



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS



Projeto e simulação de plataforma microfluídica para detecção de biomarcadores multiplex utilizando **COMSOL Multiphysics**

Aluno: Henrique Meisegeier Larine

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

Grupo de Bioanalítica, Microfabricação e Separações – BioMicS
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica – INCTBio

São Carlos – SP

Julho de 2022

Henrique Meisegeier Larine

Projeto e simulação de plataforma microfluídica para detecção de biomarcadores multiplex
utilizando COMSOL *Multiphysics*

Monografia apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de bacharel
em química.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos – SP

Julho de 2022

RESUMO

Dispositivos microfluídicos são instrumentos úteis na detecção de biomarcadores simultâneos, devido ao seu baixo custo e praticidade de manuseio por pessoal não-especializado, e têm recebido maior atenção devido ao início da pandemia de COVID-19 como forma rápida de testagem de anticorpos para a doença. A montagem desses dispositivos ainda depende extensivamente de tentativa e erro experimental, e simulações realizadas em *softwares* que modelam esses dispositivos são uma ferramenta adequada no desenvolvimento desses instrumentos analíticos que podem possuir geometria complexa para detecção de múltiplos biomarcadores ao mesmo tempo. Essas simulações permitem avaliar diversos parâmetros dos modelos projetados, tais como: largura das membranas utilizadas, comparar a porosidade e permeabilidade entre materiais, dentre outros, utilizando, racionalmente, os recursos e reagentes empregados. Dessa forma, este trabalho visa a modelagem e otimização de um dispositivo microfluídico utilizado em laboratório de forma a demonstrar seu funcionamento através da avaliação da concentração de partículas-alvo nas superfícies desejadas, com alterações geométricas e aplicação de dados obtidos em laboratório referentes às membranas utilizadas no teste multiplex. Todos os procedimentos realizados serão discutidos, envolvendo as geometrias projetadas, as físicas que regem o teste, bem como as reações utilizadas. Os resultados das simulações serão apresentados e demonstrarão a utilidade da plataforma na otimização desses dispositivos microfluídicos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
1.1 Revisão Bibliográfica.....	4
1.1.1 Ensaios de fluxo lateral (LFAs)	4
1.1.2 Simulações microfluídicas	7
2. OBJETIVOS	11
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	12
3.1 <i>Hardware</i> e software.....	12
3.2 Visão geral	14
3.3 Otimizações geométricas	16
3.4 Montagem do teste de anticorpos IgG e IgM.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Otimização da área da amostra e área de liberação do conjugado.....	20
4.2 Simulações iniciais no projeto modelado do dispositivo laboratorial – <i>Design 1</i>	24
4.3 Simulações do teste para anticorpos IgG e IgM no <i>Design 1</i>	25
4.4 Simulações nos dispositivos otimizados.....	28
4.4.1 Simulações no dispositivo com ângulo otimizado – <i>Design 2</i>	28
4.4.2 Simulações no dispositivo com área da amostra e tamanho geral otimizados – <i>Design 3</i>	30
4.5 Comparativo de simulações nos dispositivos projetados.....	32
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	34
6. BIBLIOGRAFIA	34
7. ANEXO A.....	39

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas microfluídicos exploram as propriedades químicas e físicas de fluidos e gases em micro-escala. Esses sistemas possuem muitos benefícios frente à sistemas de tamanho convencional, tais como análise e utilização de volume menor de amostras e reagentes, reduzindo de maneira considerável o valor dos dispositivos. Com uma vasta gama de benefícios, os sistemas microfluídicos encontram aplicações em diversas áreas, incluindo a química analítica e a biologia molecular,¹ uma vez que essas aplicações muitas vezes dependem de controle passivo de fluidos utilizando forças capilares. A modificação nas forças capilares como a construção de canais mais estreitos ou mais largos, a depender da aplicação desejada, modifica ativamente os elementos de tempo de reação, separação e detecção dos dispositivos. Processos laboratoriais são então miniaturizados, de forma a otimizar a eficiência das plataformas estudadas.

A microfluídica possui papel fundamental na fabricação de diversos dispositivos, tais como plataformas *lab-on-a-chip*, capazes de mimetizar o ambiente de um órgão fisiológico,² regulando os fenômenos de transporte em tempos de reação, separação e detecção superiores e em tempos muito menores em relação à dispositivos de maior escala, devido aos microcanais desenvolvidos nas plataformas. Este trabalho, no entanto, é voltado para a área de fabricação e desenvolvimento de biossensores e sistemas de detecção de antígenos ou anticorpos de doenças em sistemas de diagnósticos *point-of-care* (POC), tais como ensaios do tipo lateral flow.³ Esses ensaios são regidos pelo escoamento laminar de fluidos e são controlados pela miniaturização de canais e por mudanças geométricas capazes de ampliar as concentrações das espécies desejadas nas áreas designadas para detecção, sendo estes passíveis de simulação computacional, como será descrito e abordado ao longo do trabalho.

1.1 Revisão Bibliográfica

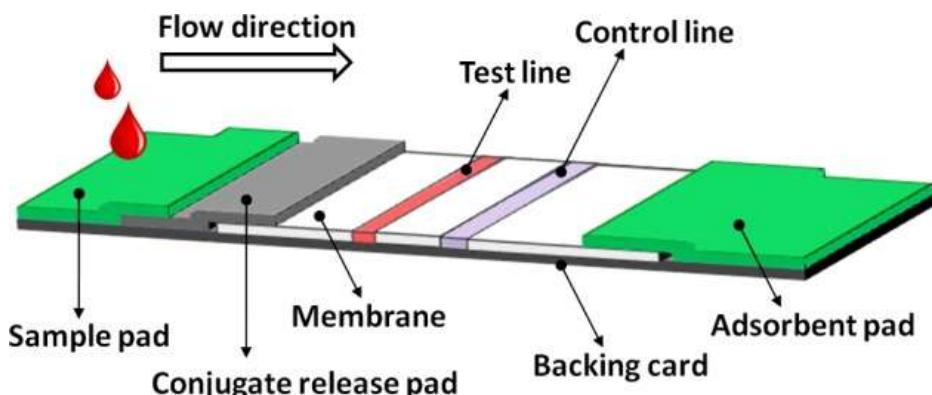
1.1.1 Ensaios de fluxo lateral (LFA)

Os ensaios do tipo fluxo lateral são um dos biossensores mais utilizados atualmente, uma vez que são dispositivos que possuem tempos de ensaio rápidos, de fácil manuseio por pessoal não-especializado e permitem analisar diversos analitos simultaneamente, na forma multiplex.⁴ Introduzidos no início da década de 1980,⁵ são mais conhecidos pela realização de testes de gravidez,⁶ tendo sua aplicação ampliada para outras áreas como ambiental⁷ e

farmacêutica.⁸ Seu modo operacional permaneceu praticamente inalterado desde então, possibilitando a criação de novas formas geométricas e a utilização de diversos materiais que compõem os LFAs, garantindo seu sucesso a longo prazo.

O início da pandemia de COVID-19 levou a uma alta demanda por ferramentas de diagnóstico, como testes rápidos de detecção de抗ígenos.⁹ Os dispositivos de ensaio de fluxo lateral são uma dessas ferramentas dado seu baixo custo, velocidade de obtenção do diagnóstico e acessibilidade,¹⁰ como forma de detecção de anticorpos para a doença como IgG e IgM ou da presença de partículas virais como as proteínas *spike* do vírus nos pacientes infectados. Os testes são realizados diretamente em farmácias, laboratórios e postos de saúde por profissionais de saúde e, atualmente, também podem ser adquiridos pela população no formato de autoteste para realização diretamente nas residências.¹¹ Os dispositivos LFAs são compostos por cinco partes em quatro áreas, nomeadamente: área da amostra, área de liberação do conjugado, área de desenvolvimento do teste com as linhas de teste e de controle e a área de absorvente,⁸ como mostra a Figura 1.

Figura 1. Esquema de um dispositivo de ensaio de fluxo lateral típico.



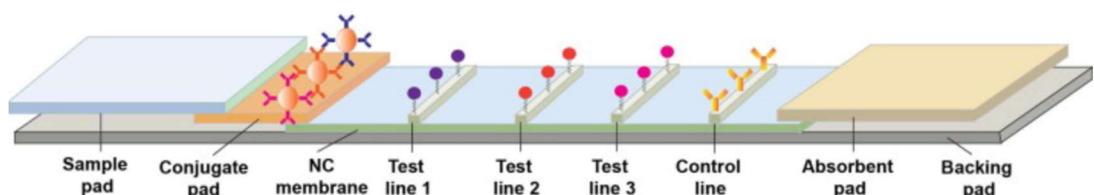
Fonte: Koczula e Gallotta (2016).¹²

O usuário inicia o teste ao aplicar a amostra líquida, sendo ela urina, sangue, saliva, dentre outros,⁴ na área da amostra e esta percorre as demais áreas do teste até a absorção do líquido na última zona por forças capilares.¹³ A área de liberação do conjugado contém bioreceptores (anticorpos, proteínas ou aptâmeros)^{14,15} que estão ligados à nanomateriais chamados moléculas-repórter, tais como nanopartículas de ouro (AuNPs), nanopartículas de carbono (CNPs), entre outros.¹⁶ As AuNPs são as mais utilizadas nos LFAs, principalmente por conta do seu efeito plasmônico produzido por essas nanopartículas, que geram uma cor específica bem destacada, a depender do tamanho e formato das nanopartículas sintetizadas, e

são ótimas para detecção qualitativa a olho nu. Existem diversas maneiras de se sintetizar as nanopartículas, o que pode levar à produção de diversas formas como *shells* e *nanorods* e tamanhos que podem variar de 5 a 100 nm, por exemplo.⁴ Com o auxílio das AuNPs, é possível imobilizar uma biomolécula receptora, como um anticorpo (AuNP-Ab), que irá reconhecer o analito por afinidade, possibilitando a geração do sinal na área de desenvolvimento do teste, nas linhas de teste e controle.

Na área de desenvolvimento do teste em um sistema de fluxo lateral há duas linhas: uma linha de teste e uma linha de controle. Em um teste multiplex, há duas ou mais linhas de teste e uma linha de controle, como mostra a Figura 2.

Figura 2. Dispositivo de fluxo lateral multiplex.

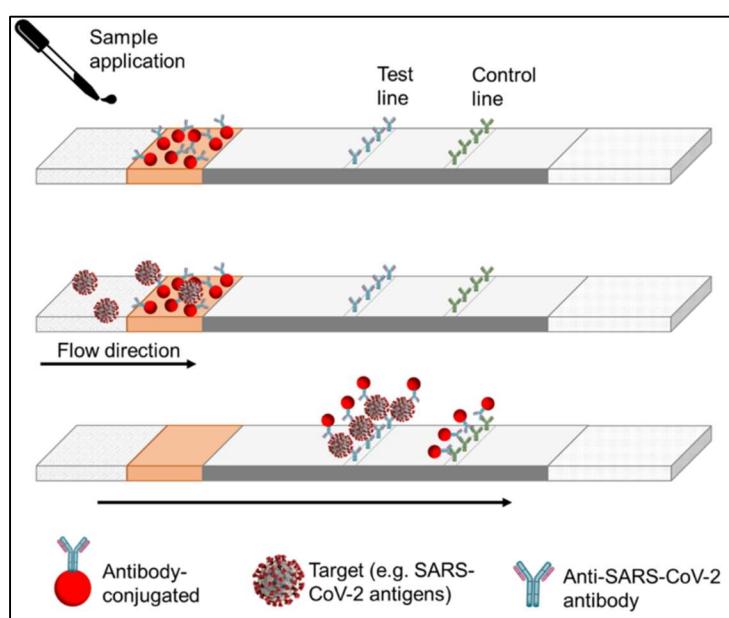


Fonte: Adaptado de CHEN, Y. *et al.*, 2016.¹⁷

Em cada uma das linhas de teste há a detecção de um analito de interesse, sendo no caso do teste multiplex, dois ou mais analitos sendo detectados simultaneamente.¹⁸ Nas linhas de teste e controle são colocadas anticorpos de captura, caso se queira detectar proteínas, que ligam às AuNPs-Ab que reconheceram o analito de interesse, gerando o sinal visual, no caso da linha teste, e na linha controle ocorre apenas o reconhecimento do anticorpo bioreceptor. A área ou zona de desenvolvimento do teste é composta por uma membrana porosa e polimérica, podendo ser constituída por nitrocelulose, fluoreto de polivinilideno, polissulfonas, dentre outros.¹⁹ Alguns parâmetros importantes para a escolha da membrana devem ser levados em conta, tais como a porosidade e o tamanho dos poros da membrana escolhida, de forma a determinar a área de superfície disponível para imobilização de analitos-alvo nas linhas de teste e controle, além do próprio analito a ser detectado na área de desenvolvimento do teste. As membranas de nitrocelulose possuem taxas de absorção diferentes entre si, sendo esse parâmetro inversamente proporcional à sensibilidade do teste e ao tempo total do ensaio. Uma membrana que possui uma taxa de absorção baixa, acarretará em um tempo maior de conclusão, aumentando a sensibilidade do teste, pois permite que os componentes tenham mais tempo de interação entre si.²⁰

Por fim, o dispositivo apresenta a área de absorvente, que é colocada ao final do dispositivo. A área de absorvente tem como principal aspecto permitir que o volume de amostra seja adequado para garantir um fluxo de partículas em direção à zona absorvente. Todas as partículas serão carregadas pela amostra líquida e passarão por todas as zonas necessárias (zona de conjugado e zona de teste), sendo que apenas as partículas que não reagiram é que chegarão na zona absorvente. A zona absorvente tem que garantir o fluxo contínuo e a retenção do líquido excedente. Essa área do teste é geralmente constituída por celulose e o volume de amostra a ser inserido no teste pode ser variado de acordo com o tamanho do absorvente colocado no teste. A Figura 3 descreve o funcionamento de um dispositivo de ensaio de fluxo lateral.

