCR foi realizado nas amostras. Uma hipervariação crescente usada foi uma variação de extensão de DNA de 1 Kb. Os resultados obtidos são mostrados na figura 22.

Estes resultados estão resumidos na seguinte tabela:

Linha	Ajuste	DNA amplificado	Ng/banda
1	Sem mistura	-	-
3	50 mA 4 HZ	+	20
5	100 mA 4 HZ	++	28
8	150 mA 4 HZ	+	<15
9	200 mA 4 HZ	++	28
11	200 mA 0,2 HZ	+	<15

Portanto, usando o dispositivo de acordo com a invenção e as condições de mistura acima descrita, a lise das células ocorreu, subsequentemente permitindo o PCR com sucesso. Ao contrário, sob as condições de controle de sem mistura, o PCR não obteve sucesso. Deste modo os presentes inventores demonstram a mistura de microescala de sucesso misturando a lise das células em menos do que um minuto usando um dispositivo de acordo com a invenção.

#### Esquema do sensor de indutância

Tradicionalmente, a detecção da hibridização do DNA é realizada usando-se identificação fluorescente e técnicas de leitura ótica. Estas técnicas são eficientes nos laboratórios de biologia convencionais onde os protocolos específicos são seguidos pelos técnicos habilitados usando um equipamento caro. Além disso, a detecção convencional do DNA é um procedimento que consome tempo o que adiciona um custo extra ao processo todo. Para resolver esses problemas, esforços consideráveis foram feitos por mais de uma década para miniaturizar e integrar os processos inteiros em um chip único disponível. Embora a detecção do DNA através de métodos óticos é repropenso e bem praticados, isto não pode ser facilmente implementado em chips eletrônicos. Métodos alternativos com potencial para miniaturização foram investigados em anos recentes. Entre estes métodos estão as técnicas eletroquímicas (R. M. Umek *et al.*, "Electronic detection of nucleic acid, a

- versatile platform for molecular diagnostics,” *J. Molecular Diagnostics*, vol. 3, pp. 74 a 84, 2001), sensores piezoelétricos (T. Tatsuma, *et al*, “Multicanal quartz crystal microbalance,” *Anal. Chem.*, vol. 71, Nº 17, pp. 3632 a 3636, setembro de 1999), técnicas com base em impedância (F. Patolsky, *et al*, “Highly sensitive amplified electronic detection of DNA by biocatalyzed precipitation of a insoluble product onto electrodes,” *Chemistry - European Journal*, vol. 9, pp. 1137-1145, 2003) e técnicas de capacidade (E. Souteyrand, *et al*, “Direct detection of the hybridization of synthetic homooligomer DNA sequences by field effect,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 101, pp. 2980-2985, 1997).
- As pérolas magnéticas do tamanho de micron também foram amplamente usadas como rótulos na detecção do DNA (J. Fritz, *et al*, “Electronic detection of DNA by its intrinsic molecular charge” *Proc. Nat. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 22, pp. 14 142-6, 2002) (L. Moreno-Hagelsieb, *et al*, “Sensitive DNA electrical detection based on interdigitated Al/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> microelectrodes,” *Sens. Actuators B, Chem.*, vol. 98, pp. 269-274, 2004) (P. A. Besse, *et al*, “Detection of a single magnetic microbead using a miniaturized silicon Hall sensor,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 80, pp. 4199-4201, 2002). Usar as pérolas magnéticas permite a fácil manipulação do DNA e portanto também pode facilitar os protocolos de mistura e separação (D. R. Baselt, *et al* “A biosensor based on magnetoresistance technology,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 13, Nº 7-8, pp. 731-739, outubro de 1998) (J. C. Rife, *et al* “Design and performance of GMR sensors for the detection of magnetic microbeads in biosensors,” *Sens. Actuators A, Phys.*, vol. 107, Nº 3, pp. 209-218, 2003).

Este exemplo diz respeito a um sensor de detecção de hibridização de DNA que usa pérolas magnéticas ligadas ao filamento do DNA como partículas detectáveis. A concentração aumentada das pérolas magnético devido a hibridização do DNA é detectada na forma de variações de indutância. A resposta de um sensor de bobina espiral planar para

diferentes pérolas magnéticas é investigada e os efeitos da geometria da bobina bem como a frequência no desempenho do sensor são numericamente avaliados. Os resultados e análises matemáticas foram fornecidos para uma bobina poder ser extrapolizada a bobinas múltiplas.

5 O sensor 100 da corrente invenção para a detecção da hibridização do DNA é ilustrado na Fig. 11. O sensor 100 compreende um núcleo 102 que é um indutor espiral planar o qual é colocado entre uma camada de isolamento 104 no topo e uma camada de permalloy 106 no fundo. A camada de isolamento 104 é coberta com uma camada permeável 108 à  
10 qual os DNAs de sonda 110 podem ligar e ser imobilizados. Esta camada pode ser qualquer um dos tratamentos de superfície padrão em revestimento de ouro ou de  $\text{SiO}_2\text{-Si}_3\text{N}_4$ . As pérolas magnéticas funcionalizadas com DNAs alvo 112 são aplicadas a esta superfície. A Hibridização específica do alvo e DNA de sonda resultará a formação de um camada de pérolas magnéticas 112  
15 acima desta superfície 108. Esta camada é de alta permeabilidade magnética e age como uma metade do núcleo magnético para o indutor. A camada de permalloy subjacente 106 age como a outra metade do núcleo magnético e completa o circuito magnético. A formação deste circuito magnético permite que o fluxo magnético passe facilmente e leva a um aumento na indutância da  
20 bobina. Esta propriedade é usada para a detecção do processo de hibridização.

#### Parâmetros que afetam a indutância

A indutância da bobina espiral é uma função de vários parâmetros geométricos bem como físicos. Os parâmetros geométricos importantes como representado na Fig. 12 são definidos como segue:

25  $d_{\text{out}}$ : Diâmetro externo da bobina

$d_{\text{in}}$ : Diâmetro interno da bobina

$t_c$ : Espessura do condutor

$t_p$ : Espessura da camada de permalloy

O efeito da distância inter-enrolada  $S$  e a espessura dos

condutores  $w$  são expressados em termos de fator de enchimento (FF). A permeabilidade relativa das pérolas magnéticas  $\mu_{rb}$ , e a espessura da camada de pérola  $t_B$ , formada depois da hibridização, são os parâmetros físicos que afetam a indutância da bobina.

## 5 Modelo Elétrico do Sensor

O modelo elétrico do sensor é mostrado na Fig. 13. A bobina é acionada por uma fonte de corrente AC e a voltagem da bobina é medida como a saída do sensor. Depois da formação da camada de pérola, a indutância da bobina é aumentada e a saída do sensor,  $V_s$ , será mudada. Esta  
10 amplitude desta voltagem é usada de modo a detectar a hibridização. A amplitude de  $V_s$  pode ser expressada como segue:

$$V_s = \sqrt{R_c^2 + (\omega L_c)^2} I_s \quad (1)$$

A voltagem  $V_s$  é medida e a sua variação normalizada é calculada para indicar a presença da camada de pérola devido à ocorrência de hibridização. A frequência da fonte de corrente pode ser escolhida em uma  
15 faixa onde  $R_c$  é constante. Isto significa que para um sensor particular e frequência de fonte, a voltagem  $V_s$  é meramente dependente da indutância  $L$  e por este motivo, as variações normalizadas de  $V_s$  podem ser calculadas como segue:

$$\delta_{V_s} = \frac{V_s(L_{c2}) - V_s(L_{c1})}{V_s(L_{c1})} \quad (2)$$

Para entender o caminho  $\delta_v$  varia com respeito aos parâmetros geométricos e físicos diferentes explicados acima, as variações em  $L_c$  são  
20 computadas numericamente. Isto é depois usado para determinar como a voltagem da bobina mudará em termos de valores de parâmetro diferentes.

Com base no conceito descrito, um modelo tri dimensional do sensor foi simulado usando o pacote de elemento finito COMSOL FEMLAB  
25 Multiphysics v. 3.2. Detalhes do modelo usado na simulação são mostrados na Fig. 12. O modelo foi simulado para uma camada de pérolas magnéticas

com espessura eficaz de 2  $\mu\text{m}$  e permeabilidades relativas diferentes. As variações normalizadas da indutância da bobina, descritas na Equação 3, é computada numericamente antes e depois da hibridização e os resultados são apresentados na Fig. 14.

$$\delta_L = \frac{L_c(d_{out}, t_c, \mu_{rB}, t_B, t_p) - L_c(d_{out}, t_c, \mu_{rB} = 1, t_B = 0, t_p)}{L_c(d_{out}, t_c, \mu_{rB} = 1, t_B = 0, t_p)} \quad (3)$$

Os gráficos da Fig. 14 mostram como  $\delta_L$  muda com respeito ao diâmetro externo  $d_{out}$  para valores diferentes de  $\mu_{rB}$ . Os valores adotados para outros parâmetros são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Vários parâmetros e seus valores correspondentes que são usados em simulação de indutores ligados.

Parâmetro	Explicação	Quantidade
$t_c$	Espessura do Condutor	20 $\mu\text{m}$
$w_c$	Largura do Condutor	20 $\mu\text{m}$
S	Espaço entre Condutores	30 $\mu\text{m}$
FF	Fator de Enchimento (área ocupada de condutores da bobina para a área total da bobina)	% 80
H	Intervalo entre a bobina e a camada de pérolas que é ocupado com isolante	10 $\mu\text{m}$

Como mostrado na Fig. 14, para cada valor da permeabilidade relativa, a saída do sensor é máxima em um valor específico de  $d_{out}$  que pode ser denotado como  $D_{max}$ . Deve ser observado que o valor de  $D_{max}$  é crescente com respeito a  $\mu_{rB}$  como mostrado pela curva tracejada na Fig. 14.

Para minimizar o efeito de permalloy sobre o sinal, uma camada muito espessa de permalloy ( $\mu_{rp} = 100 \mu\text{m}$ ) foi usada. Também um domínio de espaço grande (7 mm x 14 mm) tem sido adotado de modo a minimizar erros computacionais.

De modo a planejar um sensor com resposta máxima, é útil ter o diâmetro de bobina ideal  $D_{max}$  em termos de permeabilidades de pérola diferentes e espessura de condutor. Os gráficos na Fig. 15a mostram os resultados de simulação para  $D_{max}$  em termos de  $\mu_{rB}$  e  $t_c$ . Uma vez que o diâmetro ideal da bobina e a espessura do condutor são conhecidos, é útil avaliar a magnitude do sinal de saída. Esta informação pode ser derivada dos

gráficos da Fig. 15b que representam a mudança máxima  $\Delta_{L\max} = \delta_L$  (em  $D_{\max}$ ) correspondendo aos valores ideais de  $D_{\max}$  em termos de permeabilidade de pérola e espessura de condutor.

#### O Efeito da Frequência sobre a Saída de Sensor

5 Para observar o comportamento da saída do sensor com respeito à frequência, a quantidade  $\delta_v$  é computada para diferentes permeabilidades de pérola. Os valores de parâmetro são como na Tabela 1 e os resultados da simulação são apresentados na Fig. 16. Para cada valor de permeabilidade e frequência, a saída do sensor é máxima em um valor  
10 específico de  $d_{\text{out}}$  o qual é novamente indicado como  $D_{\max}$ . Os gráficos da Fig. 16a mostram como estes valores são relacionados à frequência. As saídas do sensor correspondentes  $\Delta_v = \delta_v$  (na  $D_{\max}$ ) que são normalizadas por

$$\Delta_{L\max} = \lim_{\omega \rightarrow \infty} (\Delta_{V_r})$$

são representadas em um gráfico na Fig. 16b.

#### Variações no esquema do sensor

15 Uma forma de realização preferida usada no sensor utiliza um arranjo transformador. A figure 23 apresenta um modelo simplificado de um transformador. As resistências em série de  $R_p$  e  $R_s$  são resistências ômicas dos condutores nos enrolamentos primários e secundários, respectivamente. Eqn. (1) apresenta o relação entre os diferentes parâmetros  
20 do modelo.

$$\begin{pmatrix} V_{out} \\ V_{in} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} R_s + X_{L_s} & -X_M \\ -X_M & R_p + X_{L_p} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_s \\ I_p \end{pmatrix} \quad (1)$$

Se o primário é conectado a uma fonte de corrente AC e a voltagem secundária é medida por um dispositivo de alta impedância, a corrente secundária  $I_s = 0$  e a Eqn. (1) reduz para:

$$V_{out} = -X_M I_p \quad (2)$$

Onde  $X_M = \omega M$  é a reactância devido à indutância mútua

indutância  $M$ . Eqn. (2) fornece uma voltagem secundária que depende de  $X_M$  e  $I_p$ . Visto que  $I_p$  é constante, a voltagem secundária medida é uma medição direta d indutância mútua  $M$ . A indutância mútua pode ser expressada em termos de auto-indutâncias de enrolamentos primários e secundários e o fator de ligação  $k_m$  como segue:

$$M = k_m \sqrt{L_p L_s} \quad (3)$$

Se a configuração da configuração do transformador da Figura 24 é adotado, as auto-indutâncias primárias e secundárias são iguais ( $L_p = L_s$ ) e a Eqn. (3) reduz para:

$$M = k_m L_p \quad (4)$$

Substituindo  $M$  da Eqn. (4) em Eqn. (2) produz:

$$V_{out} = -k_m X_{L_p} I_p \quad (5)$$

Como é expressado na Eqn. (5), a voltagem de saída é diretamente propocional a reactância primária (ou secundária) bem como o fator de ligação  $k_m$ . Com base neste resultado e através da simulação em computador, a voltagem de saída é calculada para as bobinas de diferentes diâmetros e a espessura do condutor e desempenho ótimo do sensor foram obtidos por pérolas magnéticas de permeabilidades diferentes.

