

Manuscrito Aceite

Título: Sistemas Aquosos Bifásicos e Microfluídica: A Combinação Ideal para Alvos Biológicos

Autores: Maria S. M. Mendes, João P. Conde, Mara G. Freire Francisca A. e Silva

Este manuscrito foi aceite após revisão por pares e aparece como um Manuscrito Aceite *online* antes de edição, provas e publicação formal da versão final (VF) no “QUÍMICA”. A VF será disponibilizada brevemente e pode ser ligeiramente diferente do Manuscrito Aceite como resultado de edição.

Os autores são responsáveis pelo conteúdo deste Manuscrito Aceite.

Disponível *online*: 03/03/2026



Sistemas Aquosos Bifásicos e Microfluídica: A Combinação Ideal para Alvos Biológicos

Maria S. M. Mendes,^{1,2} João P. Conde,^{2,3} Mara G. Freire,¹
Francisca A. e Silva^{1*}

¹CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro, Departamento de Química, Universidade de Aveiro

²Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores – Microsistemas e Nanotecnologias (INESC MN)

³Departamento de Bioengenharia, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa

francisca.silva@ua.pt

Abstract

Aqueous Biphasic Systems and Microfluidics: The Ideal Combination for Biological Targets. *The integration of aqueous biphasic systems (ABS), known for their biocompatibility and selectivity, with microfluidic technologies offering precise microscale control is transforming how biological targets are handled, enabling fully aqueous and adaptable microenvironments. This review highlights advances in this promising combination, with applications ranging from bioanalysis and biomolecule purification to the development of innovative biocompatible systems. Reported progress includes the isolation of nanoparticles, nucleic acid enrichment, protein purification, cell separation, drug encapsulation and controlled delivery, as well as biofabrication. The integration of these technologies enhances miniaturization and automation, reduces reagent consumption, and consolidates multiple operations into a single platform. Despite technical hurdles in real-world scenarios, this approach paves the way for new solutions in clinical diagnostics, personalized medicine, and biotechnology.*

Resumo

A integração de sistemas aquosos bifásicos (SAB), reconhecidos pela sua biocompatibilidade e seletividade, com tecnologias microfluídicas de controlo preciso em microescala está a transformar a forma como manipulamos alvos biológicos, criando microambientes totalmente aquosos e adaptáveis. Esta revisão destaca os avanços

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2026

desta combinação promissora, com aplicações que vão da bioanálise e purificação de biomoléculas à criação de sistemas biocompatíveis inovadores. São apresentados progressos no isolamento de nanopartículas, enriquecimento de ácidos nucleicos, purificação de proteínas, separação celular, encapsulação e entrega controlada de fármacos, bem como biofabricação. A integração destas tecnologias potencia a miniaturização e automação, reduz o consumo de reagentes e reúne diversas operações numa única plataforma. Apesar dos entraves técnicos em cenários reais, esta abordagem abre caminho a novas soluções para diagnóstico clínico, medicina personalizada e biotecnologia.

1. Sistemas Aquosos Bifásicos e Microfluídica: Fundamentos e Perspetivas de Integração

Desde a descoberta da sua formação por Beijerinck em 1896 até ao estabelecimento do seu uso em biosseparação por Albertsson em 1958, os sistemas aquosos bifásicos (SAB) evoluíram para numerosas aplicações [1,2]. Constituem uma técnica de extração líquido-líquido em meio aquoso, baseada em solutos incompatíveis que, em proporções adequadas, originam duas fases distintas, de modo análogo à separação água-azeite. Ao contrário dos sistemas convencionais com solventes orgânicos voláteis, os SAB distinguem-se por envolverem apenas fases aquosas, formadas por solutos potencialmente biocompatíveis [3].

A conceção racional de um SAB segue um procedimento integrado, ilustrado na Figura 1A. Este inicia-se pela seleção criteriosa dos seus constituintes, que podem incluir polímeros, surfactantes, sais, açúcares, aminoácidos, líquidos iónicos e solventes eutécticos profundos [4]. Para apoiar esta seleção, a Figura 1B apresenta uma matriz comparativa que sintetiza as principais características destes constituintes face a requisitos operacionais relevantes. A escolha do sistema deve considerar não apenas as propriedades individuais de cada componente, mas, sobretudo, o equilíbrio resultante do seu emparelhamento.

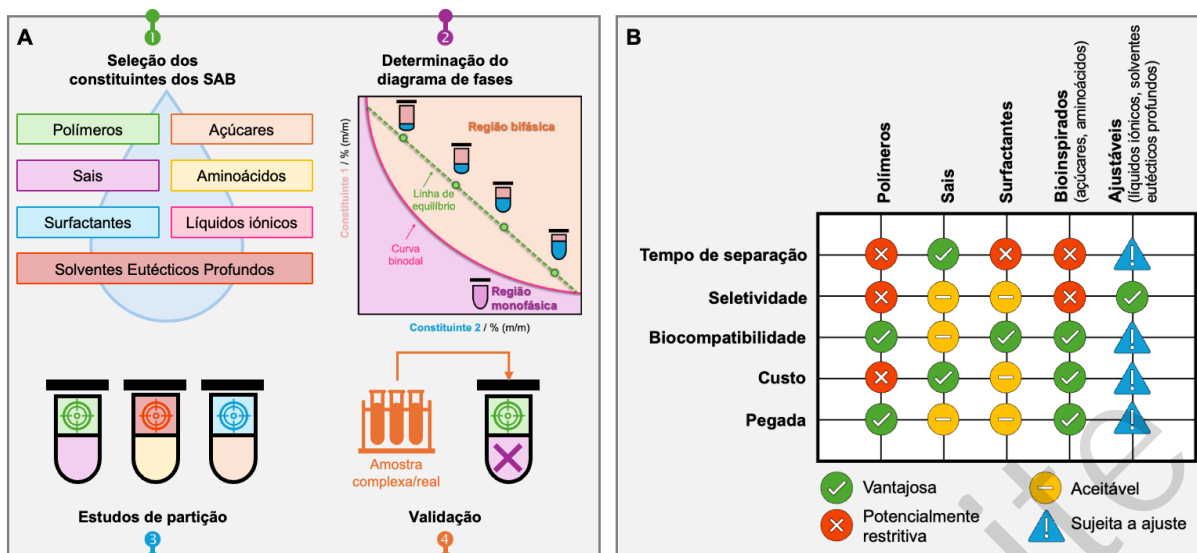


Figura 1 - Conceção de um SAB: (A) Etapas fundamentais do processo de desenvolvimento. (B) Matriz orientadora para a seleção dos constituintes em função das características pretendidas.

Sistemas clássicos formados por dois polímeros, tipicamente o polietileno glicol (PEG) e o dextrano (DEX), apresentam boa biocompatibilidade, embora com seletividade limitada [5]. Em alternativa, a combinação de um polímero com um sal oferece tempos de separação mais curtos, mas a força iónica elevada pode comprometer a estabilidade de compostos sensíveis [6]. Por sua vez, sistemas com surfactantes favorecem a estabilização por micelas, mas requerem maior controlo das condições operacionais, especialmente da temperatura [7]. Já os sistemas baseados em líquidos iónicos ou solventes eutécticos profundos destacam-se pela elevada seletividade e adaptabilidade em matrizes complexas [8,9]. Por fim, sistemas que contenham açúcares ou aminoácidos tendem a estar associados a baixa toxicidade e elevada biodegradabilidade, mas podem ter limitações em termos de capacidade de separação de fases [10,11].

Segue-se a determinação do diagrama de fases ternário [12]. Este serve para identificar as condições de formação das duas fases aquosas e as composições em equilíbrio, onde a curva binodal define os limites operacionais e as linhas de equilíbrio indicam a composição de cada fase [13]. Para concentração seletiva, aplicam-se misturas situadas na mesma linha de equilíbrio, permitindo o enriquecimento das espécies-alvo na fase de menor volume [14]. Procedem-se a estudos de partição para avaliar coeficientes, eficiências, purezas e viabilidade, bem como o impacto de parâmetros como pH, temperatura, força iónica e aditivos [15]. Como etapa final, os sistemas são validados com matrizes reais ou complexas, comprovando a sua aplicabilidade prática [16].

Por sua vez, os dispositivos microfluídicos, com canais mais finos que um fio de cabelo, permitem manipular fluidos em escala micrométrica com alta precisão, aproveitando o fluxo laminar e previsível característico dessas dimensões [17,18]. Desta forma, possibilitam a realização de operações complexas com uma eficiência sem precedentes [19]. A principal vantagem reside no consumo reduzido de reagentes e amostras, juntamente com a capacidade de integrar múltiplas operações num único dispositivo, reduzindo de forma significativa o tempo e a complexidade do processamento [19]. O alcance desta tecnologia abrange setores como a eletrônica ou a medicina, onde permite diagnósticos rápidos, terapias personalizadas e análises complexas [20].