Figura 3. Funcionamento de um teste nos LFAs.



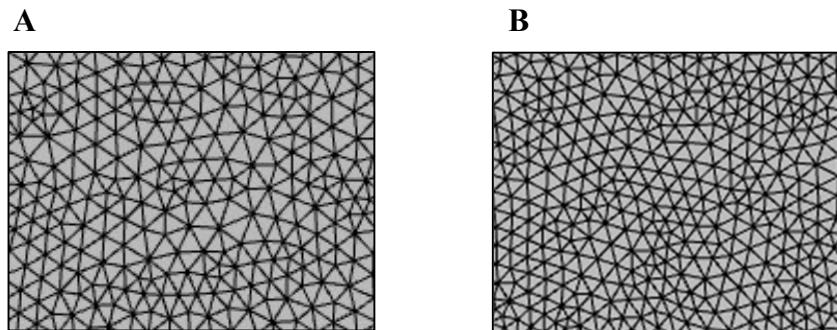
Fonte: Radetec Diagnostics.²¹

A primeira tira descreve um LFA que contém moléculas-repórter conjugadas com um anticorpo, ambos imobilizados na área de liberação do conjugado, capaz de se ligar às moléculas-alvo, seguida pela aplicação da amostra. A segunda tira mostra a direção do fluxo após a aplicação da amostra e a formação do complexo entre as moléculas-repórter, o anticorpo e o antígeno carregado pela amostra, sendo então encaminhados até a área de desenvolvimento do teste, onde encontram-se os anticorpos de captura na linha de teste. A terceira tira mostra a ligação do complexo com os anticorpos de captura na linha de teste, gerando o sinal positivo para o teste através do acúmulo das moléculas-repórter nessa área em conjunto com os complexos formados.

1.1.2 Simulações microfluídicas

As simulações microfluídicas têm como base o método de análise por elementos finitos utilizando *softwares* tais como COMSOL *Multiphysics*, utilizado neste trabalho. As análises por elementos finitos são realizadas ao se dividir o projeto em partes muito pequenas, chamadas malhas, em que são realizados os cálculos pelo *software*. A Figura 3 demonstra dois tipos distintos de malhas.

Figura 3. (A) Malha arbitrária para um domínio e (B) Malha refinada para o mesmo domínio.



Fonte: Autoria própria.

A malha mais fina indica que mais partes serão calculadas pelo *software*, o que necessita uma maior capacidade de processamento por parte do computador a realizar os cálculos. No entanto, ao se utilizar uma malha mais fina no domínio é possível obter resultados mais precisos em comparação com a malha normal, uma vez que há um maior número de unidades a serem analisadas pelo computador.

Com a plataforma COMSOL *Multiphysics* é possível definir quais os parâmetros físicos e químicos serão utilizados na simulação, tais como as equações de transporte das espécies químicas, as propriedades do material a ser utilizado, a cinética das reações envolvidas em cada etapa do teste dentre outras que serão abordadas ao longo do trabalho.²² São muito úteis para a correta reprodução do problema, além de permitir otimizações concisas com o projeto desenhado e que mimetize onde e quando possível, o sistema laboratorial atualmente utilizado.

Um fluido aumenta sua pressão contra uma compressão realizada sobre ele, de forma a retomar seu volume original, e possui resistência viscosa quando duas lâminas de fluido deslizam uma sobre a outra.²³ Para realização das simulações, é necessário definir o fluido utilizado baseando-se em parâmetros como o número de Reynolds e se o fluido possui turbulência. Esses parâmetros são fundamentais para a compreensão da dinâmica dos fluidos,

uma vez que o número de Reynolds determina a relação entre efeitos de viscosidade e de inércia de um fluido²⁴ e estabelece o escoamento do fluido, se é laminar ou turbulento. A água ao percorrer um meio poroso desenvolve velocidades muito baixas, uma vez que não há forças suficientes que se sobreponham à resistência viscosa, produzindo números de Reynolds muito pequenos, de forma que seu escoamento ao longo do dispositivo seja laminar ao invés de turbulento. Dessa forma, as forças de viscosidade dominam e se sobressaem frente às forças de inércia, gerando o escoamento laminar.²⁵ Além disso, trata-se de um fluido Newtoniano, em que a taxa de deformação cisalhante é diretamente proporcional à tensão de cisalhamento,^{26,27} sendo a tensão de cisalhamento a multiplicação entre viscosidade e taxa de deformação cisalhante²⁸. A viscosidade é invariável ao longo de todo o experimento pois trata-se de uma condição isotérmica.

Diversas equações são utilizadas para as simulações microfluídicas, dentre as quais podemos destacar a Equação de Navier-Stokes, a Lei de Darcy, a equação de Richards e a Lei de Fick para difusão de massa. Uma das maneiras de se descrever o fenômeno do movimento do fluido é através da Equação de Navier-Stokes, como mostram as equações (1) e (2).

$$\nabla \cdot \vec{u} = 0 \quad (1)$$

$$\rho \frac{\partial \vec{u}}{\partial t} = -\nabla p + \mu \nabla^2 \vec{u} + \rho \vec{F} \quad (2)$$

A equação (1) é uma Equação da Continuidade, que trata da conservação de massa do fluido. O vetor \vec{u} indica a velocidade do fluido com três componentes nas três direções do sistema de coordenadas adequado. O gradiente, por sua vez, diferencia os três componentes do vetor nas direções x, y e z. A água líquida é considerada um fluido incompressível em baixas pressões e seu volume específico não se altera. Logo, a descarga de massa de fluido que entra no volume de controle é igual à descarga que o deixa.

A equação (2) é a Equação de Navier-Stokes, que trata da conservação de quantidade de movimento no fluido escoante. Essa equação é similar à Segunda Lei de Newton, o Princípio Fundamental da Dinâmica. Analisando o primeiro termo, $\frac{\partial \vec{u}}{\partial t}$, há a derivada da velocidade \vec{u} sobre o tempo. Trata-se da variação da velocidade do fluido em relação ao tempo, resultando em sua aceleração total – composta pela aceleração local e pelos três termos da aceleração advectiva. O termo ρ descreve a densidade do fluido, sendo sua massa dividida pelo seu volume. Portanto, temos a densidade multiplicada pela aceleração do fluido no lado esquerdo da equação. Ao lado direito temos as forças que resultam dessa multiplicação. A primeira delas

são os termos contendo ∇ , indicando as forças internas do fluido resultante da colisão e deslizamento das partículas entre si enquanto que o termo \vec{F} denota forças externas como a gravidade. A primeira força interna, ∇p , representa o gradiente relativo à mudança de pressão. Havendo uma diferença de pressão entre dois pontos, o fluido percorrerá o gradiente de alta pressão para baixa pressão. A segunda força interna, $\mu \nabla^2 \vec{u}$, representa a resistência viscosa do fluido. A força de resistência viscosa do fluido está diretamente associada à dificuldade das camadas do fluido de deslizarem uma sobre a outra. Essa dificuldade surge através das interações intermoleculares de forças fracas como ligações de Van der Waals e ligações iônicas. Quanto maior a viscosidade do fluido, maior a interação molecular e mais difícil se torna o deslizamento entre as camadas em movimento cisalhante.

A Equação de Navier-Stokes é utilizada tratando-se da fluidodinâmica clássica em canais abertos. À medida em que se aplica o meio poroso no dispositivo, outras equações se fazem necessárias, como a Lei de Darcy e a Equação de Richards. A Lei de Darcy descreve o fluxo do fluido em meio poroso saturado. Isso significa que o fluido, ao passar pelos poros do material, preenche completamente seu espaço. É similar à Equação de Navier-Stokes pelo uso das equações (1) e (2), adicionando-se o parâmetro poroso do material em questão, e análoga a diversas equações em outras áreas como a Lei de Ohm para cargas elétricas, a Lei de Fourier para transferência de calor e a Lei de Fick para difusão de massa.²⁹ A Lei de Darcy é descrita pela equação (3).

$$\vec{u} = -\frac{k}{\mu} \nabla p \quad (3)$$

O termo \vec{u} denota o volume de água que flui por uma seção transversal do meio poroso por unidade de tempo, comumente conhecida como descarga de fluxo (por unidade de área),³⁰ termo conhecido como velocidade de Darcy. Os termos k e μ representam a permeabilidade do meio poroso e a viscosidade dinâmica do fluido, respectivamente. O último termo demonstra o gradiente de pressão, como visto anteriormente na Equação de Navier-Stokes. Essa equação é válida para números de Reynolds menores que 10, e descreve a relação de linearidade entre a velocidade \vec{u} e o gradiente de pressão p .

Já a Equação de Richards é uma variação da Lei de Darcy. A Equação de Richards leva em consideração o meio insaturado devido às ações de capilaridade do sistema,³¹ em que alguns poros são drenados à medida em que o fluido percorre o espaço, preenchendo-os com ar. Por

essa razão, a Equação de Richards é utilizada frente à Lei de Darcy, complementando-a. A equação de Richards é descrita a seguir.

$$\frac{\partial}{\partial t} (\rho \varepsilon_p) + \nabla \cdot (\rho \vec{u}) = Q_m \quad (4)$$

Essa equação denota a combinação da Lei de Darcy com a equação de continuidade. O termo ρ indica a densidade do fluido, enquanto que ε_p indica a porosidade do meio. O vetor \vec{u} aponta a velocidade do fluido, e o termo Q_m denota o fluxo de origem do fluido. Podem ser considerados outros parâmetros, tais como elevação do modelo e a gravidade, que não são utilizados neste estudo e por isso não se encontram na equação.

A Lei de Fick para difusão de massa descreve o fenômeno de transferência de matéria por difusão devido à diferenças de concentração entre dois pontos.³² A Lei de Fick é descrita pela equação (5).

$$J_{diff} = -D_i \cdot \nabla C_i \quad (5)$$

O termo J_{diff} indica o fluxo de difusão e depende do gradiente de concentração local da espécie. O termo D_i representa o coeficiente de difusão da espécie i e o termo C_i , a concentração de i . O sinal negativo na equação determina que o fluxo das moléculas de i é positivo quando há movimento das moléculas do gradiente de alta concentração para baixa concentração.³³

Para que seja definida a concentração do analito desejado na superfície do modelo simulado, faz-se necessário o uso da interface de reações de superfície do *software*. Essa interface refere-se a espécies adsorvidas em uma superfície reativa, ou seja, a formação do analito que representa o teste positivo no modelo. As equações (6), (7) e (8) representam as equações necessárias para que se obtenha os valores de concentração de moléculas na superfície do modelo, objetivo da análise neste estudo, e seguem a Lei de Fick descrita anteriormente.

$$N_{t,i} = -D_{s,i} \nabla_t c_{s,i} \quad (6)$$

Nesta equação, o termo $N_{t,i}$ refere-se ao fluxo molar de superfície da espécie i e o subscrito t a direção tangencial. $D_{s,i}$ indica o coeficiente de difusão de superfície da espécie i , enquanto que $c_{s,i}$ é a concentração molar de superfície da espécie i .