As simulações foram realizadas para a cobertura completa ideal da superfície do sensor com pérolas magnéticas. Se a cobertura das pérola magnéticas é parcial então o sinal de saída ( $\Delta_{L,max}$ ) e  $D_{max}$  serão proporcionalmente diminuídas.

Além dos esquemas de bobinas circulares, várias outras configurações dos esquemas de bobinas também podem ser utilizadas no sensor. Estes são apresentados nas figuras de 25 a 27.

#### REFERÊNCIAS

R. M. Umek *et al.*, "Electronic detection of nucleic acids, a versatile platform for molecular diagnostics," J. Molecular Diagnostics, vol.

3, pp. 74-84, 2001.

T. Tatsuma, Y. Watanabe, N. Oyama, K. Kitakizaki, e M. Haba, "Multichannel quartz crystal microbalance," *Anal. Chem.*, vol. 71, no. 17, pp. 3632-3636, Set. 1999.

5 F. Patolsky, A. Lichtenstein, I. Willner, "Highly sensitive amplified electronic detection of DNA by biocatalyzed precipitation of an insoluble product onto electrodes," *Chemistry - A European Journal*, vol. 9, pp. 1137-1145, 2003.

10 E. Souteyrand, J. P. Cloarec, J. R. Martin, C. Wilson, I. Lawrence, S. Mikkelsen, e M. F. Lawrence, "Direct detection of the hybridization of synthetic homo-oligomer DNA sequences by field effect," *J. Phys. Chem. B*, vol. 101, pp. 2980-2985, 1997.

15 J. Fritz, E. B. Cooper, S. Gaudet, P. K. Sorger, e S. R. Manalis, "Electronic detection of DNA by its intrinsic molecular charge," *Proc. Nat. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 22, pp. 14 142-6, 2002.

L. Moreno-Hagelsieb, P. E. Lobert, R. Pampin, D. Bourgeois, J. Remacle, D. Flandre, "Sensitive DNA electrical detection based on interdigitated Al/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> microelectrodes," *Sens. Actuators B, Chem.*, vol. 98, pp. 269-274, 2004.

20 P. A. Besse, G. Boero, M. Demirre, V. Pott, e R. Popovic, "Detection of a single magnetic microbead using a miniaturized silicon Hall sensor," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 80, pp. 4199-4201, 2002.

25 D. R. Baselt, G. U. Lee, M. Natesan, S. W. Metzger, P. E. Sheehan, e R. J. Colton, "A biosensor based on magnetoresistance technology," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 13, no. 7-8, pp. 731-739, Oct. 1998.

J. C. Rife, M. M. Miller, P. E. Sheehan, C. R. Tamanaha, M. Tondra, e L. J. Whitman, "Design and performance of GMR sensors for the detection of magnetic microbeads in biosensors," *Sens. Actuators A, Phys.*, vol. 107, no. 3, pp. 209-218, 2003.

H. Suzuki, C. M. Ho, e N. Kasagi, "A chaotic mixer for magnetic bead-based micro cell sorter," *J. Microelectromech. Syst.*, vol. 13, pp. 779-790, 2004.

5 J. Do, J. W. Choi, e C. H. Ahn, "Low-cost magnetic interdigitated array on a plastic wafer," *IEEE Trans. Magnetics*, vol. 40, pp. 3009-3011, 2004.

J. W. Choi, T. M. Liakopoulos, e C. H. Ahn, "An on-chip magnetic bead separator using spiral electromagnets with semi-encapsulated permalloy," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, pp. 409-16, 2001.

10 P. Ramadan, V. Samper, D. Poenar, e C. Yu, "Magnetic-based microfluidic platform for biomolecular separation," *Biomed Microdevices*, vol. 8, pp. 151-8, 2006.

R. Rong, J. W. Choi, e C. H. Ahn, "A novel magnetic chaotic mixer for in-flow mixing of magnetic beads," em *Proc. Of the 7th Int. Conf. on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysts Systems*, California, 2003, pp. 335-8.

T. B. Jones, *Electromechanics of Particles*, Cambridge University Press, Cambridge, 1995.

20 C. Mikkelsen e H. Bruus, "Microfluidic capturing-dynamics of paramagnetic bead suspensions," *Lab Chip*, vol. 5, pp.1293-7, 2005.

J. C. Sprott, *Chaos e Time-Series Analysis*, Oxford University Press, Oxford, 2003.

## REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivo microfluídico de mistura, caracterizado pelo fato de que compreende:

i) uma entrada:

5 ii) uma primeira camada que compreende pelo menos as primeira e segunda estruturas que carregam corrente, em que as pelo menos primeira e segunda estruturas que carregam corrente cada uma compreende uma pluralidade de dentes e em que os dentes das primeira e segunda estruturas que carregam corrente são opcionalmente deslocados tal que os  
10 dentes da primeira estrutura que carrega corrente são posicionados entre os dentes da segunda estrutura que carrega corrente;

ii) uma segunda camada que compreende uma primeira câmara microfluídica em comunicação fluida com a entrada posicionada acima das pelo menos primeira e segunda estruturas que carregam corrente da primeira  
15 camada; e

ii) uma terceira camada que compreende pelo menos as terceira e quarta estruturas que carregam corrente em que as pelo menos terceira e quarta estruturas que carregam corrente cada uma compreende uma pluralidade de dentes e em que os dentes das terceira e quarta estruturas que  
20 carregam corrente são opcionalmente deslocados tal que os dentes da terceira estrutura que carrega corrente são posicionados entre os dentes da quarta estrutura que carrega corrente;

e em que as pelo menos terceira e quarta estruturas que carregam corrente são posicionados na terceira camada de modo a estar acima da primeira câmara microfluídica e tal que os dentes da terceira estrutura que  
25 carrega corrente sejam posicionados de modo substancialmente vertical acima ou deslocados a partir dos dentes da primeira estrutura que carrega corrente e os dentes da quarta estrutura que carrega corrente sejam posicionados de modo substancialmente vertical acima ou deslocados a partir dos dentes da

segunda estrutura que carrega corrente;

em que cada um dos dentes tem uma haste tendo uma ponta substancialmente elíptica.

5        2. Dispositivo microfluídico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as estruturas que carregam corrente são embutidas na primeira e terceira camadas.

3. Dispositivo microfluídico de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que as estruturas que carregam corrente estão 0,1  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  abaixo da superfície da primeira e terceira camadas.

10       4. Dispositivo microfluídico de acordo com qualquer reivindicação precedente, caracterizado pelo fato de que a primeira câmara microfluídica é um canal substancialmente reto.

15       5. Dispositivo microfluídico de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o canal substancialmente reto tem uma região tendo dimensões aumentadas próxima à entrada.

6. Dispositivo microfluídico de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a entrada abre diretamente na região tendo dimensões aumentadas.

20       7. Dispositivo microfluídico de acordo com qualquer reivindicação precedente, caracterizado pelo fato de que a primeira e/ou terceira camadas compreendem ainda uma quinta estrutura que carrega corrente.

25       8. Dispositivo microfluídico de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a quinta estrutura que carrega corrente está localizada de modo a estar distal à entrada.

9. Dispositivo microfluídico de acordo com qualquer reivindicação precedente, caracterizado pelo fato de que a primeira câmara microfluídica forma uma unidade de lise e extração.

10. Dispositivo microfluídico de acordo com qualquer

reivindicação precedente, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma segunda câmara microfluídica em comunicação fluida com a primeira câmara microfluídica, em que a segunda câmara microfluídica é uma câmara de amplificação.

5                    11. Dispositivo microfluídico de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a câmara de amplificação é uma câmara de PCR multiplexada.

10                    12. Dispositivo microfluídico de acordo com qualquer reivindicação precedente, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma terceira câmara microfluídica em comunicação fluida com a segunda câmara microfluídica, a dita terceira câmara microfluídica compreendendo um sensor para detectar a presença de um analito.

15                    13. Dispositivo microfluídico de acordo com qualquer reivindicação precedente, caracterizado pelo fato de que compreende ainda pelo menos uma microbomba integrada para efetuar o movimento de um fluido de uma câmara para segunda câmara.

                      14. Dispositivo microfluídico de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que as bombas integradas são bombas magnéticas.

20                    15. Dispositivo microfluídico de acordo com qualquer reivindicação precedente, caracterizado pelo fato de que compreende ainda meios para aplicar uma voltagem a cada uma das estruturas que carregam corrente independentemente em uma ordem pré determinada e por um período pré determinado.

25                    16. Dispositivo microfluídico de acordo com qualquer reivindicação precedente, caracterizado pelo fato de que compreende ainda pelo menos um primeiro reservatório de fluido.

                      17. Dispositivo microfluídico de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um primeiro reservatório está

em comunicação fluida com a primeira câmara microfluídica.

18. Dispositivo microfluídico de acordo com as reivindicações 16 ou 17, caracterizado pelo fato de que o pelo menos primeiro reservatório é integrado no dispositivo.

5 19. Dispositivo microfluídico de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a primeira câmara microfluídica forma o primeiro reservatório de fluido.

10 20. Dispositivo microfluídico de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 a 19, caracterizado pelo fato de que o fluido compreende pérolas superparamagnéticas.

21. Dispositivo microfluídico de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 a 19, caracterizado pelo fato de que o fluido compreende tampão de lise.

15 22. Dispositivo microfluídico de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 a 21, caracterizado pelo fato de que compreende ainda pelo menos um segundo reservatório de fluido.

23. Dispositivo microfluídico de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 a 22, caracterizado pelo fato de que o fluido opcionalmente compreende um anticoagulante.

20 24. Dispositivo microfluídico, caracterizado pelo fato de que compreende:

i) uma entrada;

25 ii) uma primeira camada que compreende pelo menos uma primeira estrutura que carrega corrente que compreende uma pluralidade de dentes;

iii) uma segunda camada que compreende uma primeira câmara microfluídica em comunicação fluida com a entrada e posicionada acima das pelo menos primeira e segunda estruturas que carregam corrente da primeira camada; e

iv) uma terceira camada que compreende pelo menos uma segunda estrutura que carrega corrente que compreende uma pluralidade de dentes;

5 e em que a segunda estrutura que carrega corrente é posicionada na terceira camada de modo a estar acima da primeira câmara microfluídica e tal que os dentes da segunda estrutura que carrega corrente são posicionados de modo substancialmente vertical acima ou deslocados a partir dos dentes da primeira estrutura que carrega corrente;

10 em que os dentes têm uma haste tendo ponta substancialmente elíptica.

25. Sistema *lab-on-chip* para preparar uma amostra que compreende uma molécula biológica, o sistema caracterizado pelo fato de que compreende:

15 a) o dispositivo como definido em qualquer uma das reivindicações de 20 a 23;

b) meios para introduzir a amostra e o fluido na primeira câmara microfluídica.

20 26. Sistema de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que na primeira, segunda, terceira e quarta estruturas que carregam corrente do dispositivo têm uma voltagem aplicada a ela em uma sequência pré determinada.

25 27. Sistema de acordo com a reivindicação 25 ou reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que uma quinta estrutura que carrega corrente atua para reter as partículas superparamagnéticas na primeira câmara microfluídica.

28. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações de 25 a 27, caracterizado pelo fato de que as partículas superparamagnéticas têm um diâmetro médio de 50 nm a 10  $\mu$ m.

29. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações

de 25 a 28, caracterizado pelo fato de que as partículas superparamagnéticas são funcionalizadas de modo a ligar a um analito de interesse.

30. Sistema de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o analito é um ácido nucleico.

5 31. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações de 25 a 30, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um segundo reservatório contendo um tampão de lavagem em comunicação fluida com a primeira câmara microfluídica.

10 32. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações de 25 a 31, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um terceiro reservatório contendo um tampão de eluição em comunicação fluida com a primeira câmara microfluídica.

15 33. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações de 25 a 32, caracterizado pelo fato de que a amostra compreende pelo menos uma célula.

34. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações de 25 a 33, caracterizado pelo fato de que o fluido compreende ainda um tampão de lise.

20 35. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações de 25 a 34, caracterizado pelo fato de que o fluido compreende ainda um anticoagulante.