O delineamento de dispositivos microfluídicos é um processo multidisciplinar, como representado na Figura 2, que começa pela definição clara da aplicação, natureza da amostra e requisitos funcionais [20]. Segue-se a concepção da arquitetura, definindo geometria dos canais, tipo de fluxo, número de entradas/saídas e materiais, incluindo polidimetilsiloxano (PDMS), policarbonato (PC), polimetilmetacrilato (PMMA), fluoropolímero (Teflon), papel, silício, vidro ou metais [21,22]. Complementarmente, a modelação e simulação computacionais ajudam a prever o comportamento do sistema, antes da prototipagem [23]. O protótipo pode posteriormente ser fabricado via litografia suave, impressão 3D, moldagem por injeção, entre outros métodos, sendo depois caracterizado quanto ao desempenho hidrodinâmico e às características analíticas [24]. Por fim, o dispositivo é integrado com elementos funcionais (sensores, atuadores, unidades de deteção) e validado com amostras reais, garantindo viabilidade em ambientes laboratoriais, industriais, clínicos ou *point-of-care* [20,24].

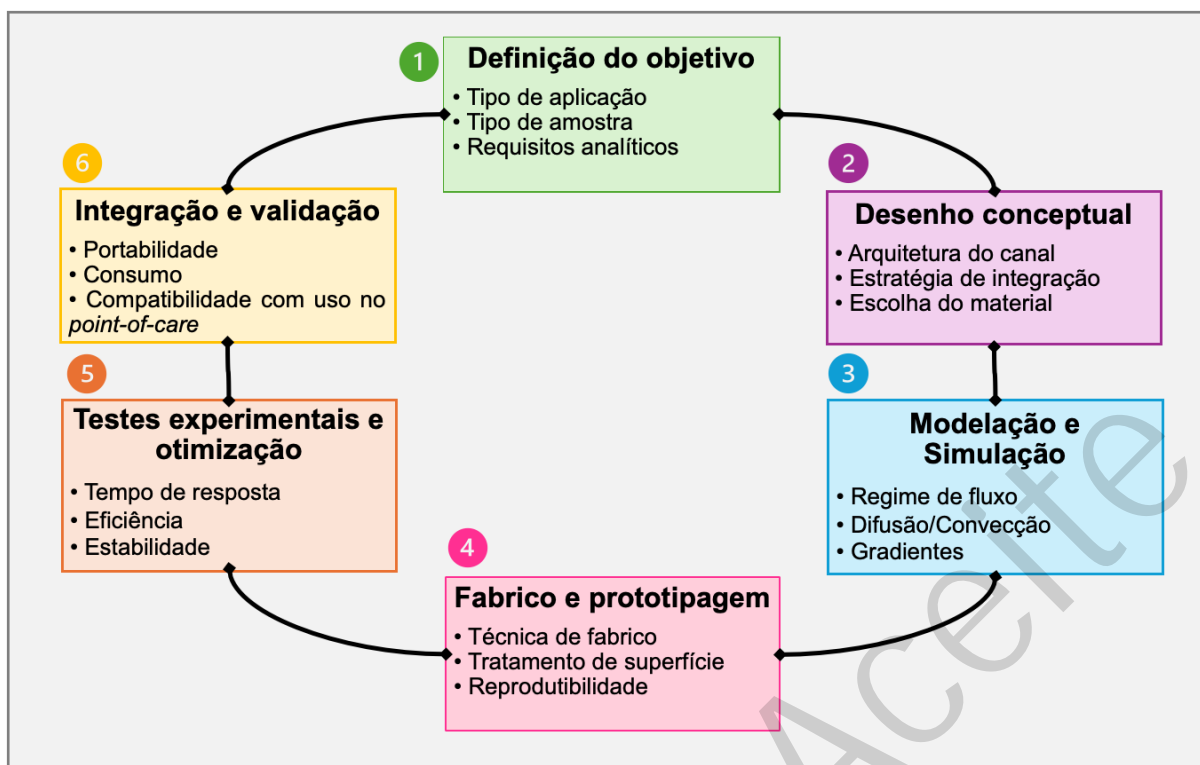


Figura 2 - Principais etapas envolvidas no processo de desenvolvimento e otimização de um dispositivo microfluídico.

Embora os SAB estejam bem estabelecidos em regime de batelada, os processos de partição são maioritariamente governados por difusão, o que frequentemente se traduz em cinéticas lentas. A transposição destes sistemas para microdispositivos altera este paradigma, uma vez que o escoamento laminar de fases imiscíveis em microcanais reduz as distâncias de difusão, promovendo separações mais rápidas [18]. Nestes microssistemas, o transporte de biomoléculas entre fases ocorre essencialmente por difusão através da interface aquosa, enquanto o deslocamento ao longo do canal é assegurado pelo escoamento do fluido, isto é, por advecção. Este regime contínuo opera a números de Reynolds muito baixos e é caracterizado por interfaces aquosas estáveis, com reduzida tensão interfacial [19,25]. Estas condições permitem uma partição eficiente e controlada, dispensando o uso de surfactantes ou ambientes lesivos. Assim, a combinação destas características alia a seletividade dos processos de extração líquido-líquido ao controlo rigoroso de volumes em microescala, possibilitando o desenvolvimento de plataformas miniaturizadas, automatizáveis e energeticamente eficientes, aptas para operações biocompatíveis e isentas de solventes tóxicos [26].

Existem diversas abordagens microfluídicas para a manipulação de alvos biológicos, desde pequenas moléculas bioativas a macromoléculas funcionais, células,

tecidos e veículos de entrega de fármacos. Estas incluem sistemas em gotas óleo-água, microcanais com superfícies funcionalizadas e técnicas assistidas por campos externos [21]. Contudo, muitas destas estratégias recorrem a interfaces orgânicas, modificações de superfície ou condições operacionais exigentes, o que pode comprometer a biocompatibilidade, a robustez e a versatilidade dos dispositivos. Em resposta a estas limitações, a integração de SAB com microfluídica representa uma abordagem tecnicamente complementar e promissora para operações realizadas em ambientes inteiramente aquosos. Explorando este potencial, o presente artigo de revisão analisa de forma integrada os avanços desta combinação tecnológica, com foco no seu uso em aplicações biológicas. São abordados processos de extração, separação, concentração seletiva e análise de nanopartículas, ácidos nucleicos, proteínas e células, bem como o desenvolvimento de tecnologias para processamento, encapsulação e entrega de fármacos, além da biofabricação de plataformas regenerativas. Por fim, discutem-se os principais desafios associados à miniaturização e translação destes microambientes aquosos para contextos reais. A Figura 3 proporciona uma visão integrada das principais funcionalidades, operações e contextos de utilização explorados, enquanto a Tabela 1 sintetiza as estratégias descritas, organizadas de acordo com a aplicação visada, o tipo de SAB, a arquitetura dos dispositivos e os alvos biológicos [27-63].

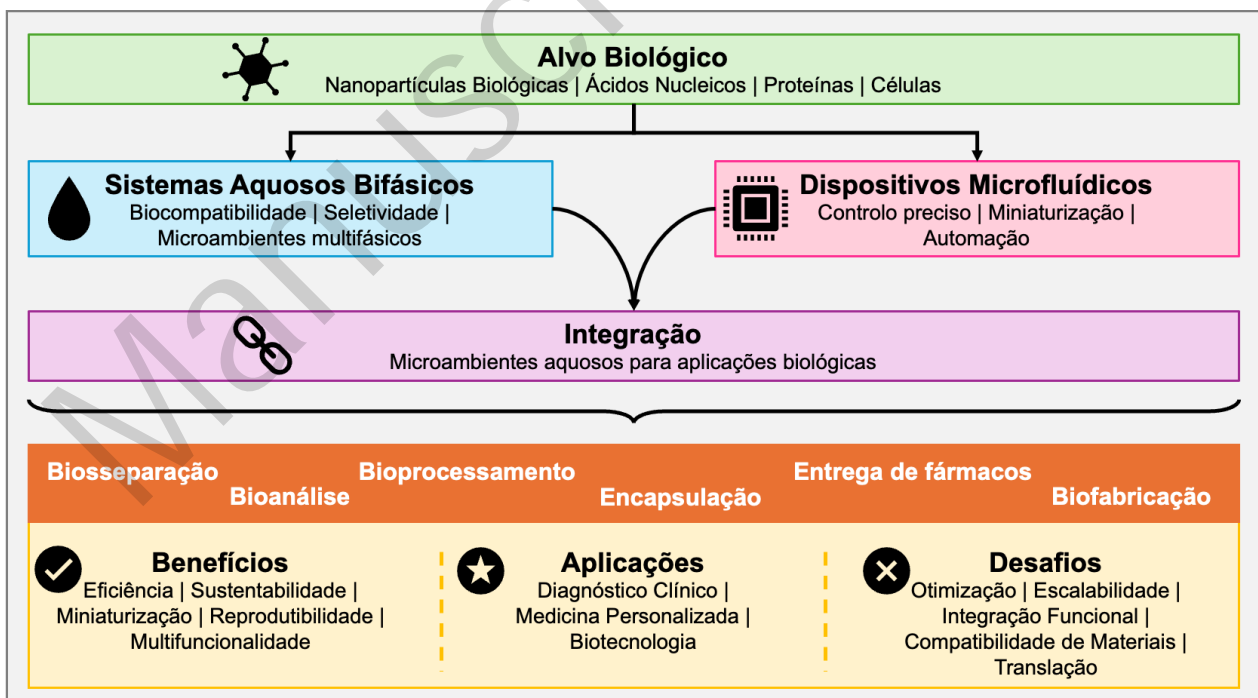


Figura 3 - Complementaridade entre SAB e microfluídica, evidenciando o potencial para gerar microambientes aquosos adequados a aplicações com alvos biológicos.