A variação da concentração da espécie na superfície é determinada pela equação (7).

$$\frac{\partial c_{s,i}}{\partial t} = -\nabla_t \cdot N_{t,i} + R_{s,i} \quad (7)$$

O termo $R_{s,i}$ refere-se à soma de fatores de adsorção e dessorção nas reações de superfície. Ainda há a cinética da reação de superfície, determinada pela cobertura fracionária de superfície, descrita pela equação (8).

$$\theta_i = \frac{\sigma_i c_{s,i}}{\gamma_s} \quad (8)$$

A cobertura fracionária de superfície é determinada pelo termo θ_i . Esse termo é calculado utilizando a densidade de sítios de superfície, γ_s (mol/m²), e o número de sítios ocupados por espécie, σ_i .

Para fins de simulação, deve ser determinado um valor da concentração das espécies que são previamente adsorvidas ao dispositivo, anterior à passagem do fluido contendo os analitos de interesse. A esse valor, multiplica-se o número de sítios que exibem as concentrações de espécies, sendo elas os complexos formados e as espécies que demonstram valores positivos, a depender do design do dispositivo microfluídico projetado.

2. OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivos simular e otimizar um sistema microfluídico do tipo ensaio de fluxo lateral multiplexado, em desenvolvimento pelo grupo BioMicS, a partir de simulações computacionais utilizando o software COMSOL *Multiphysics*, de forma que não haja necessidade de utilização de reagentes e materiais para tal. Além disso, é de interesse introduzir ao grupo de pesquisa uma nova linha de investigação baseada em simulações microfluídicas, que podem ser utilizadas em outros dispositivos além dos ensaios de fluxo lateral.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

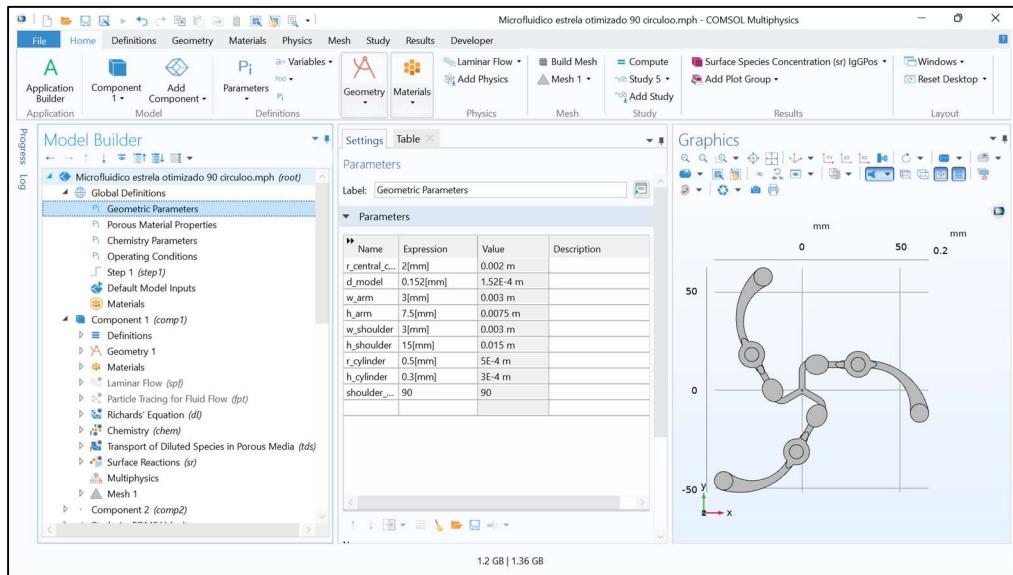
3.1 *Hardware e software*

Para realização das simulações microfluídicas foi utilizado a plataforma COMSOL *Multiphysics* versão 6.0, cuja licença foi adquirida pelo grupo. Junto à licença foram adquiridos módulos específicos para realização do estudo como *Chemical Reaction Engineering Module*, *Particle Tracing Module*, *Microfluidics Module* e *Porous Media Flow Module*. O hardware

utilizado possui o sistema operacional Linux Ubuntu 20.04.3 LTS, processador Intel i5-9400 de 2.9 MHz, 16 GB de memória RAM e HD de 1.3 TB.

A Figura 4 mostra a interface do *software* ao se definir parâmetros geométricos do projeto.

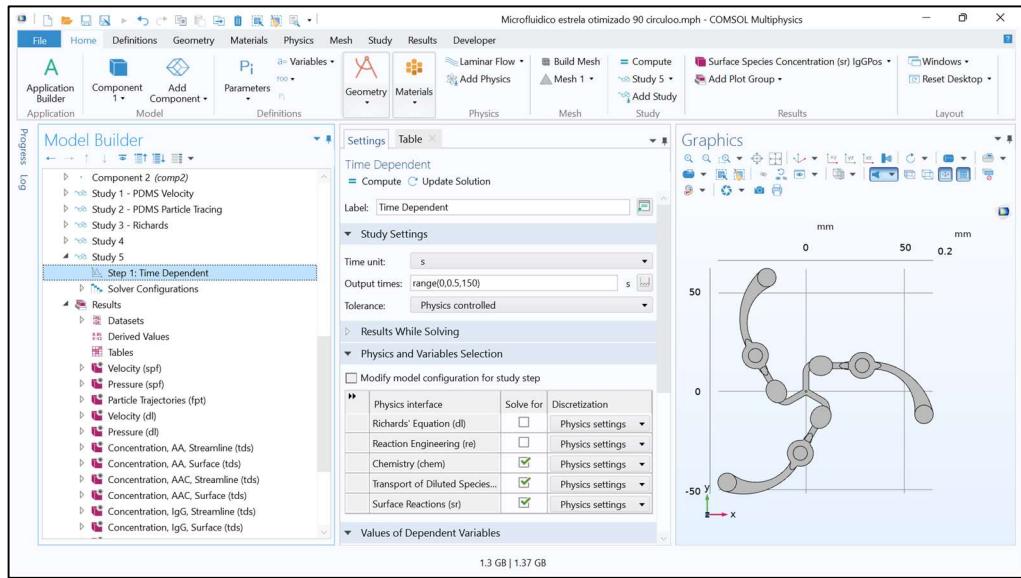
Figura 4. Interface do *software* ao se definir parâmetros do estudo.



Fonte: Autoria própria.

Além de parâmetros geométricos, outros dados são alimentados ao *software*, tais como as propriedades porosas do material e as propriedades químicas das reações do experimento realizado. Também são utilizados materiais que compõem o modelo, além das interfaces citadas anteriormente, que determinam as equações que regem o estudo. Por fim, há a interface *Study*, em que o usuário determina quais interfaces serão computadas e os resultados obtidos a partir dessas interfaces. Uma combinação de mais de uma interface pode ser utilizada no *Study*, como mostra a Figura 5. Após os cálculos, o *software* disponibiliza os resultados.

Figura 5. Interface do software ao se definir os estudos a serem realizados pela plataforma.



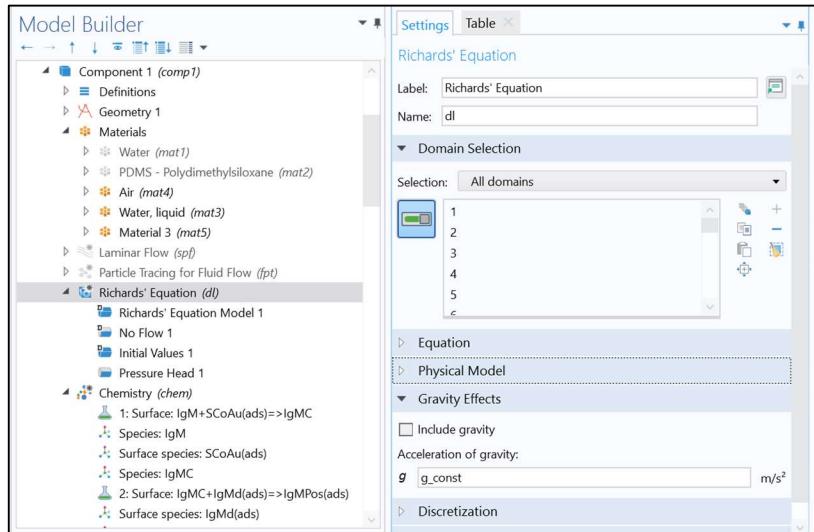
Fonte: Autoria própria.

Cada interface possui um conjunto de equações, como as descritas anteriormente, e são importantes para a correta modelagem de projetos experimentais.

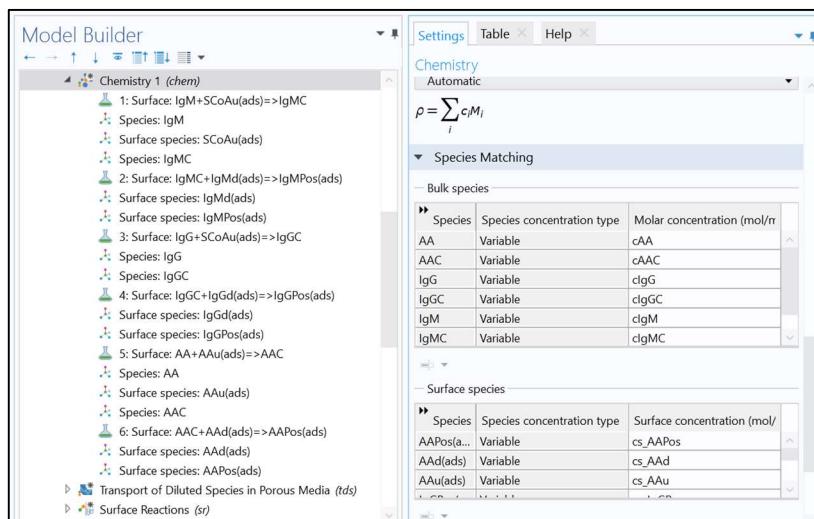
A interface *Richards' Equation* demonstra o fluxo em um meio poroso insaturado, com as equações já abordadas. A interface *Chemistry* aborda as reações químicas que ocorrem no modelo, com dados específicos de concentração de espécies. Já a interface *Transport of Diluted Species in Porous Media* define as regiões em que ocorrem as reações determinadas pelo usuário, além de ser responsável pelo cálculo da concentração das espécies ao longo de toda a altura do modelo. A última interface, *Surface Reactions*, aborda especificamente reações na superfície do modelo e atua de maneira similar à interface anterior. A Figura 6 mostra algumas dessas interfaces.

Figura 6. Interface do software com os módulos utilizados. (A) Richards' Equation e (B) Chemistry.

A



B



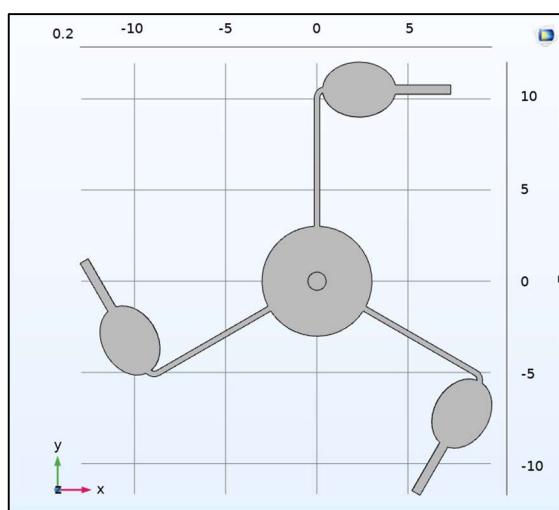
Fonte: Autoria própria.