36. Sistema *lab-on-chip* para preparar uma amostra que compreende uma molécula biológica, o sistema caracterizado pelo fato de que compreende:

25 a) o dispositivo como definido na reivindicação 24;  
b) meios para introduzir a amostra e o fluido na primeira câmara microfluídica.

37. Método para o isolamento de um analito que compreende uma molécula biológica de uma amostra, o dito método caracterizado pelo

fato de que compreende as etapas de:

i) introduzir a amostra na entrada do dispositivo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 23;

5 ii) introduzir um fluido que compreende partículas superparamagnéticas na primeira câmara microfluídica do dispositivo;

iii) aplicar uma voltagem à primeira, segunda, terceira e quarta estruturas que carregam corrente do dispositivo em uma ordem sequencial pré determinada de modo a fazer com que correntes elétricas passem através;

10 em que, a etapa i) pode ser realizada antes, concomitantemente com ou subsequentemente à etapa ii); e em que, as ditas partículas superparamagnéticas são funcionalizadas de modo a ligar ao analito de interesse;

e em que a etapa iii) é realizada concomitantemente com ou imediatamente depois da etapa i);

15 em que a dita corrente elétrica faz com que as estruturas que carregam corrente se não se tornem permanentemente magnetizadas resultando em atuação magnética das ditas partículas superparamagnéticas em 3 dimensões dentro da câmara microfluídica, a dita atuação magnética das ditas partículas superparamagnéticas que resultam na mistura caótica da dita amostra e do dito fluido que resulta em uma chance aumentada das partículas  
20 superparamagnéticas funcionalizadas entrarem em contato com o analito.

38. Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o dispositivo compreende ainda uma quinta estrutura que carrega corrente, a quinta estrutura que carrega corrente tendo uma voltagem  
25 aplicada a esta subsequentemente à etapa iii) em que as partículas superparamagnéticas são atraídas e retidas na quinta estrutura que carrega corrente através de interações magnéticas.

39. Método de acordo com as reivindicações 37 ou 38, caracterizado pelo fato de que a câmara microfluídica está na forma de um

canal substancialmente reto.

40. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 37 a 39, caracterizado pelo fato de que a corrente que passa através de cada estrutura que carrega corrente está na faixa de 100 mA a 10 A.

5 41. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 37 a 39, caracterizado pelo fato de que a corrente que passa através de cada estrutura que carrega corrente é menor do que 500 mA.

10 42. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 37 a 41, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa adicional de introduzir uma solução de lavagem na primeira câmara microfluídica do dispositivo.

15 43. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 37 a 41, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa adicional de introduzir uma solução de ressuspensão na primeira câmara microfluídica do dispositivo.

44. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 37 a 43, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa adicional de introduzir uma solução de eluição na primeira câmara microfluídica do dispositivo.

20 45. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 37 a 44, caracterizado pelo fato de que a voltagem é aplicada a cada um do primeiro, segundo, terceiro e quarto dispositivos que carregam corrente por tempo suficientemente longo de modo a permitir que as pérolas se movam para uma localização pré determinada na primeira câmara microfluídica.

25 46. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 37 a 45, caracterizado pelo fato de que as estruturas que carregam corrente têm a voltagem aplicada na ordem de um, quatro, três, dois.

47. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 37 a 46, caracterizado pelo fato de que a amostra compreende pelo menos

uma célula.

48. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 37 a 47, caracterizado pelo fato de que o fluido compreende tampão de lise.

5 49. Método de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que a mistura do tampão de lise com a pela menos uma célula faz com que a célula lise.

50. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 37 a 49, caracterizado pelo fato de que o analito é um ácido nucleico.

10 51. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 37 a 50, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa adicional de detectar a presença do analito.

52. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 37 a 51, caracterizado pelo fato de que a velocidade de fluxo da amostra através da primeira câmara microfluídica é de 20 a 100  $\mu\text{m/s}$ .

15 53. Método para o isolamento de um analito que compreende uma molécula biológica de uma amostra, o dito método caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

i) introduzir a amostra na entrada do dispositivo como definido na reivindicação 24;

20 ii) introduzir um fluido que compreende partículas superparamagnéticas na primeira câmara microfluídica do dispositivo;

iii) aplicar uma voltagem às estruturas que carregam corrente do dispositivo em uma ordem sequencial pré determinada de modo a fazer com que as correntes elétricas passem através;

25 em que, a etapa i) pode ser realizada antes, concomitantemente com ou subsequentemente à etapa ii); e em que, as ditas partículas superparamagnéticas são funcionalizadas de modo a ligarem-se ao analito de interesse;

e em que a etapa iii) é realizada concomitantemente com ou

imediatamente depois da etapa i);

em que a dita corrente elétrica faz com que as estruturas que carregam corrente não se tornem permanentemente magnetizadas resultando em atuação magnética das ditas partículas superpara-magnéticas em 3  
5 dimensões dentro da câmara microfluídica, a dita atuação magnética das ditas partículas superparamagnéticas resultando em mistura caótica da dita amostra e o dito fluido resultando em uma chance aumentada das partículas superparamagnéticas funcionalizadas entrando em contato com o analito.