Tabela 1 - Estratégias integradas baseadas em SAB e microfluídica aplicadas à manipulação de alvos biológicos.

Aplicação	SAB	Dispositivo microfluídico	Alvo biológico
Isolamento de Nanopartículas Biológicas	PEG 1k-35k g mol ⁻¹ + DEX 40k-500k g mol ⁻¹ [27,28] ou (K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄) ou (NH ₄) ₂ SO ₄ ou Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ [28].	Litografia suave em PDMS [27,28].	Vesículas extracelulares [27]; partículas do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) [28].
Separação e Enriquecimento de Ácidos Nucleicos	PEG 6k-35k g mol ⁻¹ + DEX 10k g mol ⁻¹ [29–32].	Litografia suave em PDMS, com campo elétrico aplicado [29–32].	Fragmentos e moléculas de ADN (75–48502 pares de bases), marcados com YOYO-1, fluoresceína, Cy3 ou Cy5 [29–32].
Purificação e Análise de Proteínas	PEG 1k-35k g mol ⁻¹ + DEX 10k-500k g mol ⁻¹ [29,33–35] ou K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ [36–39] ou (NH ₄) ₂ SO ₄ [40] ou Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ [41] ou K ₂ HPO ₄ [42] ou KH ₂ PO ₄ [43] ou tensoativo zwitteriônico 3-10 ou SDS ou Triton X-114 [44]; Tergitol 15-S-7 + Na ₂ HPO ₄ /C ₆ H ₈ O ₇ [45]; [C ₄ mim][BF ₄] + D-frutose [46]; [N ₄₄₄₄]Cl + K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ [47].	Micromaquinação em PMMA ou litografia suave em PDMS, ambos com campo elétrico aplicado [29,33,34]; litografia suave em PDMS [35,37–39,44,47]; fotolitografia e gravação húmida, em vidro sodalime [36]; montagem de capilares cilíndricos e quadrados em vidro de borossilicato [40]; gravação a laser de CO ₂ em vidro Pyrex [41]; <i>Micronit Microfluidics</i> em vidro [42,45,46]; gravação a laser e prensagem a quente a vácuo em PMMA [43].	Albumina [29,33,34,36,37,40,41,46]; γ-globulinas [34,37]; anidrase carbónica [29]; β-galactosidase [29,36]; proteína fluorescente verde [36,37]; glutatona S-transferase [36]; insulina [37]; proteína A [37], proteínas de membrana [44]; α-amilase [42]; R-ficoeritrina [45]; ribonuclease A e a sua forma PEGuilada [38]; proteína fluorescente vermelha [39]; VEGF165 [43]; PSA [47]; atividade enzimática da dextranase [35].
Controlo e Processamento de Biofármacos	PEG 3,35k-8k g mol ⁻¹ + K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , podendo conter NaCl [37,48–50].	Litografia suave em PDMS [37,48–50].	IgG e IgG-FITC [37,48–50].
Separação e Fracionamento Celular	PEG 3,35k-35k g mol ⁻¹ + DEX 40k-500k g mol ⁻¹ [51–53] ou K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ [54].	Litografia suave em PDMS [51,53]; maquinação CNC, moldagem por injeção e impressão 3D em plástico, com aplicação de força centrífuga [52]; canais hidrofóbicos tratados com solução de tricloro(octadecilsilano) em tolueno [54].	Leucócitos [51,53]; eritrócitos [51,52,54]; plasma rico em plaquetas, camada leucoplaquetária (<i>buffy coat</i>), neutrófilos [52].
Encapsulação e Biofabricação	PEG 8k-35k g mol ⁻¹ ou TN-PEG 10k g mol ⁻¹ ou TA-PEG 10k g mol ⁻¹ + DEX 32k-500k g mol ⁻¹ [55–62] ou MgSO ₄ [62]; PEG/DEX com C ₆ H ₇ NaO ₆ [63].	Litografia por luz difusa traseira ou litografia suave em PDMS [55–59,62]; capilares de vidro coaxiais hidrofóbicos [60]; alinhamento coaxial de capilares de vidro [63]; ponteira de pipeta extrudida [61].	Formação de microgotículas e microcápsulas [55,57,60]; encapsulação de células (micropartículas, eritrócitos, células endoteliais); [56,57,62,63]; entrega seletiva de células e moléculas [58]; estimulação subcelular <i>in situ</i> [59]; microimpressão de biomateriais [61].

Abreviaturas e Fórmulas Químicas: [C₄mim][BF₄] – tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio; C₆H₇NaO₆ – alginato de sódio; Cy3 – cianina-3 (fluoróforo); Cy5 – cianina-5 (fluoróforo); DEX – dextrano; FITC – isotiocianato de fluoresceína; IgG – imunoglobulina G; K₂HPO₄ – hidrogenofosfato de dipotássio; K₂HPO₄/KH₂PO₄ – tampão fosfato; KH₂PO₄ – di-hidrogenofosfato de monopotássio; k – milhar (10³, usado para indicar massas molares); Na₂HPO₄/C₆H₈O₇ – tampão McIlvaine; NaCl – cloreto de sódio; Na₃C₆H₅O₇ – citrato de trissódio; (NH₄)₂SO₄ – sulfato de amónio; [N₄₄₄₄]Cl – cloreto de tetrabutilamónio; PDMS – polidimetilsiloxano; PEG – polietilenoglicol; PEGuilada – conjugada com polietilenoglicol; PMMA – polimetilmetacrilato; PSA – antígeno específico da próstata; SDS – dodecil sulfato de sódio; TA-PEG – pentaeritritol tetra(aminopropil)polioxiétileno; TN-PEG – pentaeritritol tetra(succinimidooxiglutar)polioxiétileno; VEGF165 – fator de crescimento endotelial vascular 165; YOYO-1 – corante intercalante fluorescente para ADN.

2. Microambientes Aquosos para o Isolamento de Nanopartículas Biológicas

Dadas as suas funções centrais na comunicação intercelular e no transporte de material genético e proteico, as nanopartículas biológicas, como vesículas extracelulares e partículas semelhantes a vírus, constituem alvos promissores para o desenvolvimento de terapias inovadoras, vacinas e biomarcadores de diagnóstico [64]. No entanto, os métodos convencionais de separação, como a ultracentrifugação, a precipitação, a cromatografia de afinidade e a filtração por membranas, são morosos, dispendiosos ou frequentemente associados a baixos rendimentos e perdas de material biológico [65,66].

A conjugação de SAB com microfluídica tem melhorado o isolamento e a manipulação de nanopartículas em amostras biológicas (Tabela 1). No caso das vesículas extracelulares, sistemas microfluídicos baseados em PEG e DEX demonstraram elevada eficácia na recuperação a partir de pequenos volumes de plasma humano, com eficiência superior a 80% e remoção significativa de proteínas contaminantes (65,4%) (Figura 4) [27]. No caso das partículas semelhantes a vírus, entre diversos sistemas avaliados, destacou-se o SAB constituído por PEG e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ devido ao elevado coeficiente de partição ($K_d = 4,4$) que se manteve consistente após miniaturização em microdispositivos ($K_d = 3,9$) [28].

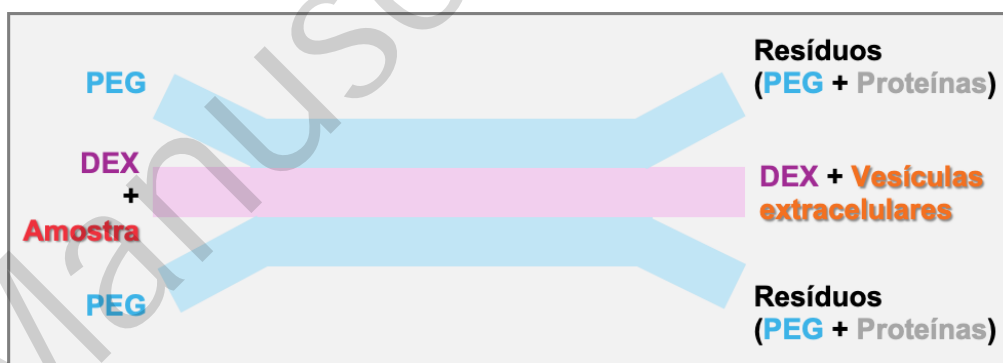


Figura 4 - Sistema microfluídico baseado em SAB para isolar vesículas extracelulares de plasma humano. Adaptado de dados apresentados na literatura [27].

Embora se encontre ainda numa fase exploratória, a aplicação de SAB microfluídicos na recuperação de vesículas extracelulares e partículas semelhantes a vírus permite um isolamento seletivo e escalável, essencial para aplicações em biosseparação e bioanálise. No entanto, subsistem desafios na otimização das condições de extração e na adaptação destes microsistemas a processos de alto rendimento, particularmente em contextos analíticos e clínicos.