3.2 Visão geral

Em primeiro momento, desenhos simples que mimetizem o início do dispositivo laboratorial, contendo apenas a área de amostra e a área de liberação do conjugado foram projetados, como mostra a Figura 4. Foi desenhado o modelo contendo um círculo e posteriormente uma elipse como geometrias da área de liberação do conjugado, além de modificar os ângulos de saída do fluido com base na verificação das linhas de fluxo do fluido (do inglês, *streamline*). A partir da projeção desse desenho, foi aplicado polidimetilsiloxano (PDMS) como material no modelo, de forma a avaliar como a adição de materiais lisos na

plataforma ocorre, com densidade de 970 kg/m^3 e viscosidade dinâmica de $3.5 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Ao desenho inicial foi verificada a linha de fluxo ao se adicionar água em PDMS, permitindo a observação de possíveis otimizações na geometria do dispositivo. Além da linha de fluxo, também foram adicionadas partículas que mimetizem as proteínas *spike* do vírus SARS-CoV-2, com densidade de 2200 kg/m^3 e diâmetro de 120 nm , em que também foram notadas possíveis otimizações a serem realizadas.

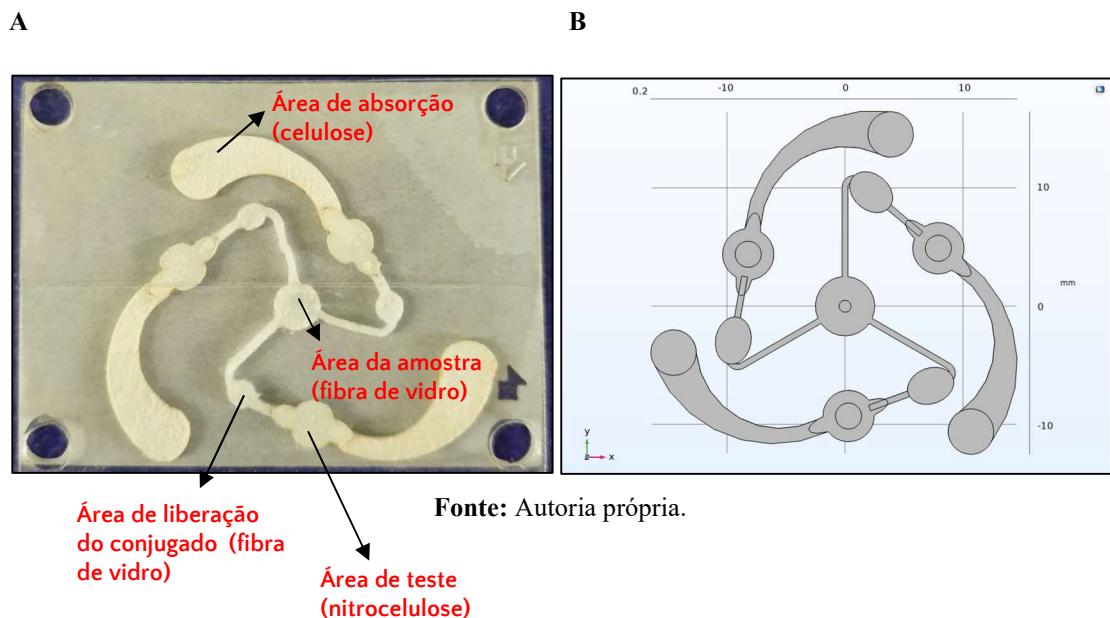
Figura 7. Primeiro modelo projetado, contendo a área da amostra e de liberação do conjugado.



Fonte: Autoria própria.

Ao avançar no estudo, novos desenhos foram projetados já visando modelar o sistema laboratorial utilizado nos testes multiplex, contendo todas as cinco partes do dispositivo com a altura experimental, inserindo-se o material poroso ao longo de todo o teste, além de equações que regem o sistema que serão discutidas posteriormente. Foram detalhadas as reações que ocorrem nos testes experimentais, contendo todos os reagentes e suas equações químicas, além da velocidade de reação e outras características. Foram definidas em quais posições do desenho ocorrem as reações e foi possível comparar, a partir delas, a diferença de concentração do analito de interesse, neste caso os aqui nomeados anticorpos IgG e IgM, na superfície da linha de teste entre o dispositivo original e os dispositivos otimizados.

Figura 8. Dispositivo laboratorial (A) e seu projeto no *software* (B).



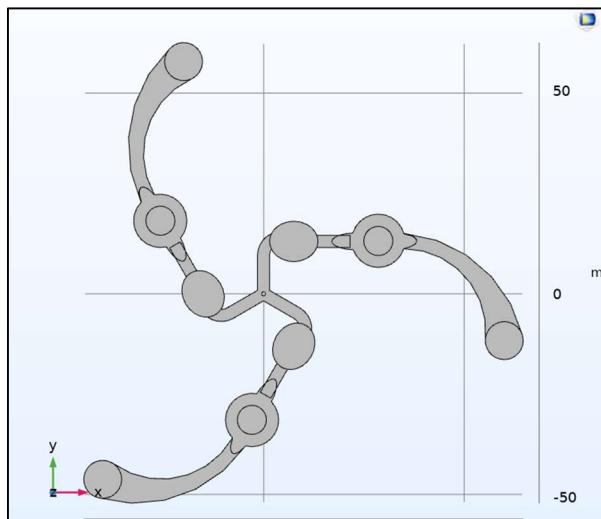
Fonte: Autoria própria.

3.3. Otimizações geométricas

Duas otimizações foram realizadas neste estudo. A primeira foi avaliada ao se modificar o ângulo entre os braços da área de amostra com a área de liberação do conjugado de 140 graus para 90 graus, com base no desenho inicial, preenchido por PDMS apenas para simular a fluidodinâmica de canais abertos e utilizando água como fluido. Essa modificação foi então utilizada no teste completo, contendo todas as etapas de detecção de IgG e IgM que podem ser utilizadas no laboratório.

A segunda otimização baseou-se na retirada da área de amostra circular e aumentando a largura de todos os demais componentes. A amostra então percorre os braços diretamente e atinge a área de liberação do conjugado sem que haja acúmulo de líquido na área de introdução da amostra.

Figura 9. Dispositivo otimizado no *software*.



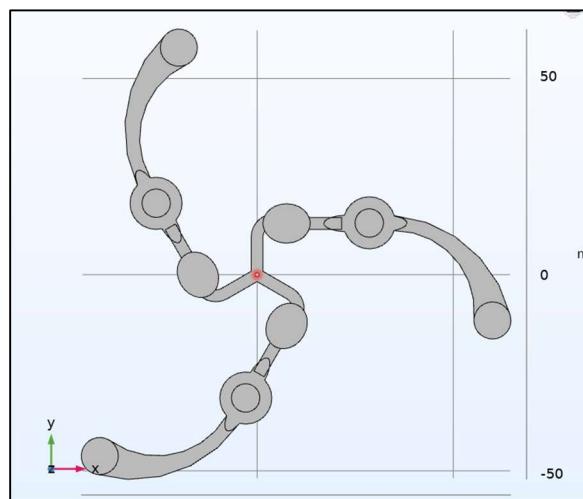
Fonte: Autoria própria.

Com os cálculos das otimizações foi possível comparar a diferença de concentração do analito de interesse, neste caso definido como os anticorpos IgG e IgM, descritos no subtópico seguinte, na superfície da linha de teste entre o dispositivo original e os dispositivos otimizados.

3.4 Montagem do teste de anticorpos IgG e IgM

Para a etapa de montagem do teste de anticorpos IgG e IgM, foi necessário modelar cada etapa que ocorre no teste real, como definir as reações que ocorrem com cada analito, os sítios das reações, a cinética química, a concentração de cada analito e o fluido utilizado como componente da amostra. Foi considerado que a água seria o fluido mais apropriado, por possuir propriedades anteriormente descritas. Além de definir as reações, é necessário definir as propriedades do material poroso utilizado, sendo neste caso a fibra de vidro definida por parâmetros do *software* utilizado,³⁴ material este que compôs toda a geometria projetada como meio de facilitar os cálculos. É de se destacar a porosidade de 0.7 utilizada, além da permeabilidade da membrana de $1.72 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2$, que são valores próximos aos encontrados na literatura.²⁰ O fluido é aplicado na área da amostra, como mostra a Figura 10, na parte em destaque.

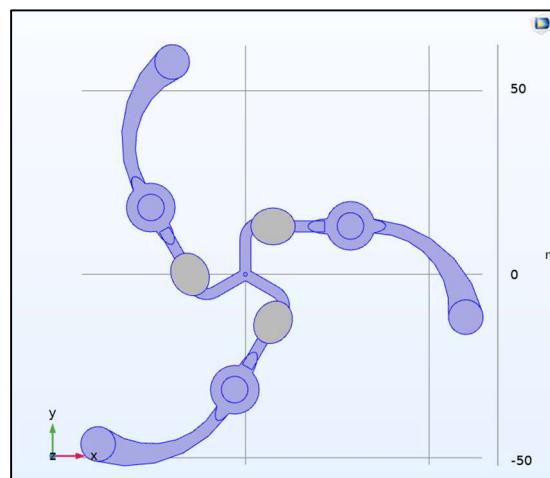
Figura 10. Área da amostra do dispositivo.



Fonte: Autoria própria.

Ao se aplicar o fluido na geometria desenhada, foi definido que nele continha três analitos: AA, IgG e IgM. O analito AA é a proteína controle do teste, sendo portanto detectada na linha de controle. O AA é traduzido para anticorpo animal servindo apenas como modelo para demonstrar o funcionamento do teste. Os analitos IgG e IgM são tomados como modelo de anticorpos produzidos por um paciente infectado pelo vírus SARS-CoV-2 e são os principais analitos do estudo, sendo detectados nas duas linhas de teste do dispositivo. A amostra, ao ser transportada para a área de liberação do conjugado, forma um complexo com as moléculas-repórter que estão conjugadas com uma proteína do vírus, denominando então a espécie SCoAu, formando dois complexos: IgG com complexo de AuNP (IgGC) e IgM com complexo de AuNP (IgMC). Além desses complexos, há a formação do AAC, o anticorpo animal complexado com as AuNPs, reação que ocorre com a espécie AAu. A formação desses complexos ocorreram na área cinza indicada pela Figura 11, com uma área de liberação do conjugado dedicada a cada analito.

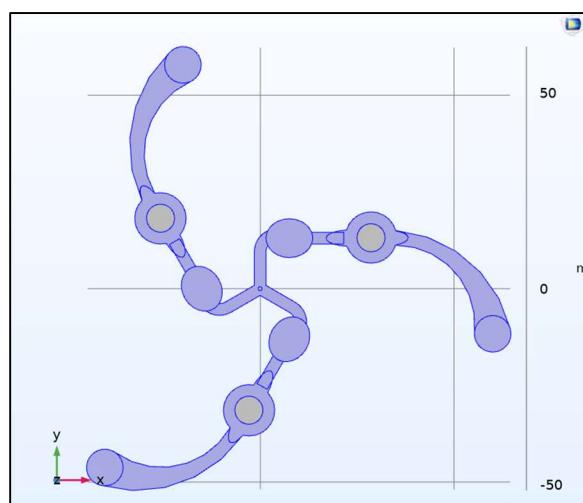
Figura 11. Áreas de liberação do conjugado do dispositivo.



Fonte: Autoria própria.

Após o reconhecimento dos analitos-alvo pelo conjugado, a amostra é carregada até as linhas de teste, onde encontram-se os anticorpos de captura, aqui denominados como IgGd e IgMd, que imobilizam os analitos nas zonas de teste especificadas. Os anticorpos de captura imobilizam o IgGC e o IgMC, e os analitos imobilizados nas zonas de teste são descritos como IgGPos e IgMPos, para representar o teste positivo para essas espécies. Analogamente, o anticorpo animal genérico também é capturado na zona de controle pela espécie AAd, gerando o AAPos. As áreas de teste estão representadas em cinza pela Figura 12.

Figura 12. Áreas de teste do dispositivo.



Fonte: Autoria própria.

A Tabela 1 sumariza as reações utilizadas, bem como as áreas do dispositivo em que elas ocorrem. A Tabela 2 resume os parâmetros utilizados nas reações químicas descritas na seção 3.4.

Tabela 1. Reações definidas no *software* para realização do teste.

Área do dispositivo	Reações
Área da amostra	AA, IgG e IgM livres AA + AAu → AAC
Área de liberação do conjugado	IgG + SCoAu → IgGC IgM + SCoAu → IgMC
Área de desenvolvimento do teste	AAC + AAd → AAPos IgGC + IgGd → IgGPos IgMC + IgMd → IgMPos

Tabela 2. Dados definidos pelo *software* para realização do teste.