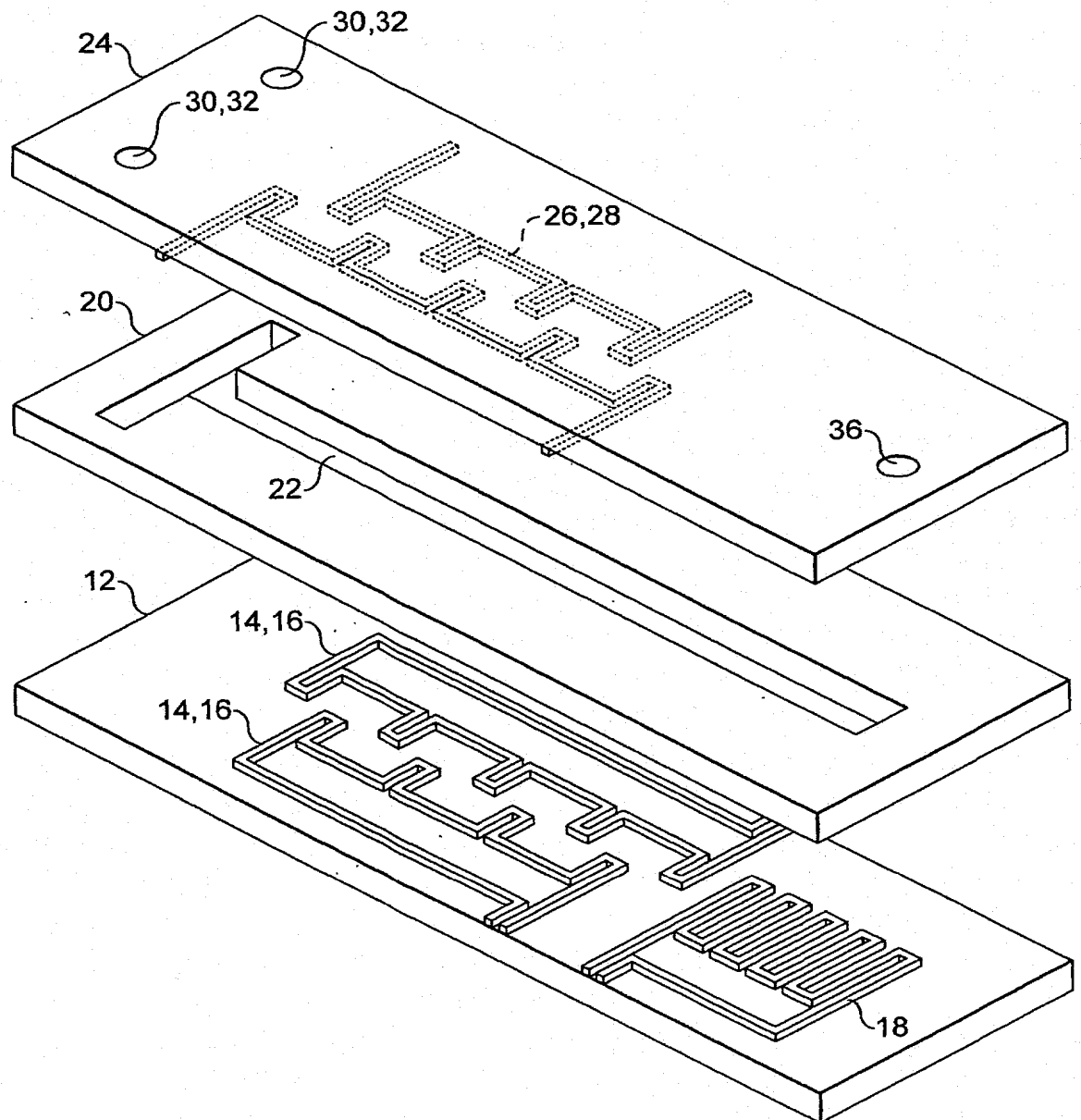


FIG. 1

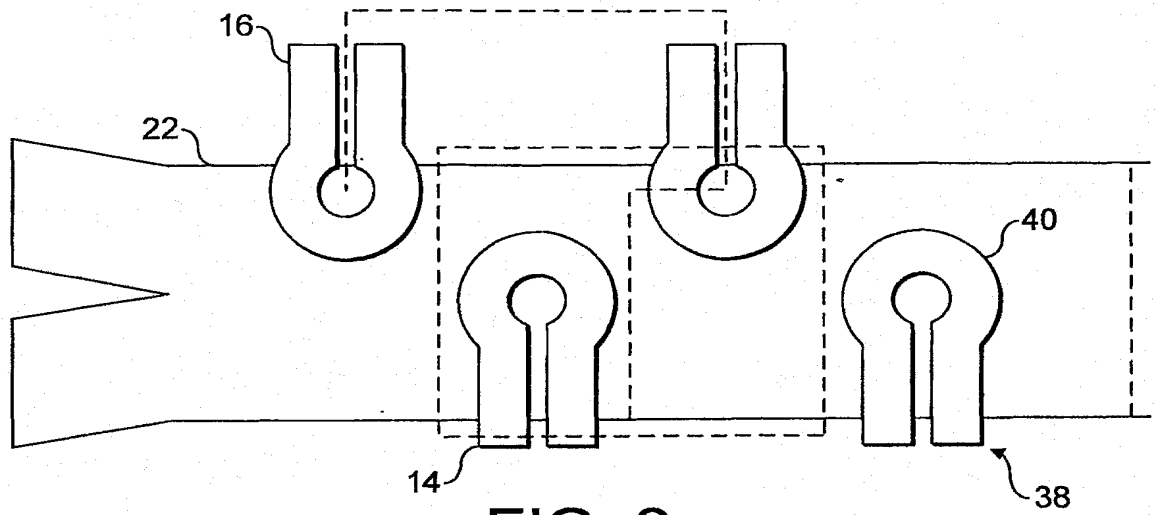


FIG. 2

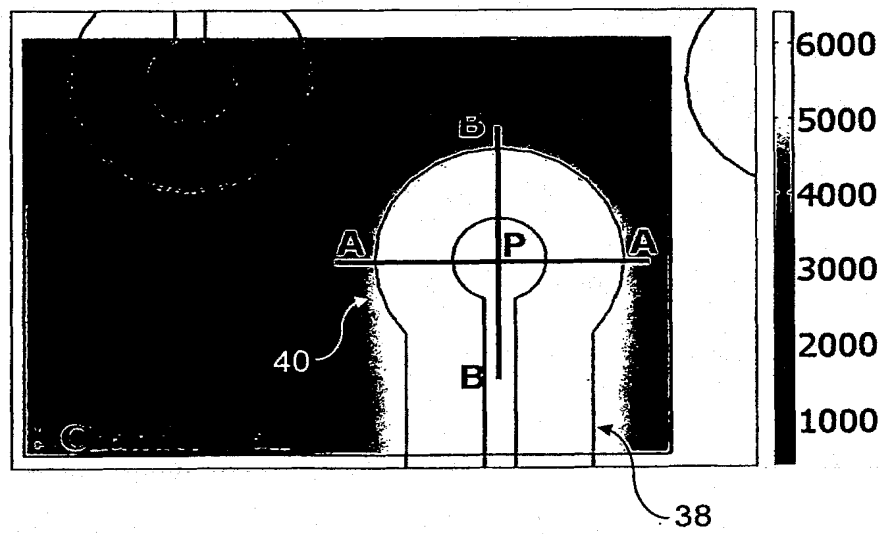


FIG. 3

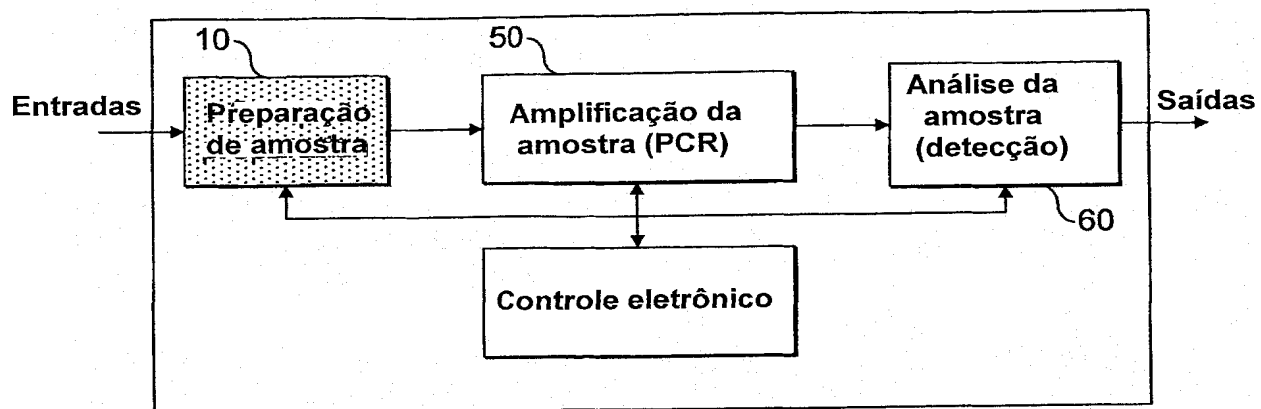


FIG. 4a

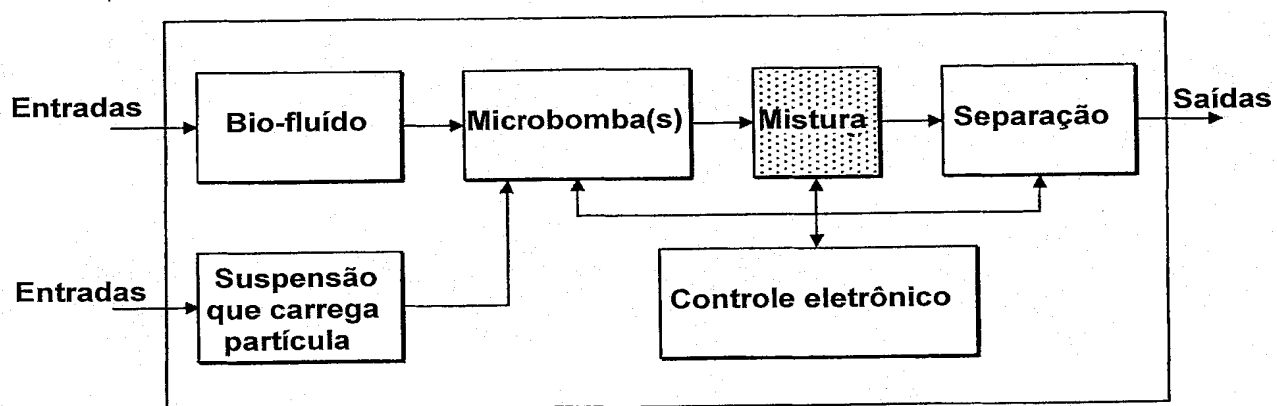


FIG. 4b

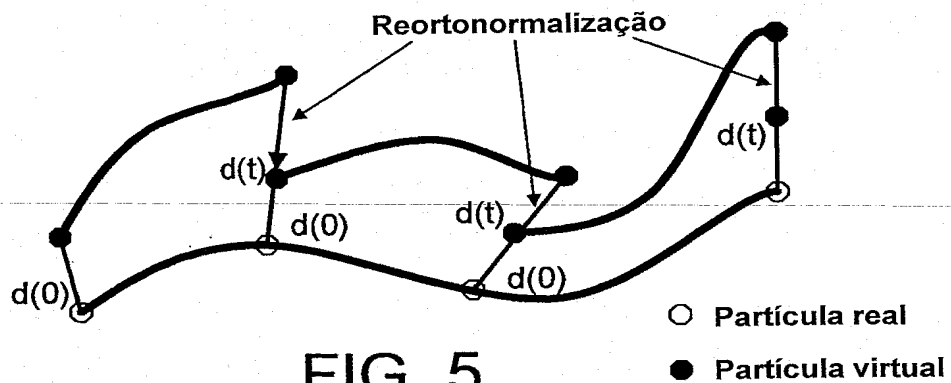
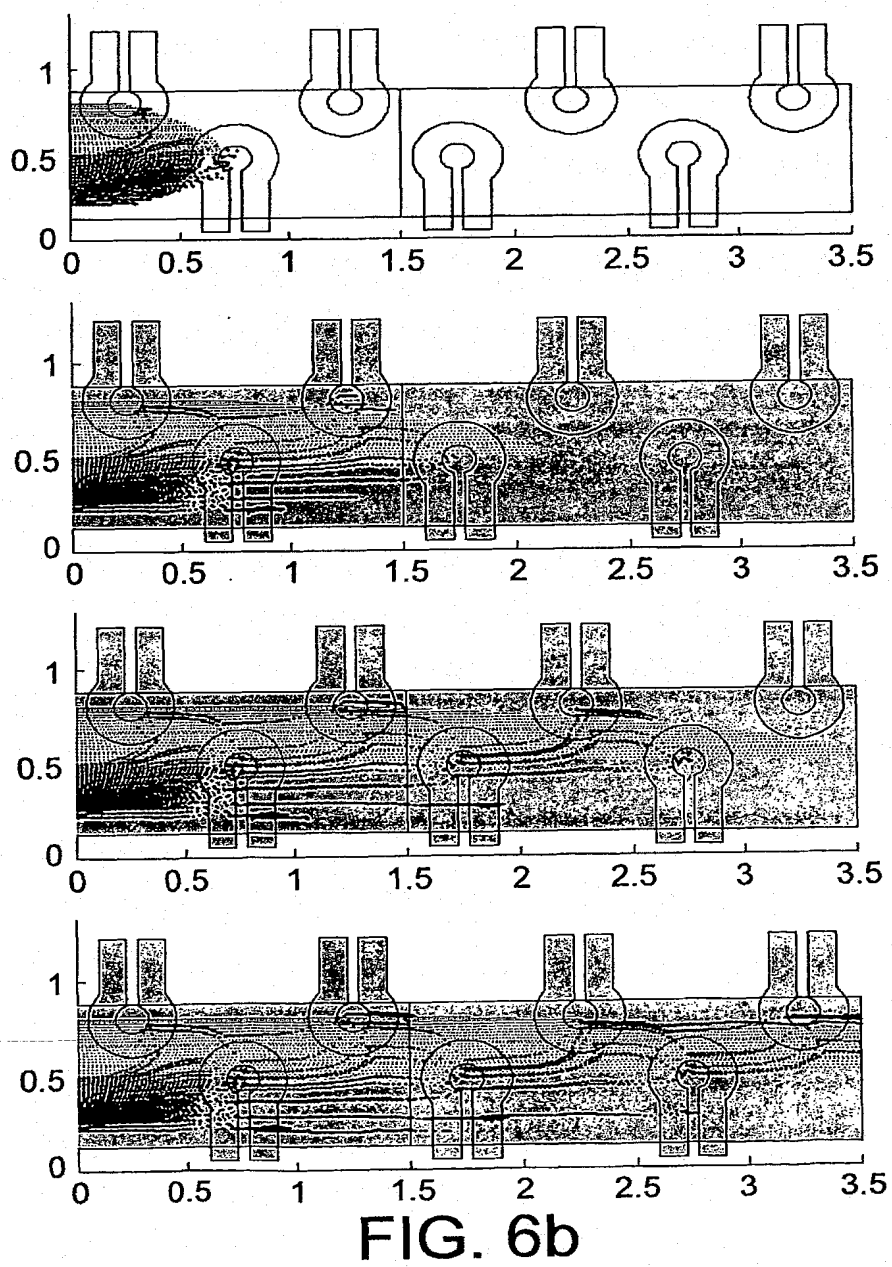
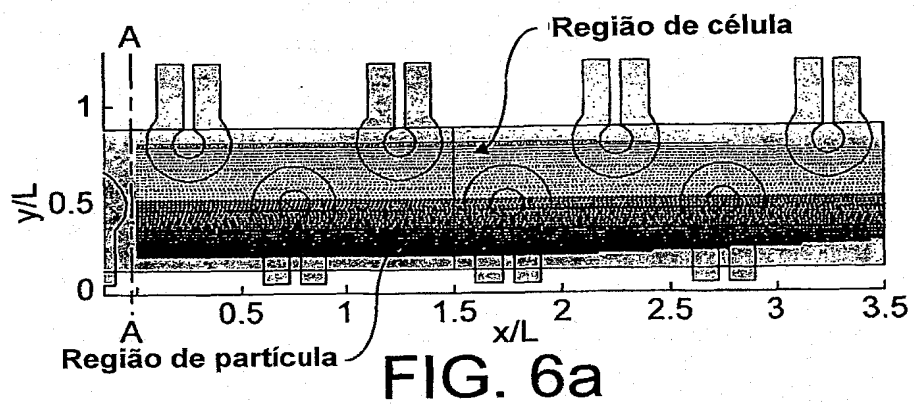