3. Microambientes Aquosos para a Separação e Enriquecimento de Ácidos Nucleicos

Os ácidos nucleicos, nomeadamente o ácido desoxirribonucleico (ADN) e o ácido ribonucleico (ARN), são essenciais para o diagnóstico molecular, deteção de mutações e estudos de expressão génica [67]. Os métodos tradicionais de extração e purificação, com recurso a solventes químicos, precipitação alcoólica, colunas de sílica, eletroforese e cromatografia, envolvem múltiplas etapas manuais, uso de reagentes tóxicos, longos tempos de processamento e equipamentos complexos [68]. Estas limitações dificultam a automação e aplicação em dispositivos miniaturizados.

A integração de SAB com microfluídica, usando interfaces líquido-líquido sob campo elétrico e fases PEG/DEX, tem permitido controlar e visualizar a acumulação, transporte e separação de ADN (Tabela 1). Inicialmente, verificou-se que o ADN não atravessava livremente a interface, separando-se apenas sob a aplicação de campos elétricos intensos [29]. A separação dependeu fortemente do comprimento do ADN, com moléculas mais curtas a libertarem-se mais facilmente, atestando o papel da interface como filtro passivo por tamanho [30]. Transitando para um protótipo operativo, foi desenvolvido um dispositivo microfluídico para separação e concentração contínua de ADN, controlada por tamanho e campo elétrico (Figura 5) [31]. Recentemente, o fenómeno físico foi aprofundado, elucidando padrões de concentração resultantes de instabilidades moleculares [32].

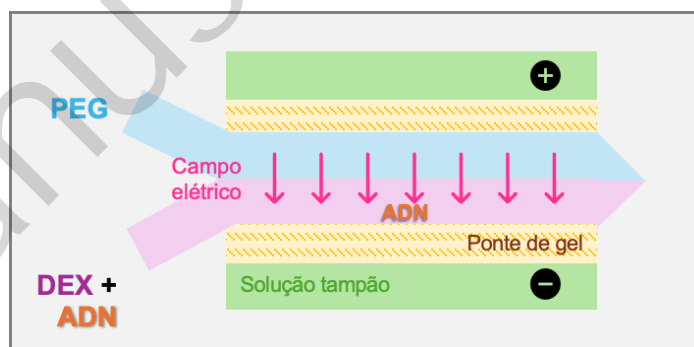


Figura 5 - Sistema microfluídico baseado em SAB, seguindo uma abordagem de interface líquido-líquido sob a aplicação de campo elétrico, para separar e enriquecer ácidos nucleicos por tamanho. Adaptado de dados apresentados na literatura [31].

Ainda que restritos, os avanços na aplicação de SAB e microfluídica para a manipulação de ADN sugerem novas abordagens de separação seletiva, com base no tamanho molecular e aplicação de campos elétricos, promissoras para o desenvolvimento de biossensores e dispositivos de diagnóstico. Requer ainda

investigação adicional para clarificar os efeitos da intensidade do campo elétrico no desempenho global do sistema, de modo a assegurar a sua adaptação a diferentes tipos de amostras e alvos, incluindo o ARN.

4. Purificação e Análise de Proteínas em Microescala

Sendo cruciais para a regulação e funcionamento dos sistemas biológicos, as proteínas desempenham um papel central em aplicações biotecnológicas e clínicas [69]. No entanto, a sua separação e análise recorrem, tradicionalmente, a técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese em gel e precipitação. Apesar da ampla utilização, estas apresentam tempos de processamento prolongados, elevado consumo de reagentes, e compatibilidade limitada com processos de miniaturização [70].

Explorando a versatilidade dos constituintes dos SAB e diversas arquiteturas dos dispositivos microfluídicos, têm sido desenvolvidas abordagens para uma manipulação eficaz de proteínas (Tabela 1). A albumina, pela sua abundância em amostras biológicas e relevância como modelo, tem sido a principal proteína alvo [33,40,41,46]. Dispositivos que utilizam interfaces líquido-líquido de PEG/DEX com aplicação de campo elétrico demonstraram eficiência na partição eletroforética [33]. A substituição do DEX por sais orgânicos e inorgânicos permitiu desenvolver dispositivos capilares coaxiais com múltiplas interfaces, otimizando parâmetros como fluxo e pH, alcançando extrações superiores a 70% em tempos reduzidos [40,41]. Alternativamente, os líquidos iónicos foram introduzidos como constituintes ajustáveis dos SAB, trazendo benefícios como menor viscosidade [46].

Para além da albumina, estes sistemas permitiram separar proteínas com variadas características físico-químicas, incluindo enzimas, fatores de crescimento, γ -globulinas, hormonas e proteínas recombinantes. A partição foi controlada para otimizar separações específicas e integradas com técnicas como a microscopia de fluorescência para medições rápidas e automatizadas [29,34,37]. Além disso, microssistemas à base de PEG e K_2HPO_4 aceleraram a extração e purificação de enzimas, como a α -amilase, atingindo equilíbrios em segundos e eficiência superior à macroescala [42].

Após validação com proteínas modelo, a robustez da tecnologia foi avaliada em amostras biológicas complexas, incluindo lisados e extratos celulares [36,44,45]. Ficou demonstrada a elevada seletividade, inclusive na recuperação eficiente de proteínas recombinantes e remoção de impurezas, como o ADN genómico (Figura 6A) [36].

Estratégias complementares com surfactantes melhoraram a purificação de proteínas de membrana e da proteína de algas R-ficoeritrina, encurtando os tempos de processamento [44,45]. No contexto da separação *in situ*, onde a separação da proteína é efetuada diretamente no seu meio de produção, técnicas baseadas em microgotículas reforçaram a importância das propriedades físico-químicas para purificação seletiva e possibilitaram a integração de múltiplas etapas (como cultura, lise, purificação e análise) num único dispositivo [38,39].

No campo da bioanálise, a combinação de SAB com microfluídica viabilizou a deteção de biomarcadores em amostras de sangue, como VEGF165 e PSA, com limites de deteção ultrabaixos e elevada remoção de interferentes [43,47]. No caso específico do PSA, a extração foi realizada fora do microdispositivo, o que comprometeu a integração e automação total do processo (Figura 6B) [47]. Abordagens mais recentes comprovaram ainda a viabilidade de monitorização enzimática *in situ* através de alterações visuais nas fases do SAB, sem necessidade de marcação (Figura 6C) [35].

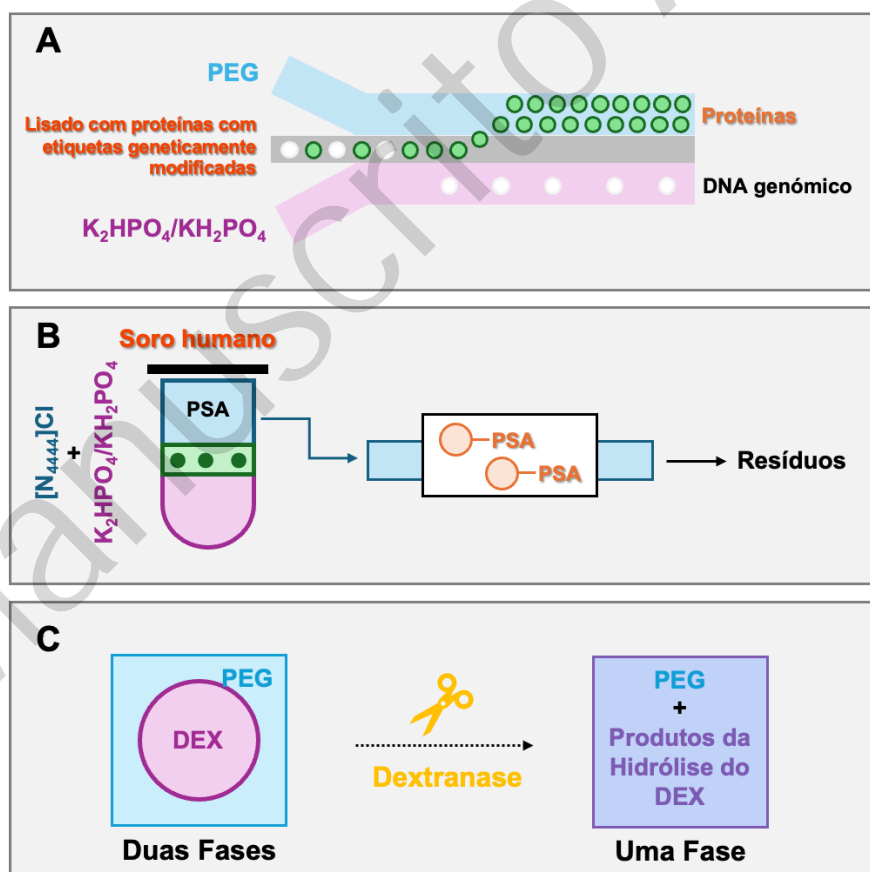


Figura 6 - Sistemas microfluídicos baseados em SAB para purificar proteínas de lisados celulares (A), detetar biomarcadores tumorais (B) e realizar análises *in situ* (C). Adaptado de dados apresentados na literatura [35,36,47].