Material	Valor
Concentração AA, IgG e IgM	$2.3 \cdot 10^{-4}$ mol/m ³
Concentração de AuNPs e anticorpos de captura na superfície dos modelos	$5.7 \cdot 10^{-7}$ mol/m ²
Coeficiente de difusão	$3 \cdot 10^{-11}$ m ² /s
Constante de taxa de reação da área de liberação do conjugado	10 m ³ /(s·mol)
Constante de taxa de reação da zona de teste	1 m ³ /(s·mol)

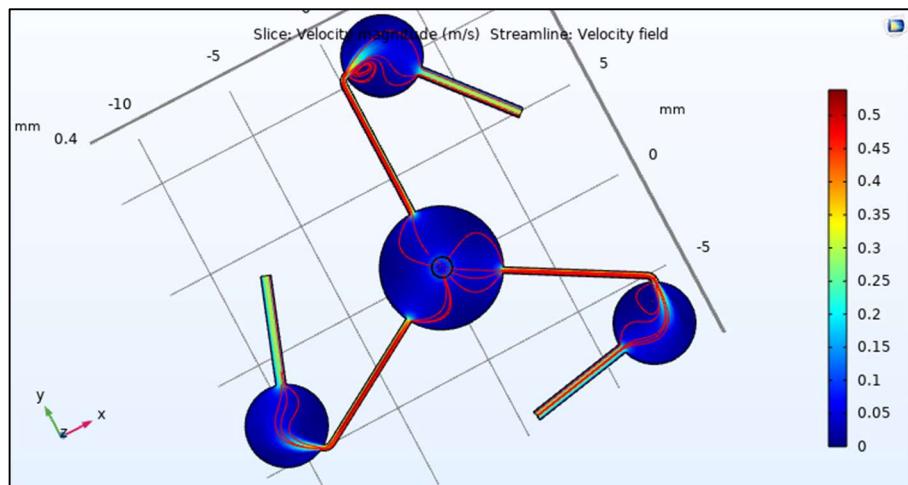
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização da área da amostra e área de liberação do conjugado

Ao se utilizar o *design* inicial do modelo projetado (Figura 8B), contendo ângulo de 140° da saída do fluido em relação aos braços do modelo e um círculo como área de liberação do conjugado, foi observado uma perda no espaço do fluxo (Figura 13). Essa perda foi notada uma vez que a água não atinge as extremidades da área de liberação do conjugado utilizando a ferramenta *streamline* (com número de linhas a serem mostradas pelo *software* definidas

previamente) o que poderia levar à uma diminuição posterior da concentração de analitos na linha de teste.

Figura 13. Linhas de fluxo no desenho inicial.

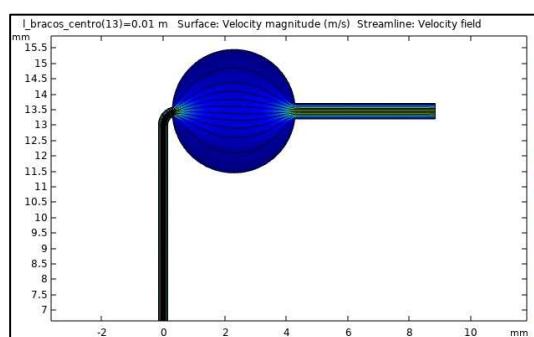


Fonte: Autoria própria.

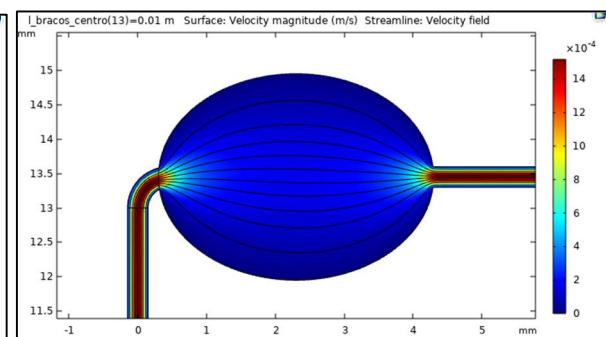
A geometria modificada, utilizando um ângulo de saída de 90º e uma elipse como geometria da área de liberação do conjugado, mostrou avanço significativo na otimização do dispositivo completo. O uso da elipse foi corroborado ao se verificar as linhas de fluxo e compara-las entre as linhas de fluxo do círculo, como mostra a Figura 14.

Figura 14. Linhas de fluxo entre o círculo (A) e a elipse (B) na área de liberação do conjugado.

A



B

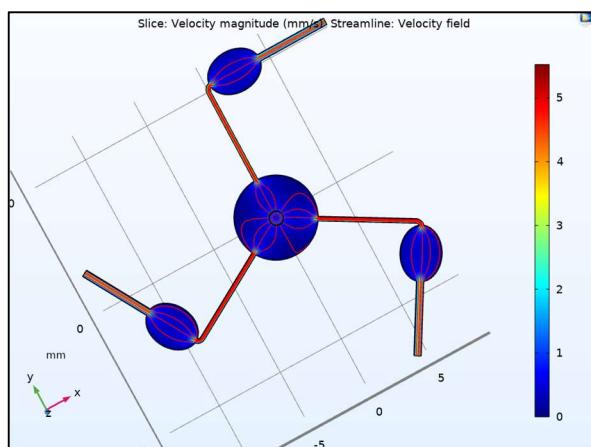


Fonte: Autoria própria.

O fluido ocupou um maior espaço na elipse em relação ao círculo, indicando seu uso no dispositivo original e utilizado no laboratório como vantagem em relação à geometria circular. Foi observado então o comportamento do fluido na geometria com ângulo de 90º e composta por PDMS. O PDMS foi escolhido por ser um material precursor de dispositivos microfluídicos,

como demonstrado por George Whitesides,³⁵ e para que seja possível analisar a fluidodinâmica em canais abertos apenas para fins de simulação matemática (Figura 15).

Figura 15. Linhas de fluxo no primeiro sistema modificado.

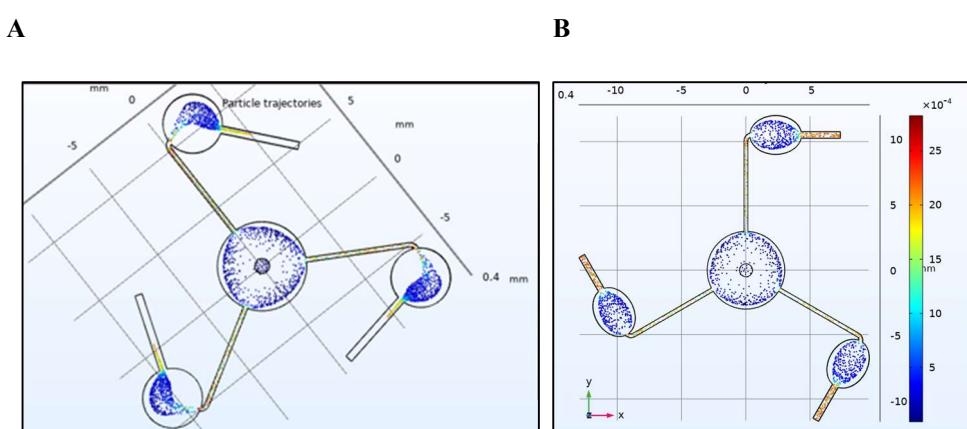


Fonte: Autoria própria.

Nota-se que o fluido ocupa de forma otimizada a região da área de liberação do conjugado, sendo útil na otimização do dispositivo completo posteriormente. É de se destacar a mudança no *streamline* da água ao aplicar-se o PDMS em relação à superfície perfeitamente lisa (Figura 13), em que na Figura 15 já é possível obter o escoamento laminar do fluido.

Além da análise do *streamline* da água, as simulações com partículas que modelam as proteínas *spike* do vírus SARS-CoV-2 mostraram comportamento similar. A Figura 16 mostra o comportamento dos dois dispositivos iniciais, um contendo geometria circular e outro em elipse na zona de conjugado, e os efeitos observados após 15 segundos de adição de água contendo as partículas.

Figura 16. Simulação com partículas nos dispositivo inicial (A) e no dispositivo modificado (B).

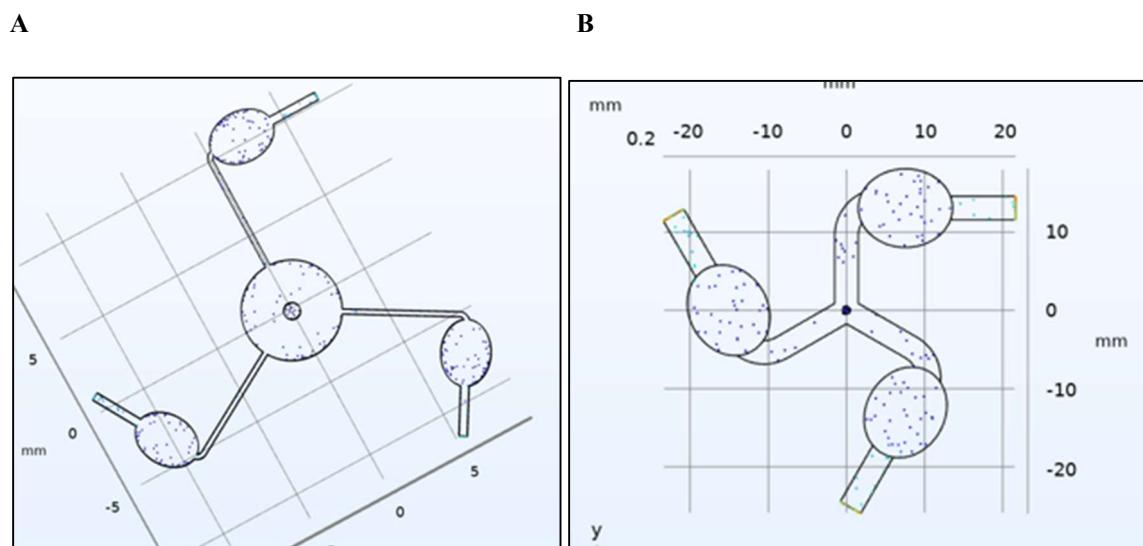


Fonte: Autoria própria.

Na Figura 16A, as partículas preenchem o espaço da área de liberação do conjugado de maneira a se espalharem para as laterais da zona de liberação do conjugado. É de se destacar que as partículas movem-se pela inércia e movimentos advectivos, uma vez que trata-se de uma superfície perfeitamente lisa. Dessa forma, o conjugado pode não se ligar ao analito-alvo e, consequentemente, afetar a sensibilidade do método, uma vez que o sinal gerado pode não ser intenso. A modificação da Figura 16B mostra a utilização mais apropriada do espaço, ocupando toda a geometria à medida em que o fluido percorre o dispositivo, com a utilização de um sistema de canais abertos. Portanto, essa alteração mostrou-se útil para utilização no dispositivo completo.

Já em relação às simulações com as partículas modeladas, foi observado o acúmulo na área da amostra no dispositivo modificado, que se deslocam para as laterais do círculo central e outras que não percorrem todo o dispositivo. Foi proposto então, com base nas simulações com as mesmas partículas, a exclusão do círculo central e o aumento na largura do dispositivo como um todo. A Figura 17 mostra a simulação após 90 segundos dos dois dispositivos modificados.

Figura 17. Simulação com partículas no dispositivo modificado (A) e no dispositivo proposto (B).



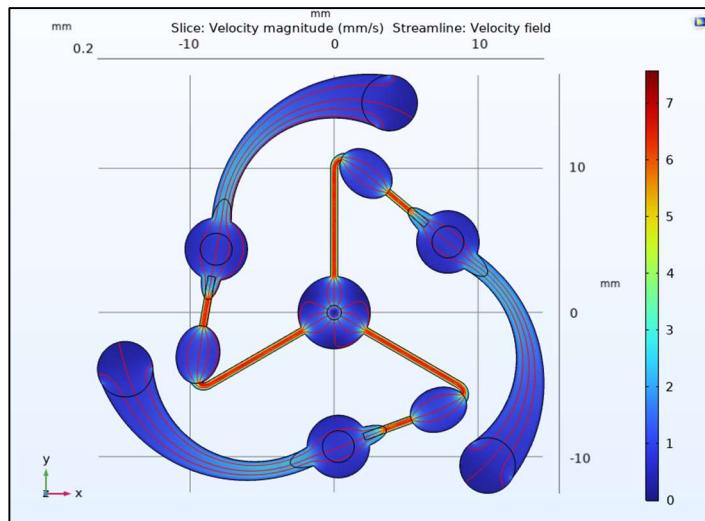
Fonte: Autoria própria.