FIG. 5



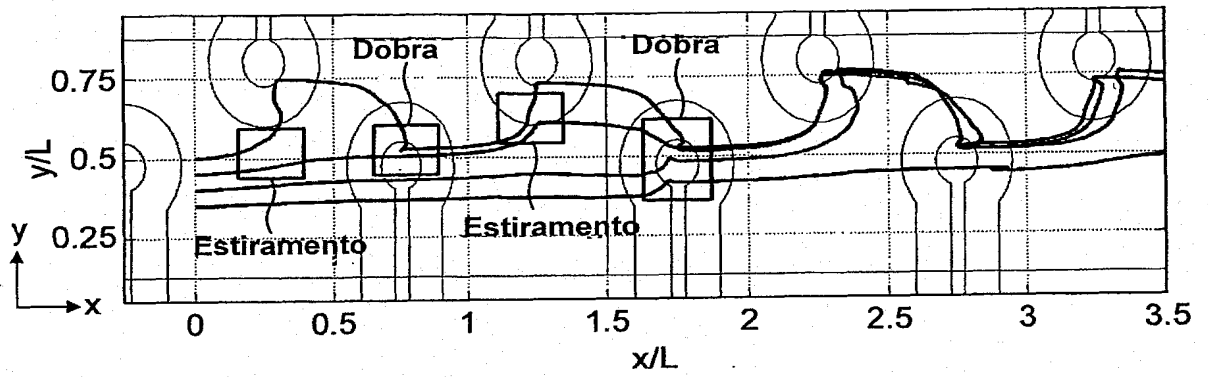


FIG. 7

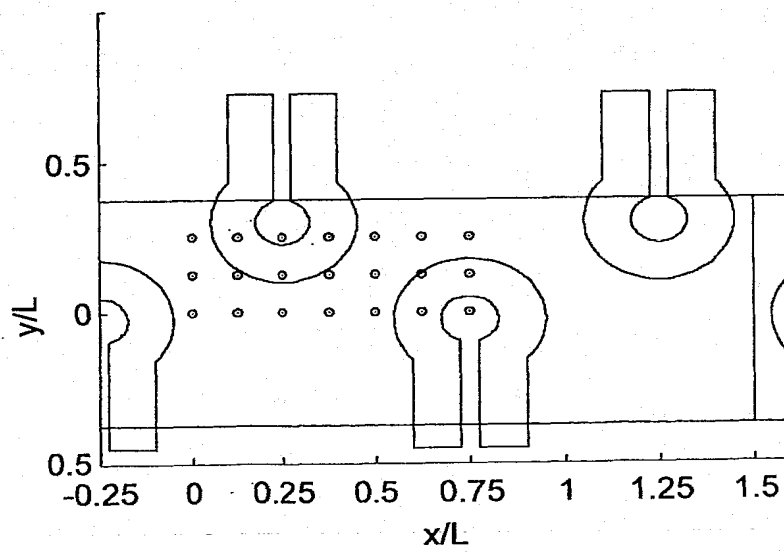


FIG. 8

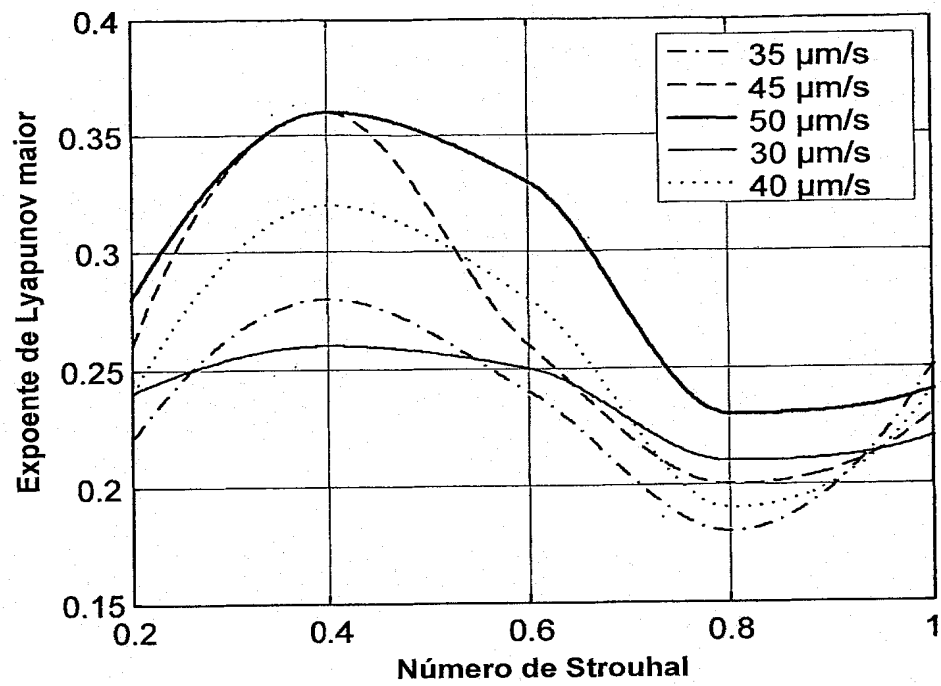


FIG. 9

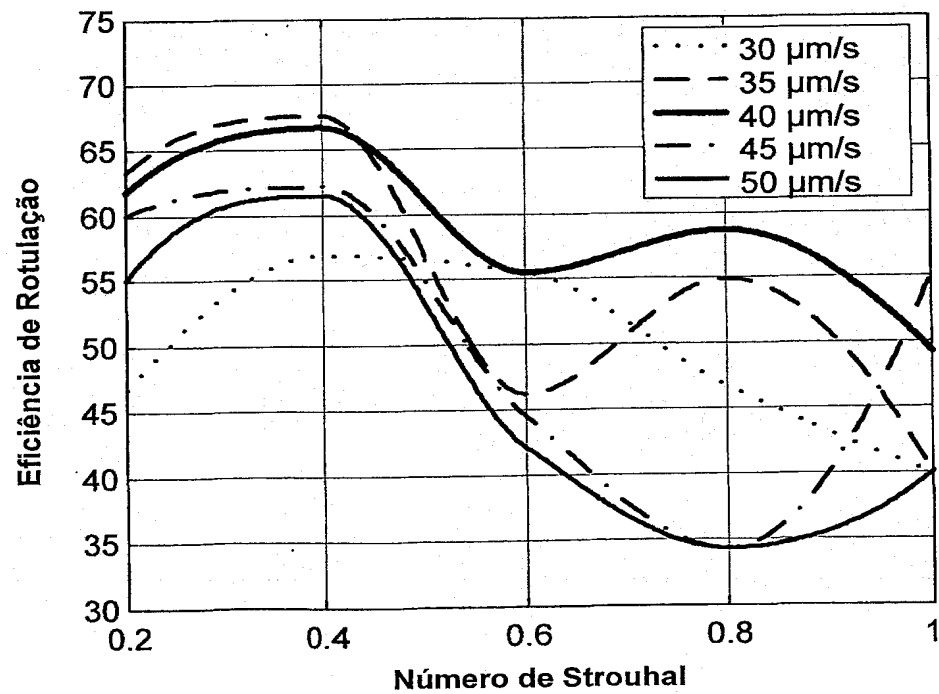


FIG. 10

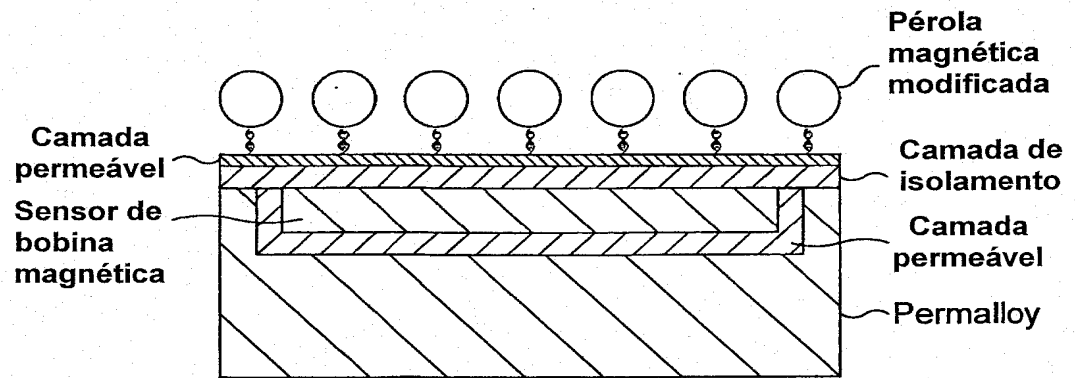


FIG. 11

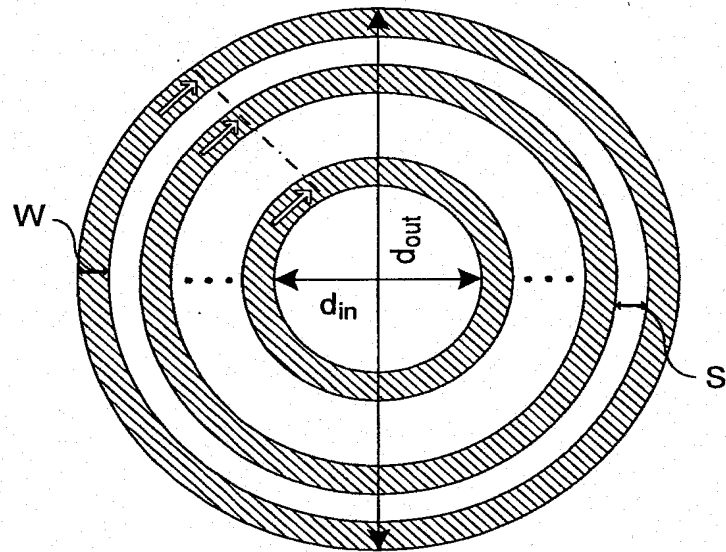


FIG. 12a

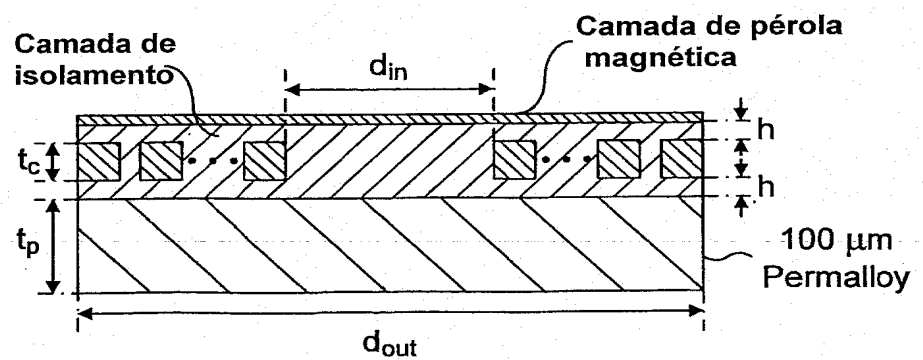


FIG. 12b

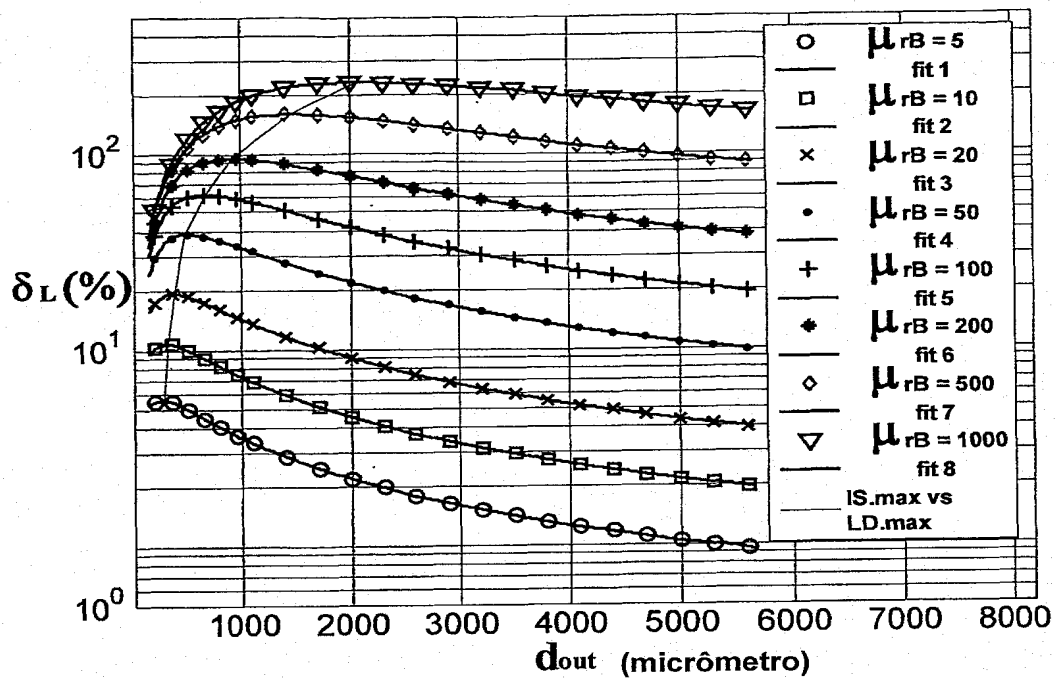


FIG. 14

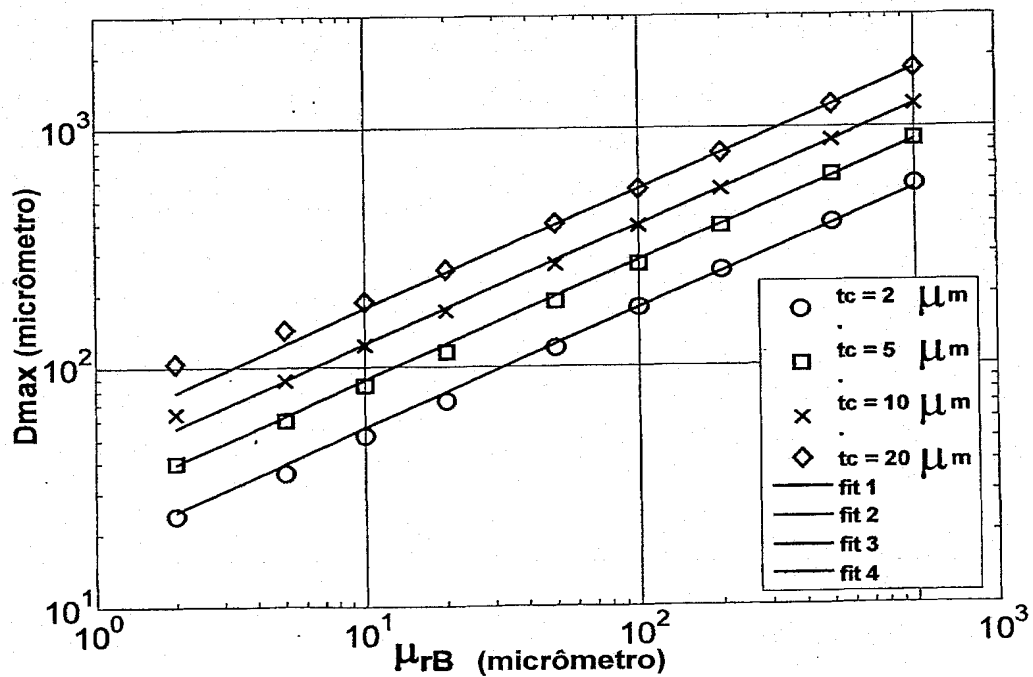


FIG. 15a

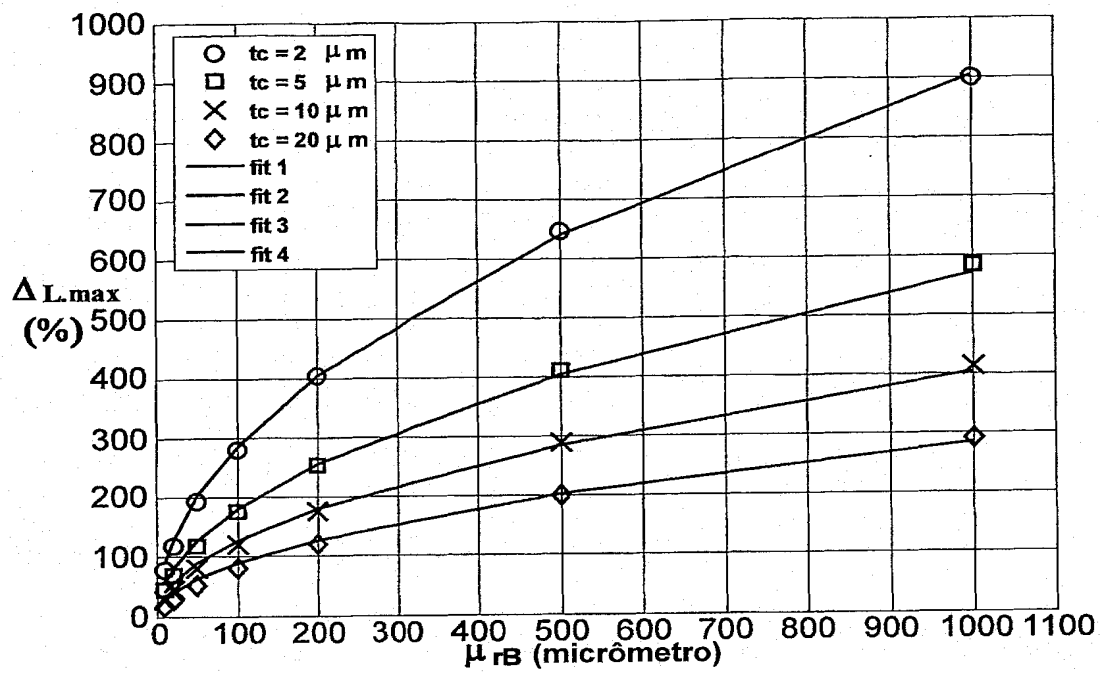


FIG. 15b

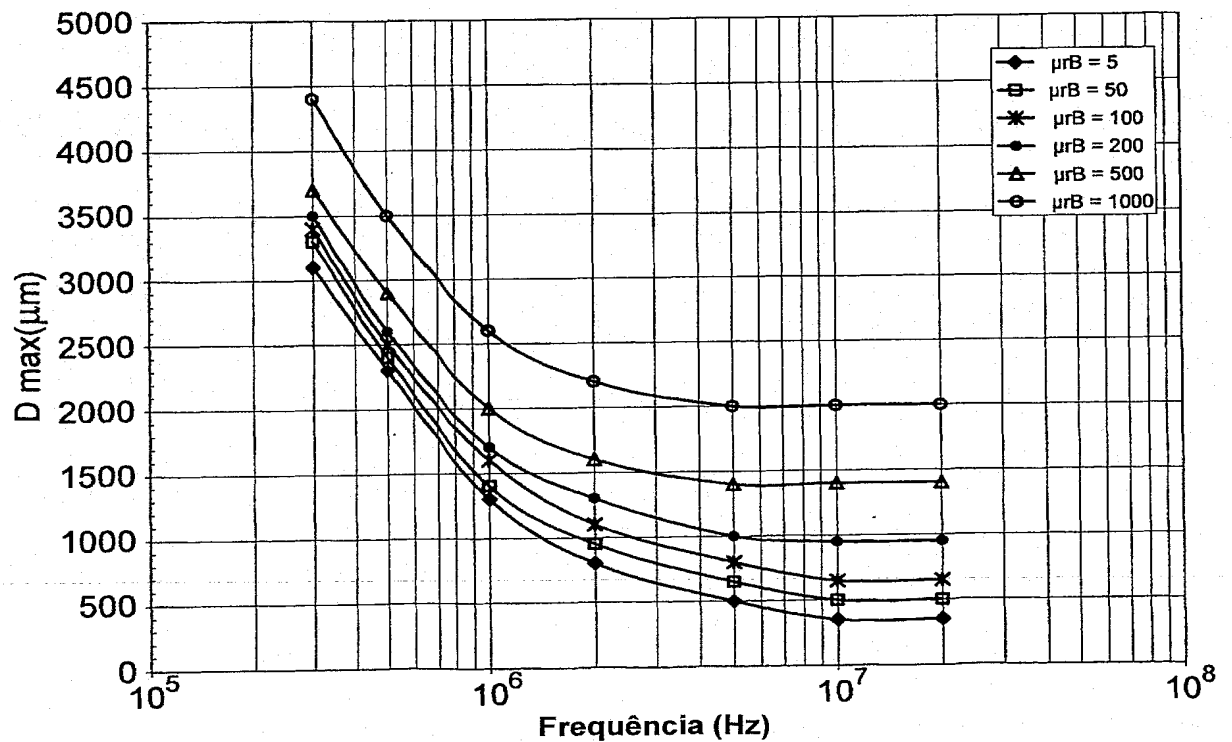


FIG. 16a

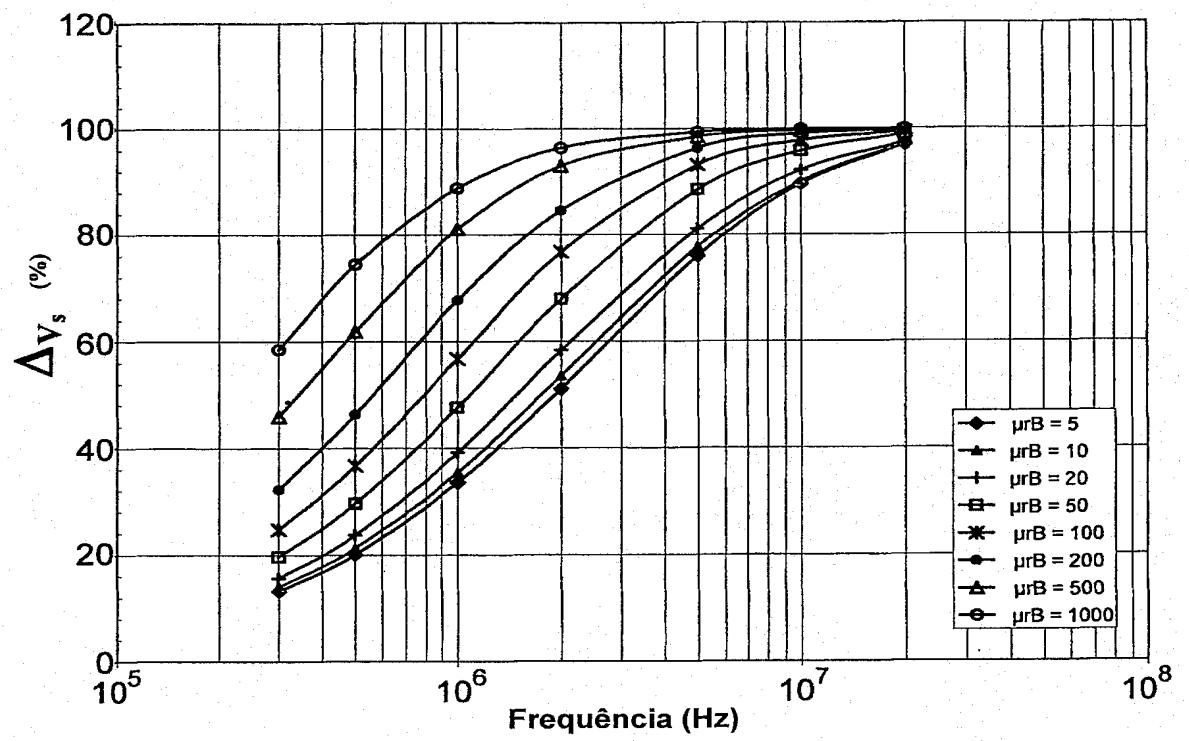


FIG. 16b

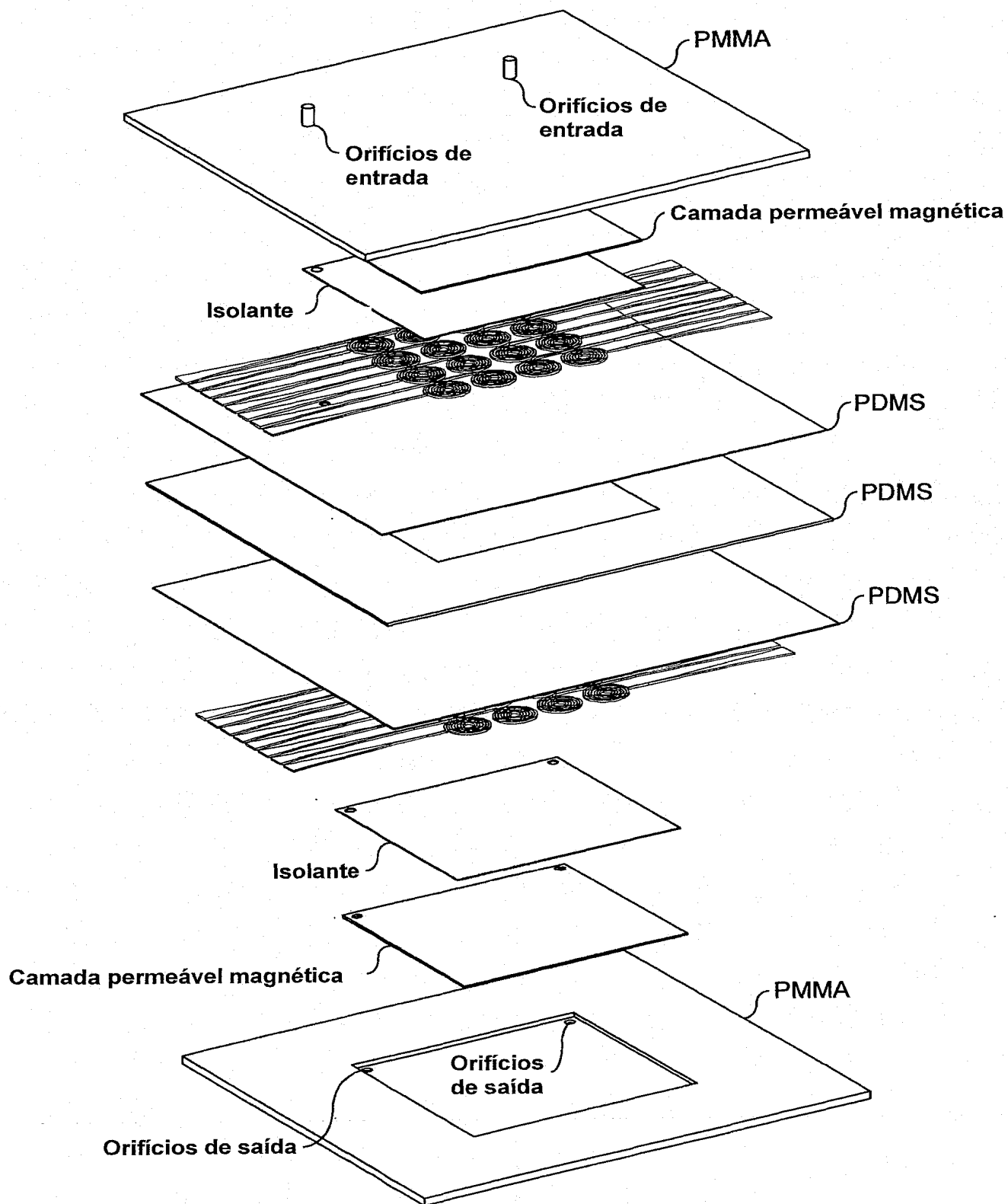


FIG. 17

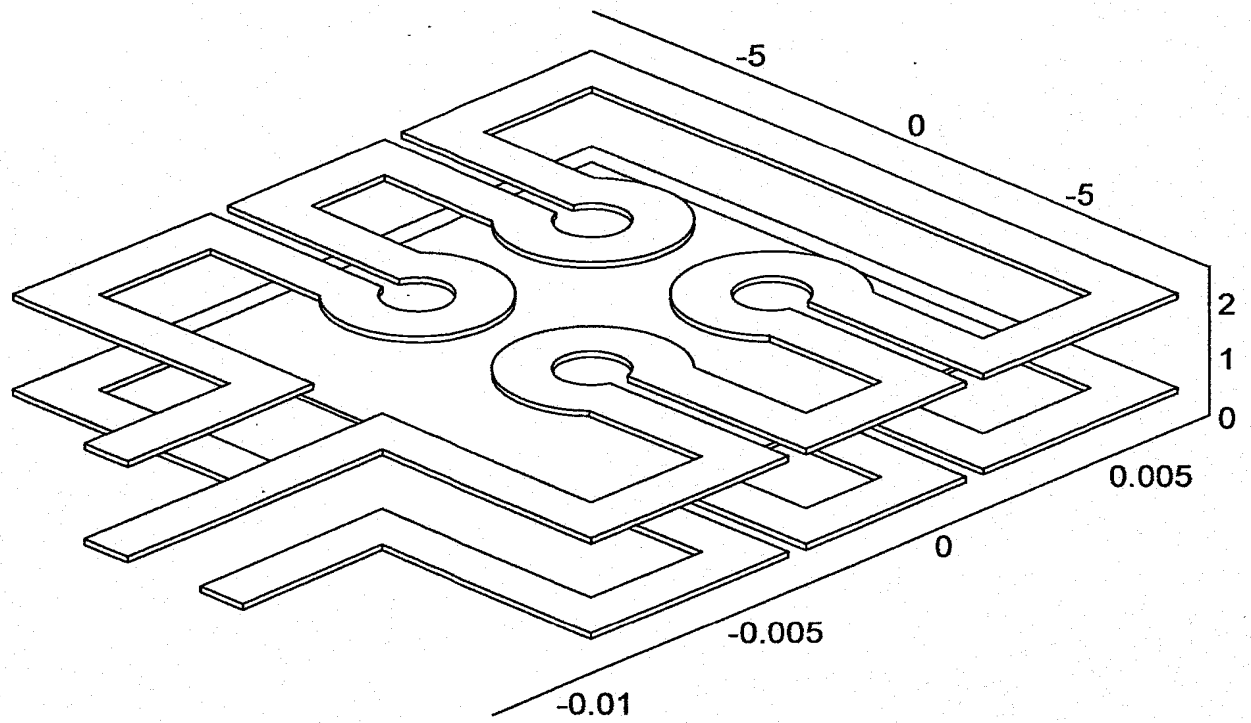


FIG. 18

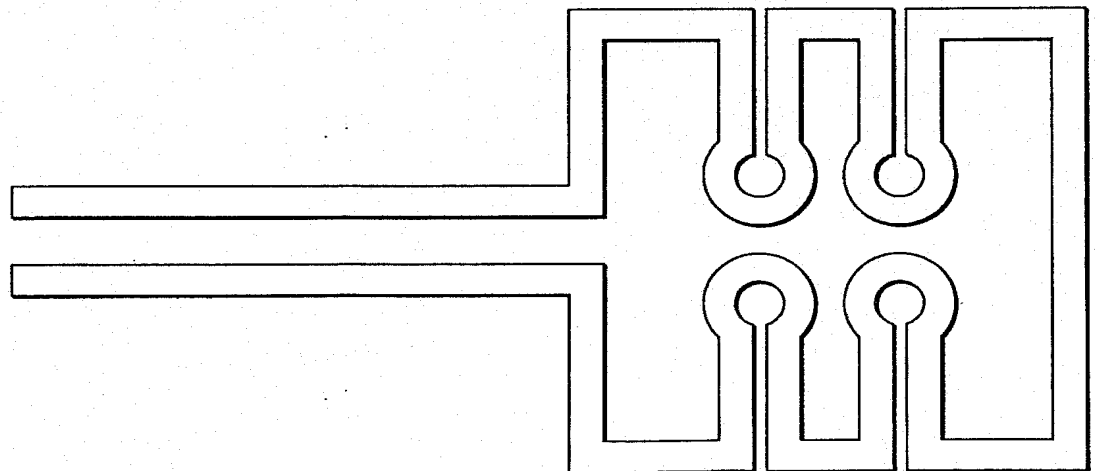


FIG. 19

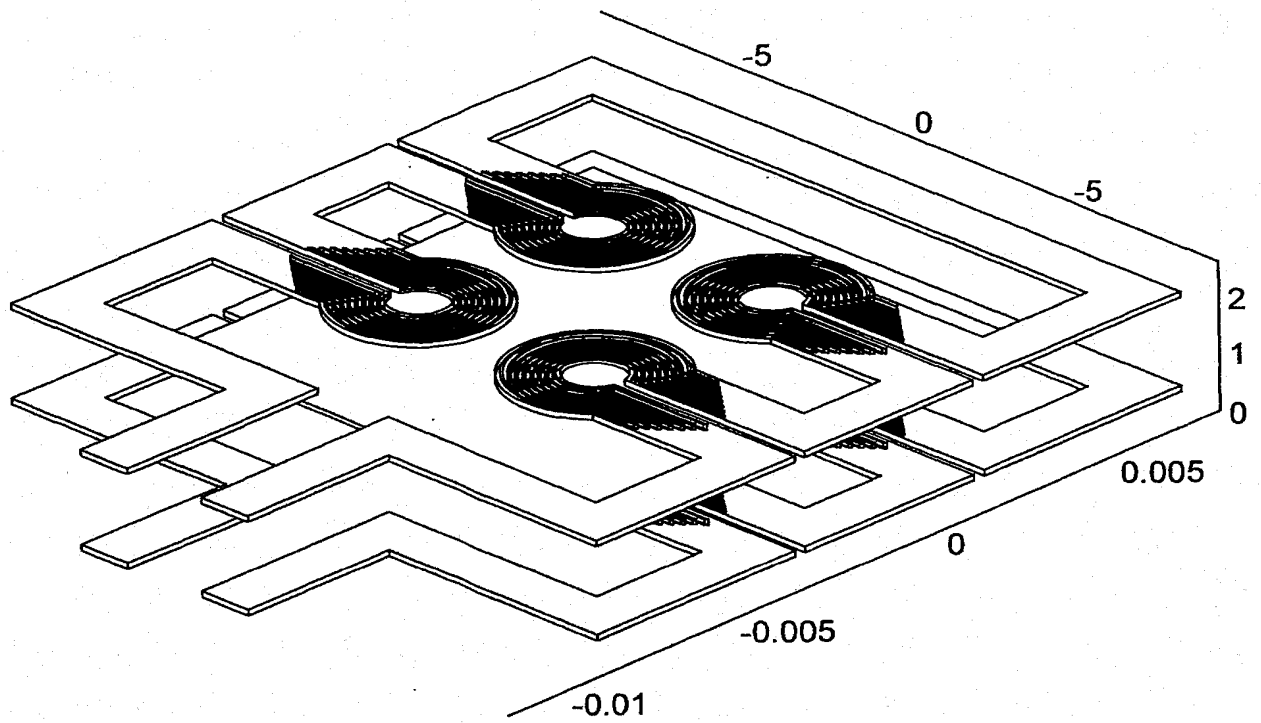


FIG. 20