Face ao exposto, a integração de SAB em dispositivos microfluídicos tem possibilitado não só a manipulação de uma ampla gama de proteínas, mas também o desenvolvimento de estratégias de separação e análise *in situ*. Estas capacidades tornam-na promissora para diagnóstico molecular e ensaios bioquímicos, embora ainda requeira otimização dos constituintes e da automação dos sistemas, bem como adaptação eficiente a amostras clínicas.

5. Microplataformas para o Controlo e Processamento de Biofármacos

Os biofármacos, como os anticorpos monoclonais, são fundamentais no tratamento de um vasto conjunto de doenças [71]. Contudo, o seu processamento requer elevados níveis de pureza, bem como um controlo rigoroso dos custos de produção [72]. Ultimamente, têm sido consideradas abordagens que integram SAB e microfluídica, permitindo um controlo mais preciso dos processos e melhorias na eficiência de purificação (Tabela 1).

A imunoglobulina G (IgG) tem sido adotada como biofármaco modelo, sendo eficientemente extraída em dispositivos miniaturizados baseados em SAB de PEG e K_2HPO_4/KH_2PO_4 , operando em modo contínuo e aplicáveis a culturas celulares (Figura 7) [37,48,49]. Estes sistemas possibilitaram ainda a seleção rápida de condições de extração (até oito em paralelo), com variação dos pesos moleculares de PEG e dos ligandos de afinidade, integrando ainda uma etapa de isolamento com colina para reforçar a robustez em matrizes complexas, como soro fetal bovino [50].

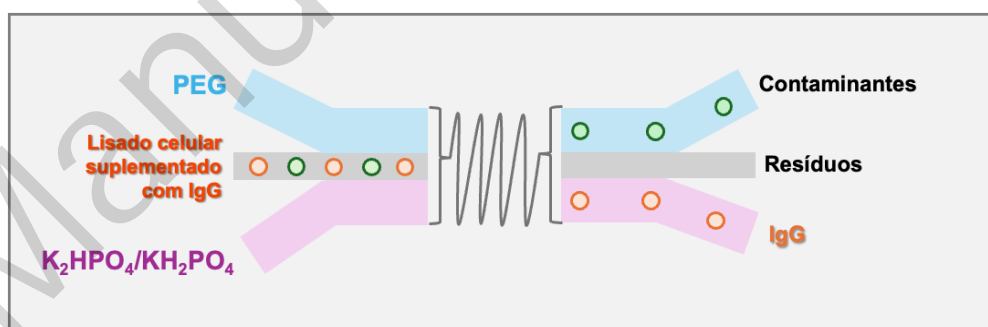


Figura 7 - Sistema microfluídico baseado em SAB para extrair IgG de lisados celulares. Adaptado de dados apresentados na literatura [49].

De forma geral, a integração de sistemas aquosos bifásicos com microfluídica facilita a triagem de condições de extração e permite a miniaturização das etapas de fabrico de IgG. Apesar da evidência de preservação dos rendimentos em macroescala, continuam a existir constrangimentos quanto à aplicabilidade a outros biofármacos.

6. Separação e Fracionamento Celular em Microescala

A separação celular constitui uma etapa fundamental nos domínios biotecnológico e clínico, com aplicações que englobam a caracterização e o isolamento de subpopulações celulares, bem como a deteção de células raras em biópsias líquidas [73]. Embora bem estabelecidas, as técnicas convencionais como a centrifugação em gradientes de densidade, citometria de fluxo e separação magnética apresentam complexidade dos protocolos, elevado consumo de amostras e reagentes, e miniaturização limitada [74].

A integração de SAB com microfluídica tem possibilitado a separação celular com base em propriedades físico-químicas e afinidades de partição (Tabela 1). Sistemas poliméricos separam eficazmente leucócitos e eritrócitos segundo a afinidade por DEX ou PEG (Figura 8) ou recorrendo a interfaces dinâmicas criadas por fluxo laminar e força centrífuga [51,53]. Esta abordagem permitiu ainda automatizar etapas de fracionamento e recolha, preservando a integridade celular e mantendo um desempenho comparável aos métodos manuais [52]. Complementarmente, SAB salinos permitiram concentrar eritrócitos, mas revelaram instabilidade, agregação celular e baixa compatibilidade com microambientes miniaturizados [54].

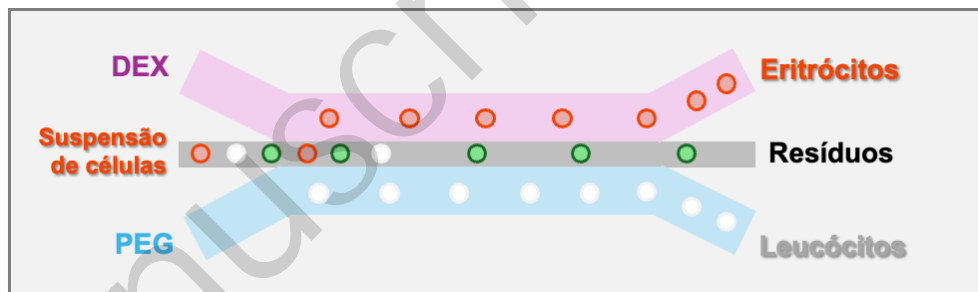


Figura 8 - Sistema microfluídico baseado em SAB para fracionar seletivamente células sanguíneas. Adaptado de dados apresentados na literatura [51].

Embora a sua consolidação tecnológica ainda não esteja atingida, os SAB microfluídicos destacam-se pela sua eficácia na separação e análise de células, com especial relevância para o uso de polímeros, devido à sua biocompatibilidade e capacidade de controlo espacial. Carece, no entanto, de avanços para integração em dispositivos miniaturizados para uso clínico e *point-of-care*.

7. Encapsulação e Biofabricação em Microssistemas Aquosos

O desenvolvimento de sistemas biocompatíveis em meio inteiramente aquoso tem impulsionado progressos na encapsulação e entrega de fármacos, bem como em processos de biofabricação [75-77]. As técnicas convencionais de encapsulação e entrega de fármacos apresentam limitações de controlo do tamanho e morfologia, instabilidade e libertação descontrolada [78,79], enquanto a biofabricação clássica enfrenta desafios relacionados com a complexidade dos processos e a viabilidade funcional [80]. Neste contexto, a conjugação de SAB com dispositivos microfluídicos tem permitido o desenvolvimento de processos de encapsulação uniforme, libertação controlada e biofabricação de estruturas biológicas complexas, assegurando controlo físico-químico e manutenção da funcionalidade (Tabela 1).

No desenvolvimento de novas estratégias de encapsulação, conseguiu-se o controlo preciso da formação de microgotículas em SAB baseados em PEG e DEX, utilizando microcanais arredondados multinível que facilitaram a fabricação e uniformizaram as gotículas (Figura 9A) [55]. Microcanais com largura variável eliminaram a necessidade de bombas externas, simplificando e tornando os dispositivos portáteis, com utilização comprovada na encapsulação de micropartículas e eritrócitos de rato [56]. Gotículas monodispersas de DEX e tetra-PEG separaram-se espontaneamente em fases, formando microcápsulas uniformes com núcleo aquoso e casca reticulada (Figura 9B) [60]. Além disso, a modulação da arquitetura interna permitiu criar microambientes dinâmicos e heterogéneos, com potencial aplicação na encapsulação celular (Figura 9C) [57].

No campo da encapsulação celular, sistemas PEG/MgSO₄ demonstraram maior eficiência na geração de microgotículas estáveis e biocompatíveis do que os sistemas PEG/DEX [62], embora menos eficazes na separação celular [54]. Outras abordagens envolveram a criação de microcápsulas com estrutura núcleo-cápsula na presença de alginato de sódio (Figura 9D) e o controlo do posicionamento espacial de células em microcanais [58,63]. Estes sistemas permitiram manter a funcionalidade celular em suportes 3D, criar padrões e co-culturas sem adesivos sintéticos, bem como realizar tratamentos localizados com tripsina [58,63]. Adicionalmente, possibilitaram a estimulação subcelular localizada, entregando compostos a regiões intracelulares específicas para terapias direcionadas e investigação avançada [59].

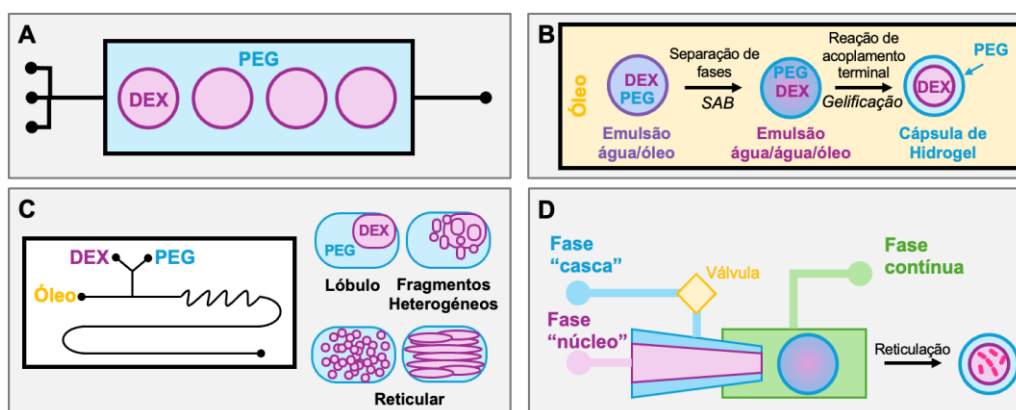


Figura 9 - Estratégias microfluídicas baseadas em SAB para gerar microgotículas (A), microcápsulas (B), microambientes heterogêneos (C) e encapsular células (D). Adaptado de dados apresentados na literatura [55,57,60,63].