Apesar das partículas não chegarem até o final do dispositivo completamente, não se observa o acúmulo nas paredes do círculo central, determinando que mais partículas percorram o caminho e possam gerar uma concentração de analitos na linha de teste maior ao *design* inicialmente proposto. Os dois desenhos serviram como base comparativa ao dispositivo atual, utilizado no laboratório.

4.2 Simulações iniciais no projeto modelado do dispositivo laboratorial – *Design 1*

Utilizando água como fluido, a primeira avaliação foi o *streamline* do sistema em PDMS, como mostra a Figura 18. O dispositivo original foi nomeado “*Design 1*”.

Figura 18. *Streamline* do dispositivo laboratorial projetado.

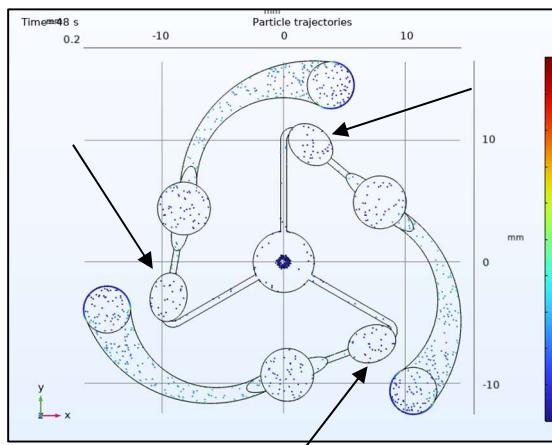


Fonte: Autoria própria.

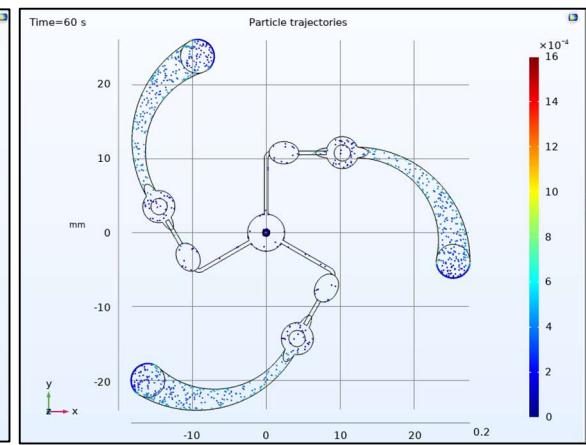
O fluido percorre toda a geometria projetada, não indicando nenhuma falha ao longo do *design 1*. As simulações com partículas foram realizadas da mesma forma que o item 4.1, comparando-se a geometria original dos braços em 140° com a geometria otimizada, em 90°.

Figura 19. Simulação com partículas no dispositivo laboratorial original (A) e no dispositivo otimizado (B).

A



B



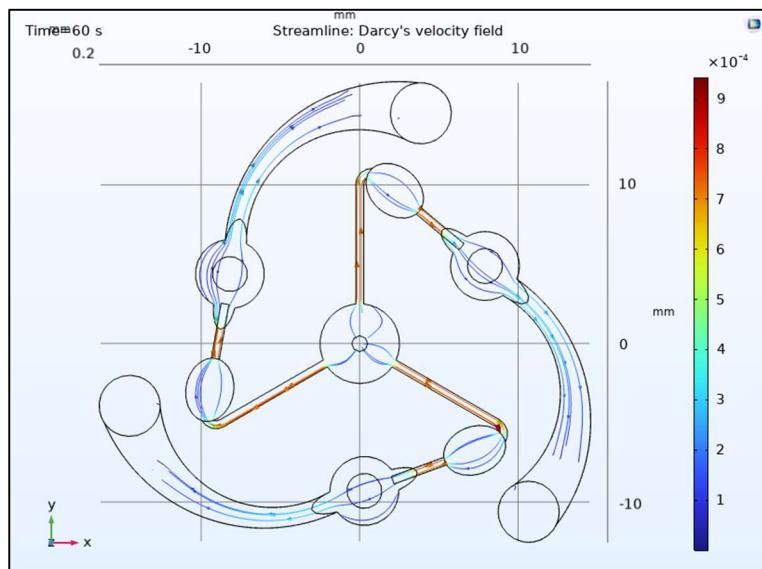
Fonte: Autoria própria.

A persistência do acúmulo de partículas ao longo da geometria original, em especial na área de liberação do conjugado, região destacada pelas setas, foi observada. O mesmo comportamento não é notado na geometria otimizada (Figura 19B, nomeada “*Design 2*”), o que pode indicar uma maior concentração de analitos na zona de desenvolvimento do teste, a ser realizado posteriormente.

4.3 Simulações do teste para anticorpos IgG e IgM no *Design 1*

Para realização do teste foi aplicado a porosidade e permeabilidade da membrana no dispositivo, seguindo especificações fornecidas pelo *software*.³³ Fazendo-se uso da interface *Richards' Equation*, com base na equação (4), foi possível observar o *streamline* do fluido no meio poroso insaturado, como mostra a Figura 20.

Figura 20. *Streamline* da água em meio poroso insaturado.



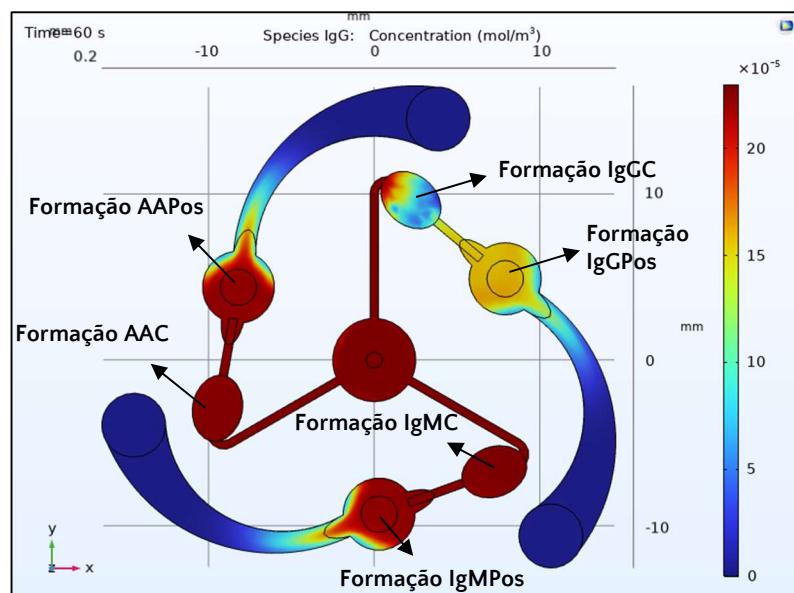
Fonte: Autoria própria.

Após 60 segundos da aplicação do fluido, este percorre todo o *design 1*, modelando o sistema laboratorial, até que alcance a área de absorvente. Isso demonstra que a geometria funciona corretamente com o material poroso adicionado, sendo possível a realização do teste para analitos-alvo.

Após a realização das simulações, três imagens foram adquiridas após 60 segundos de corrida da simulação. A primeira (Figura 21) mostra o decréscimo na concentração de espécies

IgG livres na área de liberação do conjugado. As setas indicam a região designada para cada espécie e foram utilizadas da mesma forma para todos os *designs*.

Figura 21. Concentração da espécie IgG no dispositivo.

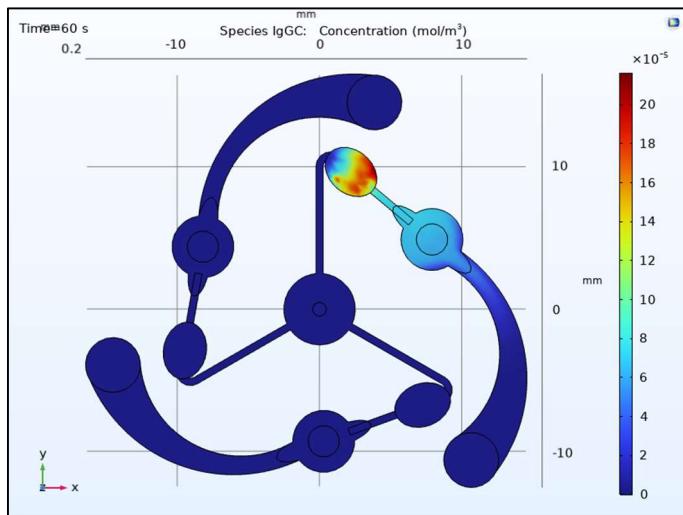


Fonte: Autoria própria.

Esse decréscimo é esperado devido à formação de espécies conjugadas com as AuNPs ali posicionadas, gerando a espécie IgGC, descrita na seção 3.4 do procedimento experimental. É possível observar que o decréscimo ocorre apenas na área selecionada em que ocorreria a reação em laboratório. As demais áreas de liberação de conjugado são para as espécies AA, formando o complexo AAC e IgM, formando o complexo IgMC. A formação otimizada de espécies conjugadas é importante para o passo de detecção, uma vez que serão capturadas nas zonas de teste. O mesmo procedimento é válido para as outras espécies que compõem o teste, AA e IgM.

Em seguida, foi observada a concentração de espécies IgGC (Figura 22) na área de liberação do conjugado.

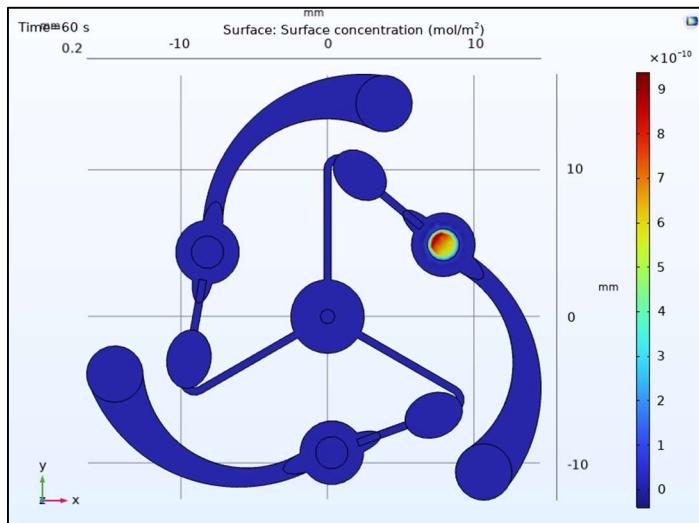
Figura 22. Concentração da espécie IgGC no dispositivo, na área designada.



Fonte: Autoria própria.

Essa imagem corrobora a formação da espécie IgGC na área designada para a reação, sendo possível realizar a captura de imagem da concentração da espécie IgGPos (Figura 23) na superfície do dispositivo.

Figura 23. Concentração da espécie IgGPos no dispositivo, na área designada.



Fonte: Autoria própria.

É possível observar a formação da espécie IgGPos, analito que é formado na presença dos anticorpos de captura na superfície da zona de teste do dispositivo após o contato com o complexo IgG-SCoAu, em concentração máxima um pouco acima de 9×10^{-10} mol/m², de maneira satisfatória. Isso indica que o teste funcionou corretamente e que todas as espécies estão sendo geradas de acordo com o esperado. Fez-se necessário então a otimização do

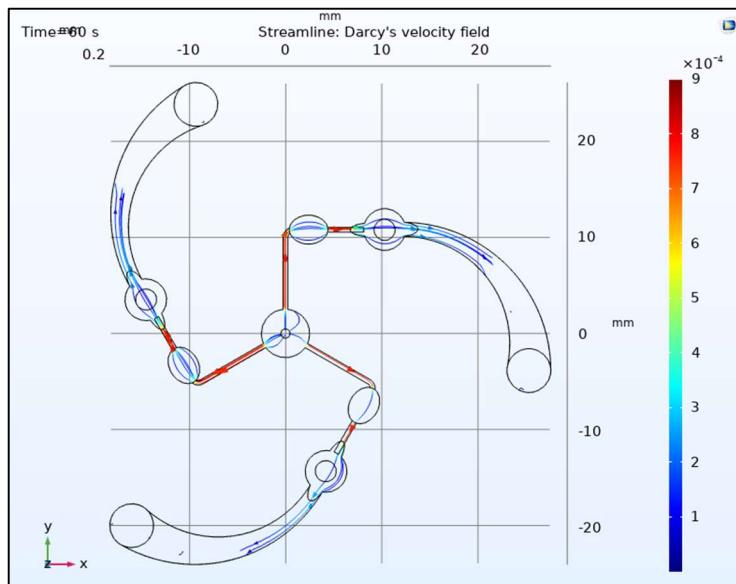
dispositivo, com dois novos *designs*, de forma a comparar a concentração de IgGPos no projeto original e nos otimizados.

