

DENUMIREA PROIECTULUI: eBio-hub: Centrul de Cercetare în Inginerie Biomedicala

CONTRACTOR: Universitatea Națională de Știință și Tehnologie Politehnica București

PROGRAMUL: Cooperare Europeană și Internațională

SUBPROGRAMUL: Premiere Orizont Europa – Instituții

COD PROIECT: PN-IV-P8-8.1-PRE-HE-ORG-2023-0054

CONTRACT DE FINANȚARE: 17PHE/2023

Etapa 2: Dezvoltarea unor platforme tehnologice pentru bioinginerie -1

Etapa 2, conform planului de realizare include următoarele activități:

- **Activitate 2.1.** Dezvoltarea unor tehnologii de fabricație pentru cipuri microfluidice pentru auto-asamblarea nanoparticulelor
- **Activitate 2.2.** Testarea funcționalității cipurilor microfluidice
- **Activitate 2.3.** Dezvoltarea unor tehnologii de fabricare a plasturilor personalizați cu microace folosind matrițe generate prin printare 3D
- **Activitate 2.4.** Dezvoltarea unui protocol pentru fabricare in câmp acustic (SAW) a modelului de piele folosind fibroblast

Rezultate livrate – etapa 2/2024:

- Protocol pentru fabricarea cipurilor microfluidice
- Protocol pentru fabricarea dispozitivelor SAW
- Protocol pentru fabricare a plasturilor personalizați cu microace folosind matrițe
- Protocol de fabricare in câmp acustic a unui model de piele folosind fibroblaste
- Actualizare pagina web proiect: <https://ebio-hub.upb.ro/premiere-he/>
- Întocmire raport științific pentru Etapa 2/2024

Diseminare rezultate

Lucrări științifice prezentate la conferințe internaționale:

1. 23rd Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 23), 4-7 september 2024, Mamaia, Romania "Microfluidic platforms for drug discovery", Ciprian Iliescu – keynote presentation
2. 23rd Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 23), 4-7 september 2024, Mamaia, Romania "Revolutionizing type 2 diabetes detection and management through liquid biopsy technology", Gratiela Gradisteanu Pircalabioru – keynote presentation
3. 23rd Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 23), 4-7 september 2024, Mamaia, Romania "Hybrid fibrous architectures-

- mediated gene transfer by pDNA nanoparticles into macrophages*", Jana Ghitman – keynote presentation
4. 23rd Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (**RICCCE 23**), 4-7 september 2024, Mamaia, Romania, *"Simple method for biocompatible microneedles fabrication"*, Florina S. Iliescu – keynote presentation
 5. 23rd Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (**RICCCE 23**), 4-7 september 2024, Mamaia, Romania, *"On-chip device with interdigitated electrodes for electrical bacterial lysis"* Laura-Elena Andrei
 6. 23rd Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (**RICCCE 23**), 4-7 september 2024, Mamaia, Romania, *"PEI/DNA polyplexes: complexation, characterization, and in vitro biological investigation"*, Feth Eddine Boukhemacha
 7. National Scientific Autumn Conference 2024 – Academy of Romania Scientists - Iasi, Romania, 23-24 September 2024, *" Bioengineering: from microfluidics to artificial intelligence" Autumn Meeting of the Academy of Romanian Scientists*, Ciprian Iliescu – plenary presentation
 8. National Scientific Autumn Conference 2024 – Academy of Romania Scientists - Iasi, Romania, 23-24 September 2024, *"Localized Surface Plasmons in films and Nanomaterials and Their Applications in Nanophotonics and Bio-Medical Sciences"*, Cornel Cobianu
 9. National Scientific Autumn Conference 2024 – Academy of Romania Scientists - Iasi, Romania, 23-24 September 2024, Iasi *"Polysulfone nanoparticles obtained by microfluidics for biological applications"* Ciprian Iliescu
 10. National Scientific Autumn Conference 2024 – Academy of Romania Scientists - Iasi, Romania, 23-24 September 2024, Iasi *"Bacterial Lysis Efficiency by using a Lab-On-Chip System"* Laura-Elena Andrei
 11. International Semiconductor Conference (**CAS 2024**) – Sinaia, Romania, 9-11 October 2024 *"Carbon Nanohorns-PVP Nanocomposite as Sensing Layer for Resistive Humidity Monitoring: Preliminary Results"* Cornel Cobianu
 12. Nanyang Technological University, School of mechanical and Aerospace Engineering, 12 November 2024, Singapore *„Microneedles array for transdermal drug delivery”* F.S. Iliescu – invited seminar

Lucrări științifice publicate în reviste ISI:

1. Gradisteanu Pircalabioru G., Musat M., Elian V., Iliescu C. (2024) *Liquid Biopsy: A Game Changer for Type 2 Diabetes* International Journal of Molecular Sciences 25(5), 2661