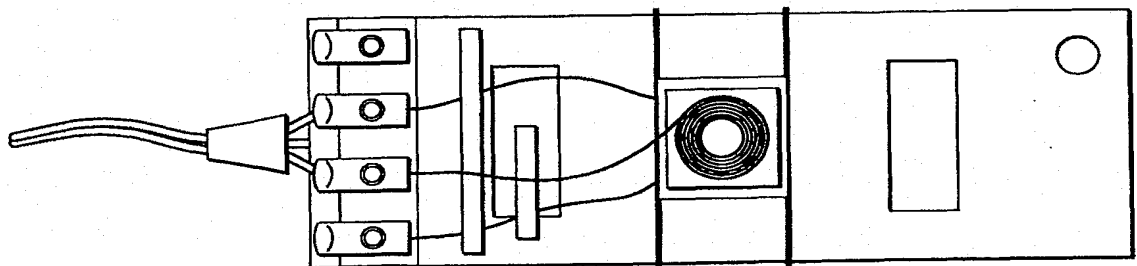


FIG. 21

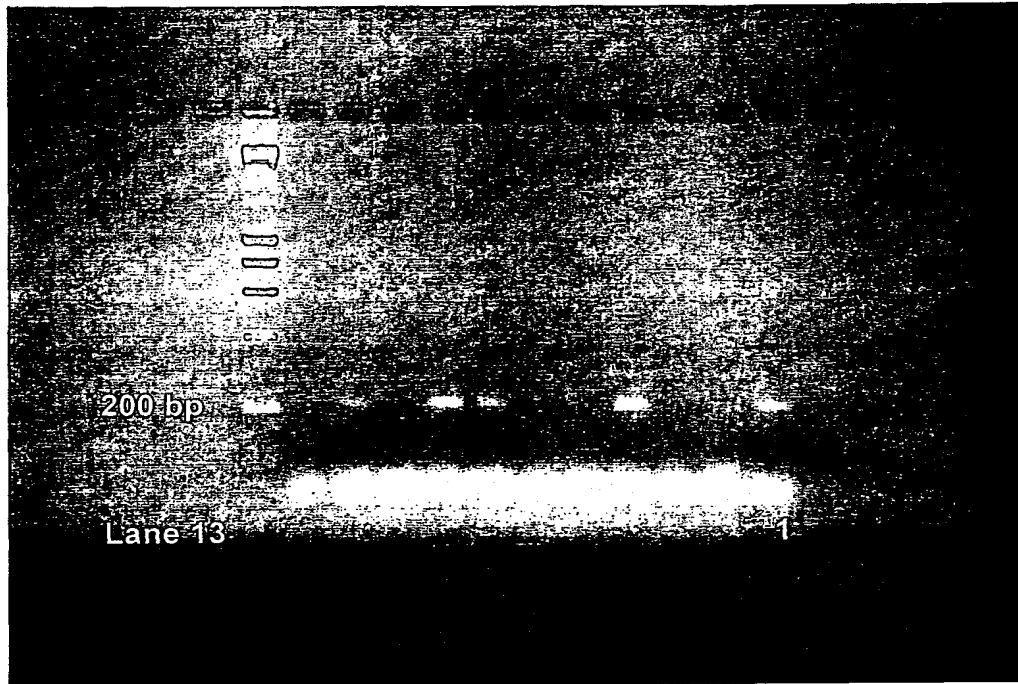


FIG. 22

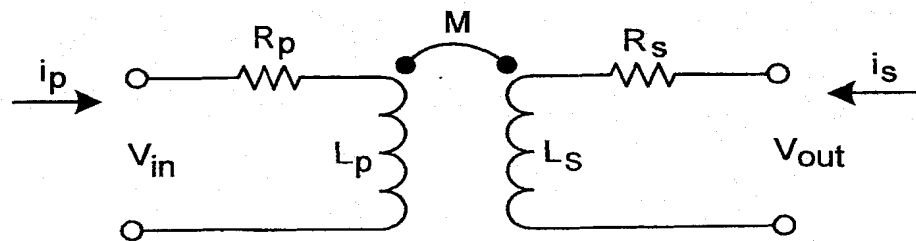


FIG. 23

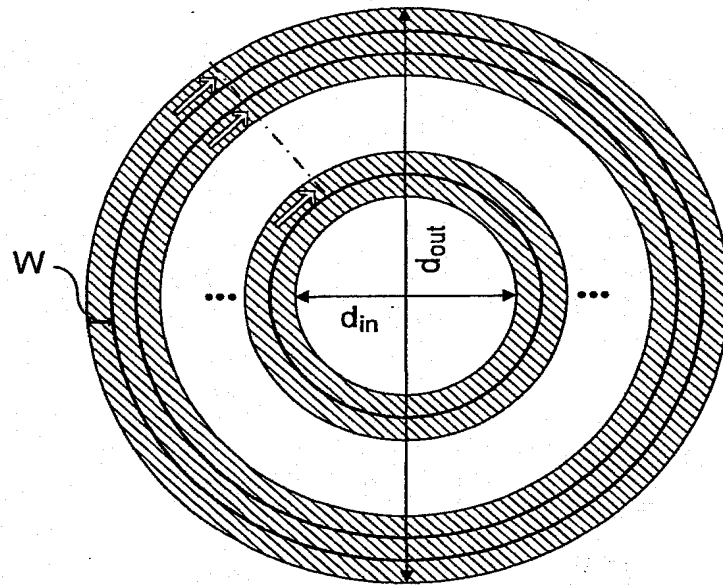


FIG. 24a

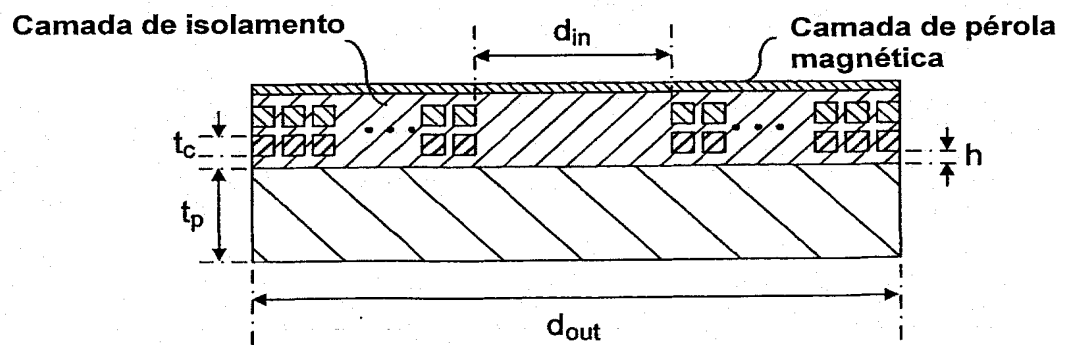


FIG. 24b

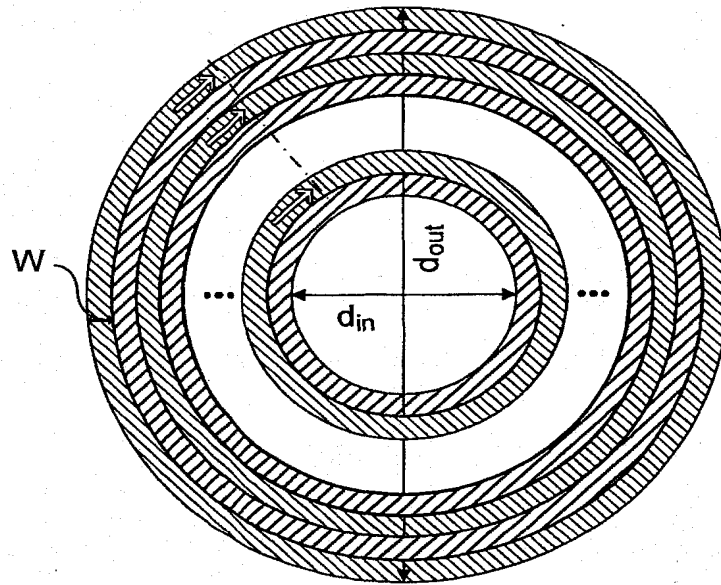


FIG. 24c

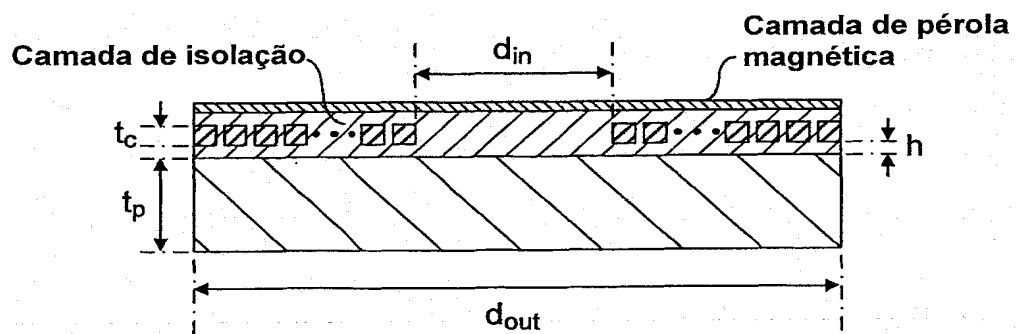


FIG. 24d

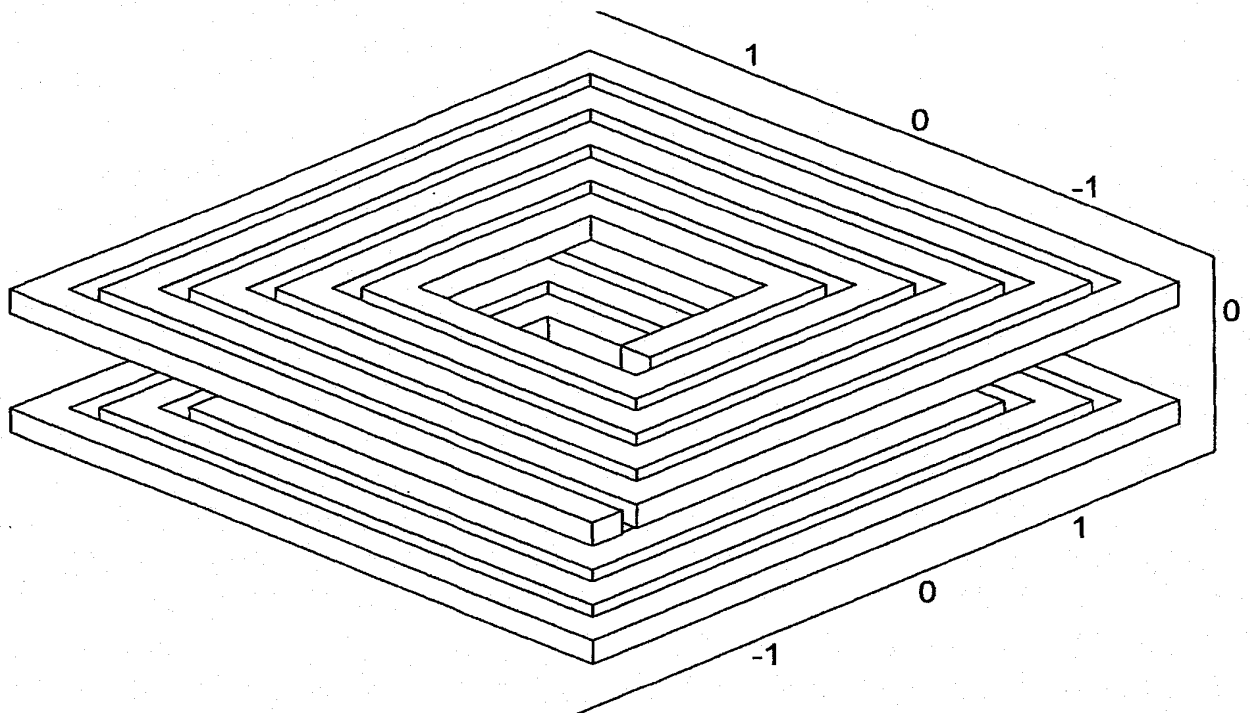


FIG. 25

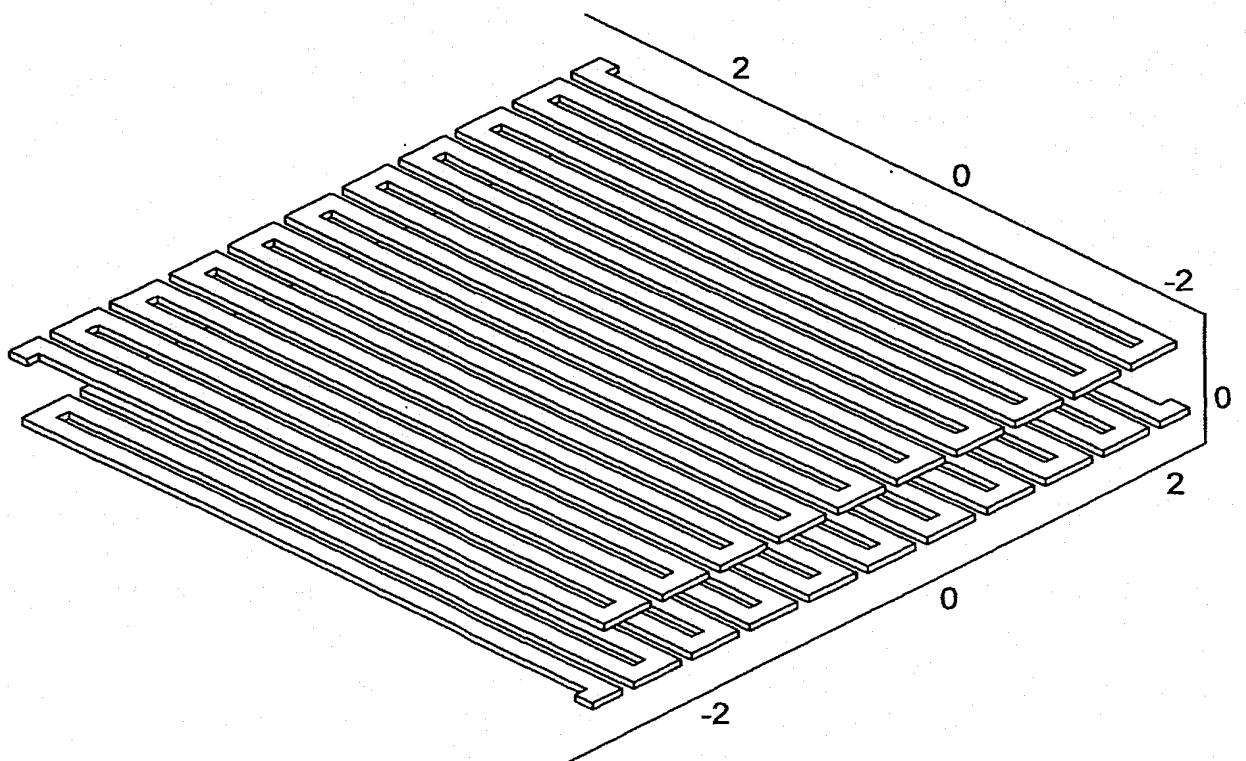


FIG. 26

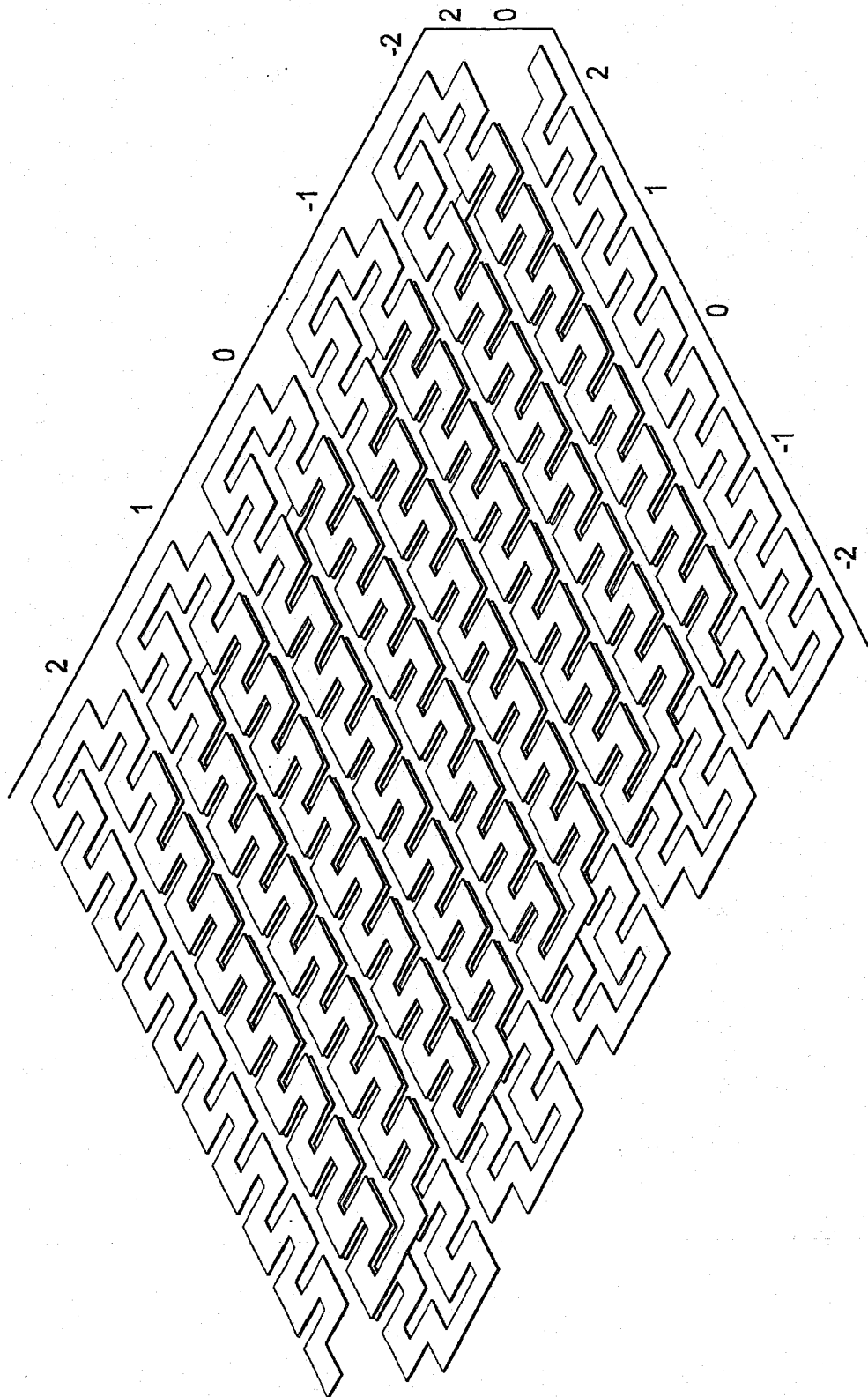


FIG. 27

RESUMO

“DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO, SISTEMA *LAB-ON-CHIP* PARA PREPARAR UMA AMOSTRA QUE COMPREENDE UMA MOLÉCULA BIOLÓGICA, E, MÉTODO PARA O ISOLAMENTO DE UM ANALITO”