4.4 Simulações nos dispositivos otimizados

4.4.1 Simulações no dispositivo com ângulo otimizado – *Design 2*

Assim como no dispositivo original, a primeira etapa foi verificar o *streamline* da água no *design 2*, como mostra a Figura 24, utilizando os mesmos dados de porosidade e permeabilidade da fibra de vidro.

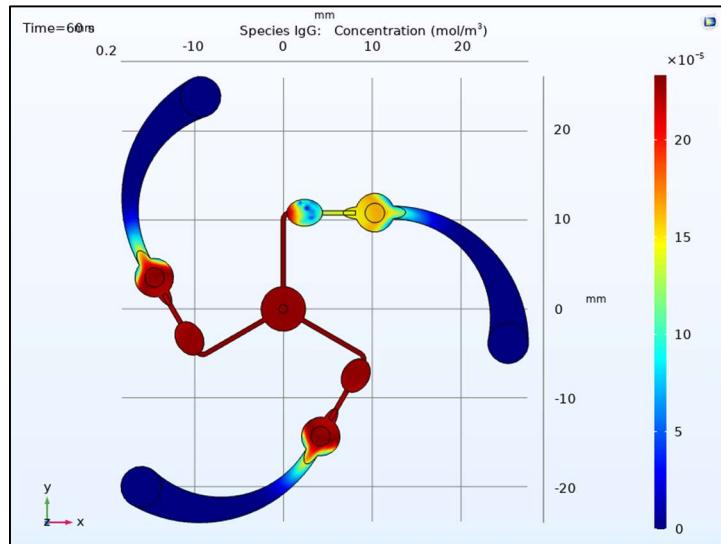
Figura 24. *Streamline* da água no primeiro dispositivo otimizado.



Fonte: Autoria própria.

O comportamento similar é observado, sendo possível prosseguir para o teste completo, analisando as espécies IgG, IgGC e IgGPos, nos locais indicados pela Figura 21. A Figura 25 mostra o decréscimo da concentração da espécie IgG livre adicionada.

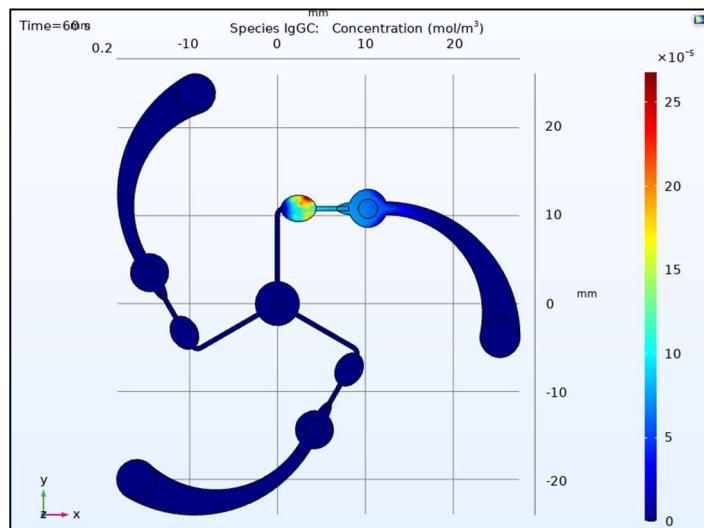
Figura 25. Concentração da espécie IgG no primeiro dispositivo otimizado.



Fonte: Autoria própria.

Assim como no *design 1*, é possível visualizar o decréscimo da concentração de IgG na área de liberação do conjugado designada. Alguns *spots* de concentração são menores, possivelmente devido à diminuição da velocidade do fluido na região e ao tempo de simulação de 60 segundos, que poderia ser ampliado e revelar uma concentração mais homogênea. A Figura 26 mostra a formação do complexo IgGC na área de liberação do conjugado.

Figura 26. Concentração da espécie IgGC no primeiro dispositivo otimizado.

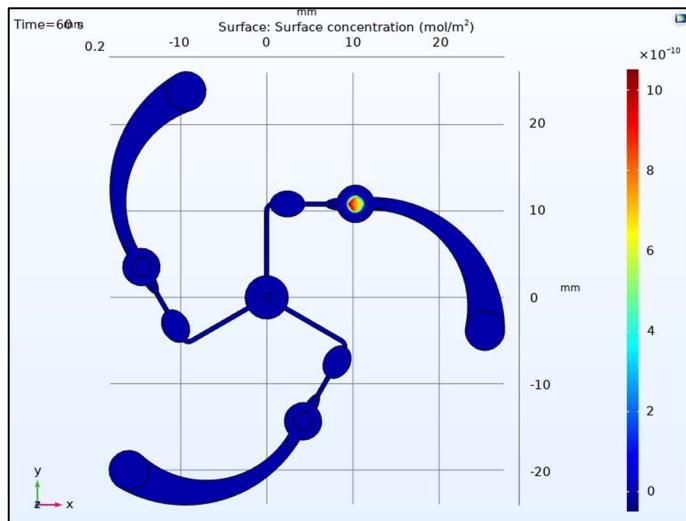


Fonte: Autoria própria.

Comparado ao dispositivo original (*design 1*), a concentração de espécies IgGC é maior, estando um pouco acima de 25×10^{-5} mol/m³, como mostra a escala ao lado do modelo,

enquanto que no dispositivo originalmente projetado essa concentração é de um pouco mais de 20×10^{-5} mol/m³. Há o primeiro indício de maior formação de espécies complexadas, o que leva a um aumento da concentração de espécies IgGPos neste caso, como mostra a Figura 27.

Figura 27. Concentração da espécie IgGPos no dispositivo, na área designada.



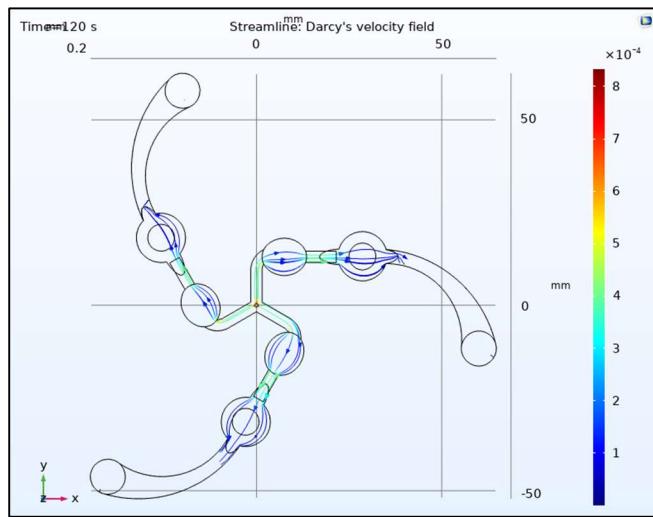
Fonte: Autoria própria.

Observa-se um aumento discreto na concentração de espécies IgGPos em relação ao *design 1*, indicando que a primeira otimização pode ser válida para uso em laboratório, uma vez que a concentração de IgG positivo maior pode levar a uma diminuição do uso de reagentes como a concentração de anticorpos utilizada em cada teste, por exemplo.

4.4.2 Simulações no dispositivo com área da amostra e tamanho geral otimizados – *Design 3*

Para mitigar o impasse de partículas paradas na área da amostra do dispositivo, um terceiro *design* foi proposto, nomeado “*Design 3*”, retirando a área da amostra circular e alargando as demais áreas do desenho. Análogo às etapas anteriores nas seções 4.3 e 4.4 para o *design 2*, foi verificado o *streamline* da água na geometria (Figura 28) após 120 segundos.

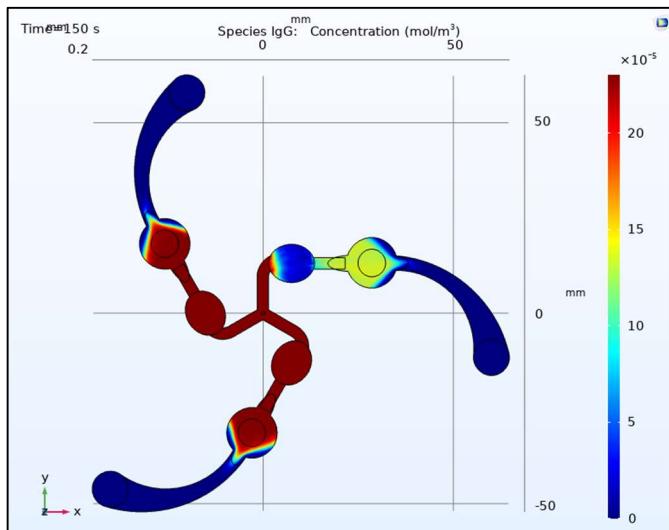
Figura 28. Streamline da água no segundo dispositivo otimizado.



Fonte: Autoria própria.

Foi necessário um maior tempo para o teste pois a velocidade do fluido decresce acentuadamente em relação às geometrias anteriores, uma vez que o dispositivo apresenta um tamanho quase quatro vezes superior ao *design* original, com comprimento de pouco mais de 50 mm e largura quase três vezes maior. Dessa forma, os resultados de IgG livre, IgGC e IgGPos levam em conta um teste após 150 segundos, ainda dentro dos parâmetros esperados de um teste rápido.³⁶ A concentração de IgG livre é demonstrada pela Figura 29.

Figura 26. Concentração da espécie IgG livre no segundo dispositivo otimizado.

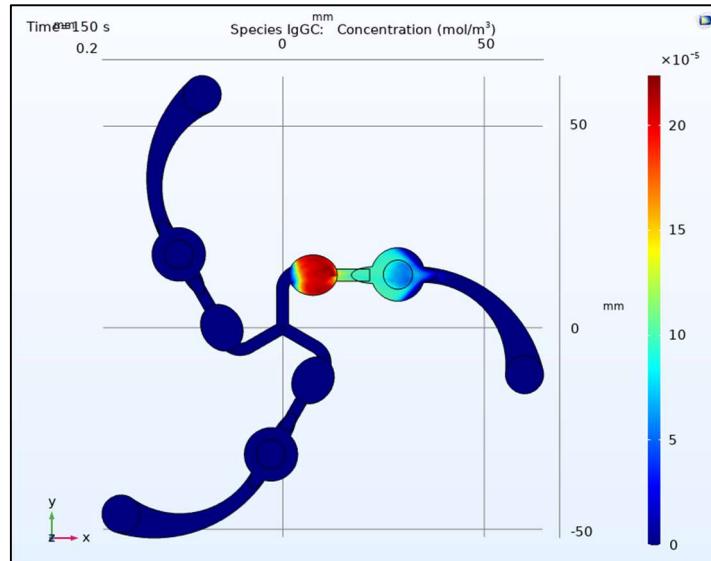


Fonte: Autoria própria.

A menor velocidade do fluido leva a um preenchimento mais homogêneo da área de liberação do conjugado, em que se observa o decaimento de concentração de IgG livre de

maneira uniforme ao longo da elipse projetada. A Figura 30 mostra a formação do complexo IgGC.