Um exemplo de aplicação em biofabricação encontra-se em sistemas PEG/DEX, que possibilitaram a impressão de biomateriais com alta resolução e viabilidade celular preservada [61]. Ao promoverem a auto-organização celular em estruturas 3D sem suportes sólidos, estes sistemas assinalam um marco promissor para a medicina regenerativa.

Mesmo sendo uma tecnologia emergente, a integração de SAB e dispositivos microfluídicos permite redefinir estratégias de encapsulação, libertação controlada e biofabricação, proporcionando condições biocompatíveis. Persistem, porém, desafios relacionados com o *design* microfluídico complexo e a caracterização das interações entre fases aquosas e os alvos biológicos.

8. Conclusões e Direções Futuras

Este artigo de revisão explora as perspectivas da integração de SAB com dispositivos microfluídicos para manipulação de alvos biológicos, possibilitando a criação de microambientes aquosos que respondem às limitações dos métodos clássicos. Esta união tecnológica, ao aliar eficiência e miniaturização, constitui um avanço relevante em biosseparação, bioanálise, desenvolvimento e entrega de biofármacos, bem como em processos de biofabricação.

A Tabela 2 sintetiza as vantagens complementares dos SAB e dos dispositivos microfluídicos, destacando como estas tecnologias se potencializam mutuamente em aplicações com alvos biológicos. Os SAB proporcionam alta seletividade, biocompatibilidade e preservação da integridade em matrizes complexas, enquanto a microfluídica assegura controlo rigoroso de fluidos, menor consumo de reagentes e monitorização em tempo real. Ao otimizar a partição, concentração e encapsulação de

biomoléculas e células, bem como a fabricação de sistemas biocompatíveis, esta combinação revela-se crucial para a implementação eficiente de aplicações biológicas em contextos reais.

Tabela 2 - Comparação das características e desempenho dos SAB, dispositivos microfluídicos e da sua integração para o desenvolvimento de microambientes aquosos aplicáveis a alvos biológicos. Os símbolos indicam a vantagem relativa de cada tecnologia em cada critério: ✓ vantajoso, ■ moderado/variável e ✗ limitado.

Critério	SAB	Microfluídica	Integração SAB + Microfluídica
Eficiência de separação	Alta seletividade, modulável via composição e condições operacionais; adequado para purificação de biomoléculas. ✓	Manipula microvolumes com elevada precisão; pode necessitar de módulos adicionais para melhorar a eficiência de separação. ■	Combina a seletividade do SAB com a precisão microfluídica para separações e análises rápidas, encapsulação direcionada e biofabricação eficiente. ✓
Volume de amostra e reagentes	Eficaz para volumes médios a grandes; eficiência reduzida em microvolumes devido a limitações de escalabilidade. ■	Excelente para processamento e análise de amostras escassas, com consumo mínimo de reagentes. ✓	Minimiza volumes e reagentes, mantendo desempenho analítico em escala micro; viabiliza encapsulação e biofabricação eficientes em pequenas escalas. ✓
Velocidade do processo	Pode requerer tempos de equilíbrio relativamente longos para partição e separação completas. ✗	Permite processos rápidos, aptos para monitorização em tempo real. ✓	Integra extração, separação, encapsulação e/ou deteção em fluxo contínuo ou <i>in situ</i> , acelerando o tempo total do processo. ✓
Sustentabilidade ambiental	Baseado em solventes aquosos, com alinhamento a princípios da Química Verde condicionado a constituintes seguros e biodegradáveis. ■	Reduz significativamente o consumo de reagentes e geração de resíduos por miniaturização. ✓	Plataforma integrada de baixo impacto ambiental, promovendo análises, encapsulação e biofabricação com dependência reduzida de recursos. ✓
Automatização e integração	Geralmente manual; requer integração externa para automação. ✗	Grau variável de automação, dependendo do design e elementos funcionais incorporados. ■	Suporta automação completa, integrando etapas de preparação, separação, encapsulação e/ou deteção em sistemas compactos. ✓
Custo e portabilidade	Custo relativamente baixo, porém, com maior necessidade de mão-de-obra e tempo operacional. ■	Investimento inicial elevado em microdispositivos; custo operacional reduzido a longo prazo. ■	Solução económica e portátil, ideal para dispositivos <i>point-of-care</i> e análises <i>in situ</i> . ✓

Apesar das vantagens promissoras, a integração de SAB em dispositivos microfluídicos permanece limitada, com diversidade reduzida nas combinações de componentes e arquiteturas disponíveis. A sua operacionalização enfrenta barreiras técnicas, incluindo a manipulação de fases líquidas micrométricas, o controlo rigoroso de parâmetros para garantir a estabilidade bifásica, a extração seletiva de espécies de

matrizes reais e a compatibilidade material-solvente. É ainda necessária a integração contínua com sensores, atuadores e sistemas de automação para monitorização em tempo real e translação tecnológica. Torna-se, assim, crucial adotar uma estratégia assente em quatro vertentes tecnológicas interdependentes para viabilizar estes microambientes aquosos em aplicações biológicas:

- **Vertente Físico-Química:** Seleção cuidadosa dos constituintes do SAB e ajuste de parâmetros como pH, temperatura e força iónica para garantir estabilidade das fases, elevada eficiência de separação e compatibilidade com os materiais do microdispositivo.
- **Vertente Microestrutural:** *Design* geométrico dos canais e controlo rigoroso dos fluxos para manter interfaces estáveis, evitar misturas indesejadas e otimizar a eficiência dos processos.
- **Vertente Funcional-Analítica:** Integração de sensores avançados e sistemas automatizados para monitorização e controlo em tempo real, garantindo deteção rápida e precisa, reduzindo erros e permitindo acompanhamento dinâmico da libertação ou funcionalidade das biomoléculas extraídas ou encapsuladas, bem como dos sistemas biofabricados.
- **Vertente Translacional:** Validação da reprodutibilidade e escalabilidade dos dispositivos, preservando a integridade, estabilidade e funcionalidade dos alvos biológicos. O *design* adaptável e robusto permite transitar da prova de conceito para uso laboratorial, clínico, industrial ou *point-of-care*.

Os desenvolvimentos previstos para a integração de SAB e microfluídica apontam para a criação de soluções mais orientadas para desafios concretos de separação, bioanálise e desenvolvimento de sistemas biocompatíveis, com ênfase em abordagens aplicáveis *in situ*. A miniaturização, automação e uso de novos componentes de SAB e materiais de fabrico reforçam a sua versatilidade e sustentabilidade, favorecendo a evolução para aplicações práticas. Esta combinação pode impulsionar o desenvolvimento de novas soluções em biotecnologia, medicina personalizada e diagnóstico clínico, promovendo o acesso equitativo a tecnologias analíticas e terapêuticas, mesmo em contextos com recursos limitados.

Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito dos projetos CICECO – Aveiro Institute of Materials, UIDB/50011/2020 (DOI. [10.54499/UIDB/50011/2020](https://doi.org/10.54499/UIDB/50011/2020)), UIDP/50011/2020

(DOI: [10.54499/UIDP/50011/2020](https://doi.org/10.54499/UIDP/50011/2020)) & LA/P/0006/2020 (DOI: [10.54499/LA/P/0006/2020](https://doi.org/10.54499/LA/P/0006/2020)), e INESC MN, UIDB/0536/2020 (DOI: [10.54499/UIDB/05367/2020](https://doi.org/10.54499/UIDB/05367/2020)) & UIDP/0536/2020 (DOI: [10.54499/UIDP/05367/2020](https://doi.org/10.54499/UIDP/05367/2020)), financiados por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC). Este trabalho foi financiado por fundos nacionais (OE), através da FCT/MCTES, no âmbito do projeto ILSurvive, PTDC/EMD-TLM/3253/2020 (DOI: [10.54499/PTDC/EMD-TLM/3253/2020](https://doi.org/10.54499/PTDC/EMD-TLM/3253/2020)). Maria S. M. Mendes agradece à FCT pela bolsa de doutoramento 2022.11229.BD (DOI: [10.54499/2022.11229.BD](https://doi.org/10.54499/2022.11229.BD)). Francisca A. e Silva agradece à FCT pelo contrato de investigador CEECIND/03076/2018/CP1559/CT0024 (DOI: [10.54499/CEECIND/03076/2018/CP1559/CT0024](https://doi.org/10.54499/CEECIND/03076/2018/CP1559/CT0024)) ao abrigo do Estímulo ao Emprego Científico.