5 Um dispositivo microfluídico que compreende; i) uma entrada; ii) uma primeira camada que compreende pelo menos a primeira e segunda estruturas que carregam corrente, em que as pelo menos primeira e segunda estruturas que carregam corrente cada uma compreende uma pluralidade de dentes e em que os dentes das primeira e segunda estruturas que carregam corrente são opcionalmente deslocados tal que os dentes da primeira estrutura que carrega corrente são posicionados entre os dentes da segunda estrutura que carrega corrente; iii) uma segunda camada que compreende uma primeira câmara microfluídica em comunicação fluida com a entrada posicionada acima das pelo menos primeira e segunda estruturas que carregam corrente da primeira camada; e iv) uma terceira camada que compreende pelo menos as 15 terceira e quarta estruturas que carregam corrente em que as pelo menos terceira e quarta estruturas que carregam corrente cada uma compreende uma pluralidade de dentes e em que os dentes das terceira e quarta estruturas que carregam corrente são opcionalmente deslocados tal que os dentes da terceira estrutura que carrega corrente são posicionados entre os dentes da quarta estrutura que carrega corrente; e em que as pelo menos terceira e quarta estruturas que carregam corrente são posicionadas na terceira camada de modo a estar acima da primeira câmara microfluídica e tal que os dentes da terceira estrutura que carrega corrente são posicionados de modo 20 substancialmente vertical acima ou deslocados dos dentes da primeira estrutura que carrega corrente e os dentes da quarta estrutura que carrega corrente são posicionados de modo substancialmente vertical acima ou deslocados dos dentes da segunda estrutura que carrega corrente; em que os dentes têm uma haste tendo ponta substancialmente elíptica.

25