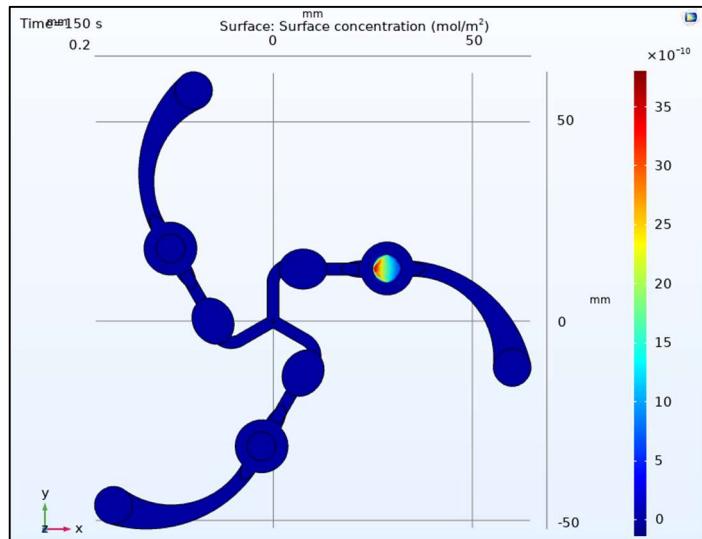
Figura 30. Concentração da espécie IgGC no segundo dispositivo otimizado.



Fonte: Autoria própria.

A imagem mostra todo o preenchimento por espécies conjugadas. Pode-se observar então a formação de espécies IgG positivas (Figura 31).

Figura 31. Concentração da espécie IgGPos no segundo dispositivo otimizado.



Fonte: Autoria própria.

É possível notar uma concentração máxima um pouco acima de 35×10^{-10} mol/m² e uma concentração no meio da linha de teste entre 15 e 20×10^{-10} mol/m². Comparativamente

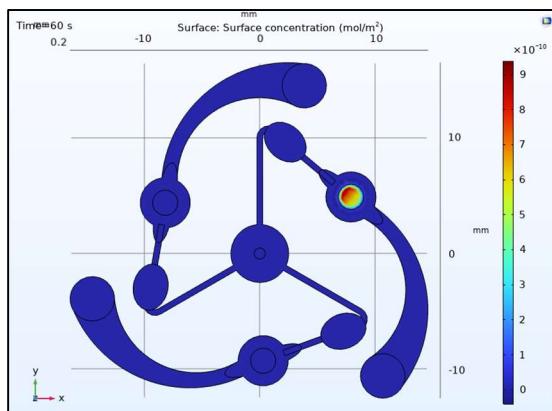
aos *designs* anteriores, que apresentam uma faixa de concentração aproximadamente entre 6 e 12×10^{-10} mol/m², o último *design* demonstra a utilidade da otimização sem o uso de materiais ou reagentes para tal.

4.5 Comparativo de simulações do teste nos dispositivos projetados

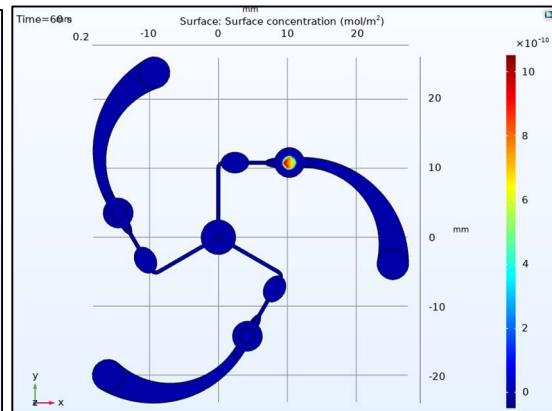
A Figura 29 mostra o comparativo da concentração de espécies IgG positivas na linha de teste dos dispositivos projetados.

Figura 29. Concentração da espécie IgGPos nos três dispositivos projetados, (A) original, (B) otimização do ângulo e (C) otimização da área da amostra e largura do modelo.

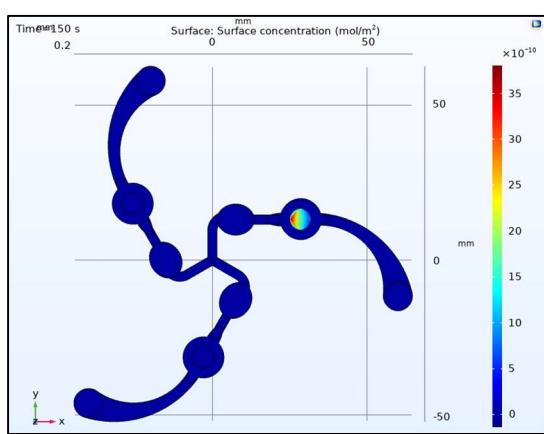
A



B



C



Fonte: Autoria própria.

O aumento gradual na concentração de IgGPos na superfície da linha de teste indica que as otimizações foram essenciais para o projeto, aumentando a concentração de analito desejada, podendo diminuir o uso de reagentes para o teste. Além disso, foi possível projetar modelos

sem uso de tentativa e erro, sendo viável a construção de modelos laboratoriais com estruturas definidas. Comportamento similar foi observado para as espécies IgMPos e AAPos, demonstrando o funcionamento das otimizações realizadas.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Com o uso do *software COMSOL Multiphysics* foi possível simular e otimizar um sistema microfluídico para a detecção multiplex, plataforma que é útil para economia de tempo e recursos, direcionando esforços para otimizar os sistemas já empregados no laboratório. Visando a diminuição no uso de recursos laboratoriais como os anticorpos utilizados no teste, a plataforma se mostra útil e seu custo é compensado ao se diminuir o uso de reagentes de trabalho. A utilização dessa abordagem, até então não utilizada pelo grupo de pesquisa, permitirá a utilização em outros modelos de dispositivos.

Como perspectivas, é possível aplicar outros materiais no dispositivo como a nitrocelulose e a celulose, para uma simulação mais precisa. É possível utilizar inteligência artificial para criação de novas geometrias que sejam ainda mais otimizadas, além de utilizar o próprio modelo em laboratório para avaliar os resultados práticos esperados. O foco na parte química do processo também é uma perspectiva importante, levando-se em conta a cinética das reações, sua reversibilidade, entre outros fatores que podem aprimorar as simulações matemáticas e torná-las mais precisas.

6. BIBLIOGRAFIA

1. GALE, B. K. A review of current methods in microfluidic device fabrication and future commercialization prospects. **Inventions**, v. 60, ed. 3, 2018.
2. WU, Q. *et al.* Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. **BioMedical Engineering Online**, v. 19, ed. 9, 2020.
3. YEO, L. Y. *et al.* Microfluidic devices for bioapplications. **Small**, v. 7, ed. 1, p. 12-48, 2011.
4. PAROLO, C. *et al.* Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays. **Nature Protocols**, v. 15, p. 3788-3816, 2020.

5. HUANG, Y. *et al.* Lateral flow biosensors based on the use of micro-and nanomaterials: a review on recent developments. **Microchimica Acta**, v. 187, ed. 1, p. 1-25, 2020.
6. POSTHUMA-TRUMPIE, G. A.; KORF, J.; VAN AMERONGEN, A. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, ed. 2, p. 569-582, 2009.
7. DANKS, C.; BARKER, I. On-site detection of plant pathogens using lateral-flow devices. **EPPO Bulletin**, v. 30, ed. 3-4, p. 421-426, 2000.
8. SAJID, M.; KAWDE, A.N.; DAUD, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, ed. 6, p. 689-705, 2015.
9. JÄÄSKELÄINEN, A. E. *et al.* Evaluation of three rapid lateral flow antigen detection tests for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 137, p. 104785, 2021.
10. HSIAO, W. W. W. *et al.* Recent advances in novel lateral flow technologies for detection of COVID-19. **Biosensors**, v. 11, ed. 9, p. 295, 2021.
11. FLOWER, B. *et al.* Clinical and laboratory evaluation of SARS-CoV-2 lateral flow assays for use in a national COVID-19 seroprevalence survey. **Thorax**, v. 75, ed. 12, p. 1082-1088, 2020.
12. KOCZULA, K. M.; GALLOTTA, A. Lateral flow assays. **Essays in Biochemistry**, v. 60, ed. 1, p. 111-120, 2016.
13. HSIEH, H. V.; DANTZLER, J. L.; WEIGL, B. H. Analytical tools to improve optimization procedures for lateral flow assays. **Diagnostics**, v. 7, ed. 2, p. 29, 2017.
14. SCHÜLING, T. *et al.* Aptamer-based lateral flow assays. **AIMS Bioengineering**, v. 5, ed. 2, p. 78-102, 2018.
15. CHEN, A.; YANG, S. Replacing antibodies with aptamers in lateral immunoassay. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 71, p. 230-242, 2015.
16. BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. Lateral flow assays: Principles, designs and labels. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 286-306, 2016.

17. CHEN, Y. *et al.* Development and optimization of a multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous determination of three mycotoxins in corn, rice and peanut. **Food Chemistry**, v. 213, p. 478-484, 2016.
18. ROSA, B. G. *et al.* Multiplexed immunosensors for point-of-care diagnostic applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 203, 2022.
19. Rapid lateral flow test strips: Considerations for product development. **Merck Millipore**: 2013.
20. PAROLO, C. *et al.* Simple paper architecture modifications lead to enhanced sensitivity in nanoparticle based lateral flow immunoassays. **Lab on a Chip**, v. 3, ed. 13, p. 386-390, 2013.
21. Structure of a LFA test. In: **Lateral flow assays**. 2019. Disponível em: <https://www.lateralflows.com/lateral-flow-assays/>. Acesso em: 26 jul. 2022.
22. DICKINSON, E. J. F.; EKSTRÖM, H.; FONTES, E. COMSOL Multiphysics: Finite element software for electrochemical analysis. A mini-review. **Electrochemistry Communications**, v. 40, p. 71-74, 2014.
23. Characteristics of a Fluid. In: NAKAYAMA, Y. **Introduction to Fluid Mechanics**. 2. ed.: Butterworth-Heinemann, 2018. cap. 2, p. 9-23.
24. URUBA, V. On Reynolds number physical interpretation. **AIP Conference Proceedings**, v. 2000, ed. 1, 2018.
25. The Reynolds Number. 2020. Disponível em: https://doc.comsol.com/5.6/doc/com.comsol.help.comsol/comsol_ref_fluidflow.25.08.html#3842794. Acesso em: 03 jul. 2022.
26. Mass transport processes in artificial organs. In: JOHN LEVER, M. **Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering**. London, UK: Imperial College London, 2005. cap. 15, p. 153-166.
27. Concrete rheology: a basis for understanding chemical admixtures. In: YAHIA, A.; MANTELLATO, S.; FLATT, R. J. **Science and Technology of Concrete Admixtures**. Woodhead Publishing, 2016, cap. 7, p. 97-127.

28. Flow behaviour and viscosity. In: MEZGER, T. G. **The Rheology Handbook**. Hanover, Germany: Vincentz Network, 2011, ed. 3, cap. 2, p. 21-31.
29. Principle of Groundwater Flow. In: ATANGANA, A. **Fractional Operators with Constant and Variable Order with Application to Geo-Hydrology**. Academic Press, 2018. cap. 2, p. 15-47.
30. Darcy's Law, Head, Gradient and Hydraulic Conductivity. In: WOESSNER, W.; POETER, E. **Hydrogeologic Properties of Earth Materials and Principles of Groundwater Flow**. The Groundwater Project, 2020, cap. 4.
31. FARTHING, M. W.; OGDEN, F. L. Numerical solutions of Richards' equation: A review of advances and challenges. **Soil Science Society of America Journal**, v. 86, ed. 6, p. 1257-1269, 2017.
32. Transport phenomena in fuel cells: Mass transfer. In: SUNDÉN, B. **Hydrogen, Batteries and Fuel Cells**. Academic Press, 2019. cap. 9.3, p. 154-156.
33. Fluid mechanics: Transport and diffusion analyses as applied in biomaterials studies. In: MUKUNDAKRISHNAN, K.; AYYASWAMY, P. S. **Comprehensive Biomaterials**. Elsevier, 2011, v. 3, cap. 3.309, p. 133-153.
34. FONTES, E. **Modelling a Rapid Detection Test in COMSOL Multiphysics**. 21 abr. 2021. Disponível em: <https://www.comsol.com/blogs/modeling-a-rapid-detection-test-in-comsol-multiphysics>. Acesso em: 30 jun. 2022.
35. DUFFY, D. C. *et al.* Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **Analytical Chemistry**, v. 70, ed. 23, p. 4974-4984, 1998.
36. PEELING, R. W. *et al.* Scaling up COVID-19 rapid antigen tests: promises and challenges. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, ed. 9, p. 290-295, 2021.

7. ANEXO A

Relatório de plágio feito pela plataforma Turnitin.