Referências

- [1] M. W. Beijerinck, *Parasiten Und Infektionskrankheiten* **1896**, 2, 679–699.
- [2] P.-Å. Albertsson, *Nature* **1958**, 182, 709–711. DOI: [10.1038/182709a0](https://doi.org/10.1038/182709a0).
- [3] A. G. Teixeira, R. Agarwal, K. R. Ko, J. Grant-Burt, B. M. Leung, J. P. Frampton, *Adv. Healthcare Mater.* **2018**, 7, 1701036. DOI: [10.1002/adhm.201701036](https://doi.org/10.1002/adhm.201701036).
- [4] A. Segaran, L. S. Chua, *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, 276, 133856. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2024.133856](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133856).
- [5] G. Tubio, B. Nerli, G. Pico, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **2004**, 799, 293–301. DOI: [10.1016/j.jchromb.2003.10.060](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.10.060).
- [6] M. Perumalsamy, M. I. Batcha, *Process Biochem.* **2011**, 46, 494–497. DOI: [10.1016/j.procbio.2010.09.023](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.023).
- [7] C. L. Liu, D. T. Kamei, J. A. King, D. I. C. Wang, D. Blankschtein, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1998**, 711, 127–138. DOI: [10.1016/S0378-4347\(98\)00013-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00013-9).
- [8] S. Y. Lee, I. Khoiroh, C. W. Ooi, T. C. Ling, P. L. Show, *Sep. Purif. Rev.* **2017**, 46, 291–304. DOI: [10.1080/15422119.2017.1279628](https://doi.org/10.1080/15422119.2017.1279628).
- [9] E. A. Oke, S. P. Ijardar, *Biochem. Eng. J.* **2021**, 176, 108211. DOI: [10.1016/j.bej.2021.108211](https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108211).
- [10] R. Sadeghi, J. A. P. Coutinho, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2024**, 12, 15838–15874. DOI: [10.1021/acssuschemeng.4c05745](https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.4c05745).
- [11] R. Sadeghi, B. Hamidi, N. Ebrahimi, *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118, 10285–10296. DOI: [10.1021/jp505383r](https://doi.org/10.1021/jp505383r).
- [12] A. Chakraborty, K. Sen, *J. Chromatogr. A* **2016**, 1433, 41–55. DOI: [10.1016/j.chroma.2016.01.016](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.016).
- [13] J. C. Merchuk, B. A. Andrews, J. A. Asenjo, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1998**, 711, 285–293. DOI: [10.1016/S0378-4347\(97\)00594-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00594-X).

- [14] H. Passos, A. C. A. Sousa, M. R. Pastorinho, A. J. A. Nogueira, L. P. N. Rebelo, J. A. P. Coutinho, M. G. Freire, *Anal. Methods* **2012**, *4*, 2664. DOI: [10.1039/c2ay25536g](https://doi.org/10.1039/c2ay25536g).
- [15] A. Ebrahimi, G. Pazuki, M. Mozaffarian, F. G. Ahsaie, H. Abedini, *Sci. Rep.* **2025**, *15*, 16014. DOI: [10.1038/s41598-025-01195-9](https://doi.org/10.1038/s41598-025-01195-9).
- [16] A. Dimitrijević, S. Marić, A. Jocić, D. Tekić, J. Mušović, J. S. Amaral, *Foods* **2024**, *13*, 954. DOI: [10.3390/foods13060954](https://doi.org/10.3390/foods13060954).
- [17] G. M. Whitesides, *Nature* **2006**, *442*, 368–373. DOI: [10.1038/nature05058](https://doi.org/10.1038/nature05058).
- [18] J. Novotný, F. Foret, *J. Sep. Sci.* **2017**, *40*, 383–394. DOI: [10.1002/jssc.201600905](https://doi.org/10.1002/jssc.201600905).
- [19] T. A. Duncombe, A. M. Tentori, A. E. Herr, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 554–567. DOI: [10.1038/nrm4041](https://doi.org/10.1038/nrm4041).
- [20] N. Wongkaew, M. Simsek, C. Griesche, A. J. Baeumner, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 120–194. DOI: [10.1021/acs.chemrev.8b00172](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00172).
- [21] A.-G. Niculescu, C. Chircov, A. C. Bîrcă, A. M. Grumezescu, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2011. DOI: [10.3390/ijms22042011](https://doi.org/10.3390/ijms22042011).
- [22] X. Chen, *Microchem. J.* **2016**, *127*, 52–61. DOI: [10.1016/j.microc.2016.02.005](https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.02.005).
- [23] V. Carvalho, R. O. Rodrigues, R. A. Lima, S. Teixeira, *Micromachines* **2021**, *12*, 1149. DOI: [10.3390/mi12101149](https://doi.org/10.3390/mi12101149).
- [24] R. Garmasukis, C. Hackl, A. Charvat, S. G. Mayr, B. Abel, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2023**, *81*, 102948. DOI: [10.1016/j.copbio.2023.102948](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2023.102948).
- [25] S. Hardt, T. Hahn, *Lab Chip* **2012**, *12*, 434–442. DOI: [10.1039/C1LC20569B](https://doi.org/10.1039/C1LC20569B).
- [26] T. Ahmed, C. Yamanishi, T. Kojima, S. Takayama, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2021**, *14*, 231–255. DOI: [10.1146/annurev-anchem-091520-101759](https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-091520-101759).
- [27] B. H. Han, S. Kim, G. Seo, Y. Heo, S. Chung, J. Y. Kang, *Lab Chip* **2020**, *20*, 3552–3559. DOI: [10.1039/D0LC00345J](https://doi.org/10.1039/D0LC00345J).
- [28] M. J. Jacinto, R. R. G. Soares, A. M. Azevedo, V. Chu, A. Tover, J. P. Conde, M. R. Aires-Barros, *Sep. Purif. Technol.* **2015**, *154*, 27–35. DOI: [10.1016/j.seppur.2015.09.006](https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.09.006).
- [29] T. Hahn, G. Münchow, S. Hardt, *J. Phys. Condens. Matter* **2011**, *23*, 184107. DOI: [10.1088/0953-8984/23/18/184107](https://doi.org/10.1088/0953-8984/23/18/184107).
- [30] T. Hahn, S. Hardt, *Soft Matter* **2011**, *7*, 6320–6326. DOI: [10.1039/c1sm05309d](https://doi.org/10.1039/c1sm05309d).
- [31] T. Hahn, S. Hardt, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 5476–5479. DOI: [10.1021/ac201228v](https://doi.org/10.1021/ac201228v).
- [32] S. Hardt, J. Hartmann, S. Zhao, A. Bandopadhyay, *Phys. Rev. Lett.* **2020**, *124*, 064501. DOI: [10.1103/PhysRevLett.124.064501](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.124.064501).
- [33] G. Münchow, S. Hardt, J. P. Kutter, K. S. Drese, *Lab Chip* **2007**, *7*, 98–102. DOI: [10.1039/b612669n](https://doi.org/10.1039/b612669n).
- [34] F. Gebhard, J. Hartmann, S. Hardt, *Soft Matter* **2021**, *17*, 3929–3936. DOI: [10.1039/D0SM01921F](https://doi.org/10.1039/D0SM01921F).
- [35] D. Lai, J. P. Frampton, M. Tsuei, A. Kao, S. Takayama, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 4052–4057. DOI: [10.1021/ac500657k](https://doi.org/10.1021/ac500657k).

- [36] R. J. Meagher, Y. K. Light, A. K. Singh, *Lab Chip* **2008**, *8*, 527–532. DOI: [10.1039/b716462a](https://doi.org/10.1039/b716462a).
- [37] D. F. C. Silva, A. M. Azevedo, P. Fernandes, V. Chu, J. P. Conde, M. R. Aires-Barros, *J. Chromatogr. A* **2017**, *1487*, 242–247. DOI: [10.1016/j.chroma.2016.12.036](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.036).
- [38] D. H. Cid, R. C. Gallo-Villanueva, J. González-Valdez, V. H. P. González, M. A. Mata-Gómez, *Research Square Preprint* **2021**. DOI: [10.21203/rs.3.rs-967209/v1](https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-967209/v1).
- [39] F. Moreno-Sibaja, D. Hernández-Cid, J. Ceballos-Medina, D. A. Cerón-Torres, J. A. Reyes-Avendaño, R. C. Gallo-Villanueva, V. H. Pérez-Gonzalez, M. A. Mata-Gómez, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2025**. DOI: [10.1002/jctb.7816](https://doi.org/10.1002/jctb.7816).
- [40] Y. Huang, T. Meng, T. Guo, W. Li, W. Yan, X. Li, S. Wang, Z. Tong, *Microfluid. Nanofluid.* **2014**, *16*, 483–491. DOI: [10.1007/s10404-013-1245-2](https://doi.org/10.1007/s10404-013-1245-2).
- [41] F. Raji, A. Rahbar-Kelishami, *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **2021**, *163*, 108370. DOI: [10.1016/j.cep.2021.108370](https://doi.org/10.1016/j.cep.2021.108370).
- [42] U. Novak, M. Lakner, I. Plazl, P. Žnidaršič-Plazl, *Microfluid. Nanofluid.* **2015**, *19*, 75–83. DOI: [10.1007/s10404-015-1550-z](https://doi.org/10.1007/s10404-015-1550-z).
- [43] X. He, J. Xu, X. Wang, C. Ge, S. Li, L. Wang, Y. Xu, *Lab Chip* **2023**, *23*, 2469–2476. DOI: [10.1039/d3lc00225j](https://doi.org/10.1039/d3lc00225j).
- [44] R. Hu, X. Feng, P. Chen, M. Fu, H. Chen, L. Guo, B. F. Liu, *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 171–177. DOI: [10.1016/j.chroma.2010.10.090](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.090).
- [45] M. Seručnik, F. A. Vicente, Ž. Brečko, J. A. P. Coutinho, S. P. M. Ventura, P. Žnidaršič-Plazl, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8*, 17097–17105. DOI: [10.1021/acssuschemeng.0c05042](https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c05042).
- [46] U. Novak, A. Pohar, I. Plazl, P. Žnidaršič-Plazl, *Sep. Purif. Technol.* **2012**, *97*, 172–178. DOI: [10.1016/j.seppur.2012.01.033](https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.01.033).
- [47] F. C. Flora, S. B. Relvas, F. A. e Silva, M. G. Freire, V. Chu, J. P. Conde, *Biosensors* **2023**, *13*, 334. DOI: [10.3390/bios13030334](https://doi.org/10.3390/bios13030334).
- [48] D. F. C. Silva, A. M. Azevedo, P. Fernandes, V. Chu, J. P. Conde, M. R. Aires-Barros, *J. Chromatogr. A* **2012**, *1249*, 1–7. DOI: [10.1016/j.chroma.2012.05.089](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.089).
- [49] E. Espitia-Saloma, P. Vázquez-Villegas, M. Rito-Palomares, O. Aguilar, *Biotechnol. J.* **2016**, *11*, 708–716. DOI: [10.1002/biot.201400565](https://doi.org/10.1002/biot.201400565).
- [50] E. J. S. Brás, R. R. G. Soares, A. M. Azevedo, P. Fernandes, M. Arévalo-Rodríguez, V. Chu, J. P. Conde, M. R. Aires-Barros, *J. Chromatogr. A* **2017**, *1515*, 252–259. DOI: [10.1016/j.chroma.2017.07.094](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.094).
- [51] M. Tsukamoto, S. Taira, S. Yamamura, Y. Morita, N. Nagatani, Y. Takamura, E. Tamiya, *Analyst* **2009**, *134*, 1994–1998. DOI: [10.1039/b909597g](https://doi.org/10.1039/b909597g).
- [52] B.-U. Moon, L. Clime, D. Brassard, A. Boutin, J. Daoud, K. Morton, T. Veres, *Lab Chip* **2021**, 4060–4070. DOI: [10.1039/D1LC00680K](https://doi.org/10.1039/D1LC00680K).

- [53] J. R. SooHoo, G. M. Walker, *Biomed. Microdevices* **2009**, *11*, 323–329. DOI: [10.1007/s10544-008-9238-8](https://doi.org/10.1007/s10544-008-9238-8).
- [54] K. Nishimura, C. Matsushita, K. Yamashita, M. Murata, K. Tsukagoshi, *Anal. Sci.* **2023**, *39*, 537–546. DOI: [10.1007/s44211-022-00259-4](https://doi.org/10.1007/s44211-022-00259-4).
- [55] D. Lai, J. P. Frampton, H. Sriram, S. Takayama, *Lab Chip* **2011**, *11*, 3551–3554. DOI: [10.1039/c1lc20560a](https://doi.org/10.1039/c1lc20560a).
- [56] D. Choi, E. Lee, S.-J. Kim, M. Han, *Soft Matter* **2019**, *15*, 4647–4655. DOI: [10.1039/C9SM00469F](https://doi.org/10.1039/C9SM00469F).
- [57] S. H. S. Lee, P. Wang, S. K. Yap, T. A. Hatton, S.A. Khan, *Biomicrofluidics* **2012**, *6*, 022005. DOI: [10.1063/1.3694841](https://doi.org/10.1063/1.3694841).
- [58] J. P. Frampton, D. Lai, H. Sriram, S. Takayama, *Biomed. Microdevices* **2011**, *13*, 1043–1051. DOI: [10.1007/s10544-011-9574-y](https://doi.org/10.1007/s10544-011-9574-y).
- [59] Q. Zhang, T. Xie, X. Yi, G. Xing, S. Feng, S. Chen, Y. Li, J.-M. Lin, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2023**, *15*, 45640–45650. DOI: [10.1021/acsami.3c09665](https://doi.org/10.1021/acsami.3c09665).
- [60] T. Watanabe, I. Motohiro, T. Ono, *Langmuir* **2019**, *35*, 2358–2367. DOI: [10.1021/acs.langmuir.8b04169](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b04169).
- [61] H. Tavana, S. Takayama, *Biomicrofluidics* **2011**, *5*, 013404. DOI [10.1063/1.3516658](https://doi.org/10.1063/1.3516658).
- [62] M. Mastiani, N. Firoozi, N. Petrozzi, S. Seo, M. Kim, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 15561. DOI: [10.1038/s41598-019-51958-4](https://doi.org/10.1038/s41598-019-51958-4).
- [63] K. Zhu, Y. Yu, Y. Cheng, C. Tian, G. Zhao, Y. Zhao, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 4826–4832. DOI: [10.1021/acsami.8b19234](https://doi.org/10.1021/acsami.8b19234).
- [64] D. K. Jeppesen, Q. Zhang, J. L. Franklin, R. J. Coffey, *Trends Cell Biol.* **2023**, *33*, 667–681. DOI: [10.1016/j.tcb.2023.01.002](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.01.002).
- [65] M. Y. Konoshenko, E. A. Lekchnov, A. V. Vlassov, P. P. Laktionov, *Biomed. Res. Int.* **2018**, *2018*, 8545347. DOI: [10.1155/2018/8545347](https://doi.org/10.1155/2018/8545347).
- [66] N. Kushnir, S. J. Streatfield, V. Yusibov, *Vaccine* **2012**, *31*, 58–83. DOI: [10.1016/j.vaccine.2012.10.083](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.083).
- [67] M. Moccia, B. Pascucci, M. Saviano, M. T. Cerasa, M. A. Terzidis, C. Chatgialloglu, A. Masi, *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *25*, 146. DOI: [10.3390/ijms25010146](https://doi.org/10.3390/ijms25010146).
- [68] S. C. Tan, B. C. Yiap, *Biomed. Res. Int.* **2009**, *2009*, 574398. DOI: [10.1155/2009/574398](https://doi.org/10.1155/2009/574398).
- [69] R. Montoya, P. Deckerman, M. O. Guler, *BBA Adv.* **2025**, *7*, 100149. DOI: [10.1016/j.bbadv.2025.100149](https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2025.100149).
- [70] S. Liu, Z. Li, B. Yu, S. Wang, Y. Shen, H. Cong, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2020**, *284*, 102254. DOI: [10.1016/j.cis.2020.102254](https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102254).
- [71] K. Rajewsky, *Nature* **2019**, *575*, 47–49. DOI: [10.1038/d41586-019-02840-w](https://doi.org/10.1038/d41586-019-02840-w).
- [72] U. Gottschalk, *Biotechnol. Prog.* **2008**, *24*, 496–503. DOI: [10.1021/bp070452g](https://doi.org/10.1021/bp070452g).
- [73] M. C. Miller, P. S. Robinson, C. Wagner, D. J. O'Shannessy, *Cytometry Part A* **2018**, *93*, 1234–1239. DOI: [10.1002/cyto.a.23571](https://doi.org/10.1002/cyto.a.23571).

- [74] N. Rahmanian, M. Bozorgmehr, M. Torabi, A. Akbari, A.-H. Zarnani, *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2017**, *47*, 38–51. DOI: [10.1080/10826068.2016.1163579](https://doi.org/10.1080/10826068.2016.1163579).
- [75] Q. Ma, Y. Song, W. Sun, J. Cao, H. Yuan, X. Wang, Y. Sun, H.C. Shum, *Adv. Sci.* **2020**, *7*, 1903359. DOI: [10.1002/advs.201903359](https://doi.org/10.1002/advs.201903359).
- [76] Y. Chao, H. C. Shum, *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 114–142. DOI: [10.1039/C9CS00466A](https://doi.org/10.1039/C9CS00466A).
- [77] S. Daradmare, C.-S. Lee, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2022**, *219*, 112795. DOI [10.1016/j.colsurfb.2022.112795](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112795).
- [78] S. Misra, S. K. Mitra, *Adv. Mater. Interfaces* **2025**, *12*, 2400402. DOI [10.1002/admi.202400402](https://doi.org/10.1002/admi.202400402).
- [79] T. C. Ezike, U. S. Okpala, U. L. Onoja, C. P. Nwike, E. C. Ezeako, O. J. Okpara, C. C. Okoroafor, S. C. Eze, O. L. Kalu, E. C. Odoh, U. G. Nwadike, J. O. Ogbodo, B. U. Umeh, E. C. Ossai, B. C. Nwanguma, *Heliyon* **2023**, *9*, e17488. DOI [10.1016/j.heliyon.2023.e17488](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17488).
- [80] J. Saroia, W. Yanen, Q. Wei, K. Zhang, T. Lu, B. Zhang, *Biodes. Manuf.* **2018**, *1*, 265–279. DOI [10.1007/s42242-018-0029-7](https://doi.org/10.1007/s42242-018-0029-7).