Under review:

2. M. Ghiță-Răileanu, B.-M. Tihăuan, I.-O. Lixandru-Petre, L.-G. Gheorghiu, G. Gradisteanu Pircalabioru, G. Cioca, F.S. Iliescu, and C. Iliescu, *"The good, the bad, and the ugly: skin-on-chip"*
3. B.-M. Tihăuan, T. Onisei, D. Gună, W. Sloothberg, C. Iliescu, M.C. Chifiriuc. *"Breaking Through the Skin: A Comprehensive Meta-Analysis on Transdermal Cannabidiol Delivery and Its Therapeutic Potential"*

A2.1. Tehnologii de fabricație pentru cipuri microfluidice pentru auto-asamblarea nanoparticulelor

2.1.1. Tehnologie de fabricație Si/sticlă

Design:

Schița dispozitivului microfluidic este prezentată în Figura 1. Dispozitivul prezintă două intrări și o ieșire, dimensiunile canalului microfluidic în zona de focusare hidrodinamică fiind: lățime 20, 40, 60, 100 și 200 μm , adâncime 40 μm (tehnologia de fabricație permite procesarea simultană a mai multor cipuri cu design diferit). Alte dimensiuni sunt prezentate în Figura 1

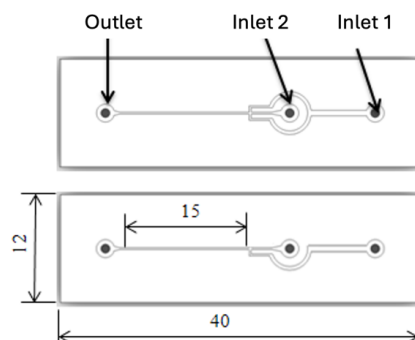


Figura 1: Schița dispozitivului microfluidic pentru auto-asamblarea nanoparticulelor

Pentru fabricarea canalelor microfluidice a fost utilizată o placă de siliciu de 4", lustruită pe ambele fețe, cu grosime de 300 μm , cu orientare cristalografică (100). Placheta de siliciu a fost curățată în piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$) timp de 20 de minute la 120 $^\circ\text{C}$. PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition) SiO_2 a fost depus ca mască pentru gravura Si pentru canalele microfluidice (depus pe partea superioară a plachetei de Si cu o grosime de 500 nm) și pentru găurile de intrare/ieșire (partea inferioară de 2 μm grosime) - Figura 2A. Transferul măștii pe stratul PECVD a fost efectuat utilizând un proces de fotogravură folosind fotorezistent pozitiv AZ7220 (Clariant) și un proces de corodare în plasmă RIE cu CHF_3/O_2 . După transferul măștii pe stratul de SiO_2 , masca de fotorezist a fost îndepărtată folosind acetonă și alcool izopropilic. Un prim proces de corodare anizotropă în plasmă - deep RIE (Reactive Ion Etching) (pentru canalul microfluidic) a fost efectuat pe un sistem ICP DRIE folosind SF_6/O_2 și C_4F_8 ca gaze de procesare (Figura 2B)- clasicul proces „Bosch”. Adâncimea de gravare (controlată în timp) a fost de 40 μm . După curățarea cu plasmă în O_2 pentru îndepărtarea stratului de pasivare, structura canalului a fost acoperită cu strat oxid termic 200 nm grosime. Rolul principal al acestui strat a fost acela de a proteja integritatea canalului microfluidic în timpul prelucrării orificiilor de intrare/ieșire. Găurile de intrare/ieșire au fost prelucrate folosind un proces clasic deep RIE a (Figura 2C). Placa de Si a fost montată pe o placă-suport de siliciu falsă folosind o lipire temporară cu ceară. Pentru a evita topirea cerii, procesul a fost efectuat la -10 $^\circ\text{C}$ (modificarea mică a profilului de gravare nu a afectat funcționalitatea dispozitivului). Dezlipirea cerii a fost efectuată pe o plită termostatăă. Reziduul a fost îndepărtat în NMP (N-metilpirolidonă) la 80 $^\circ\text{C}$ într-o baie cu ultrasunete. Atât măștile de SiO_2 cât și stratul TEOS au fost în cele din urmă îndepărtate într-o soluție BOE (Buffer Oxide Etch). Un strat final de SiO_2 cu o grosime de 150 nm a fost crescut termic într-un cuptor (Figura 2D). Acest strat a generat o suprafață hidrofilă a canalului microfluidic. După oxidare, placheta de Si prelucrată a fost

lipită anodic pe o placă de sticlă (Corning 7740 - Figura 2E). Placa de siliciu procesată a fost tăiată pe o mașină cu disc diamantat și conectorii Nanoport au fost montați pentru interfața fluidică.

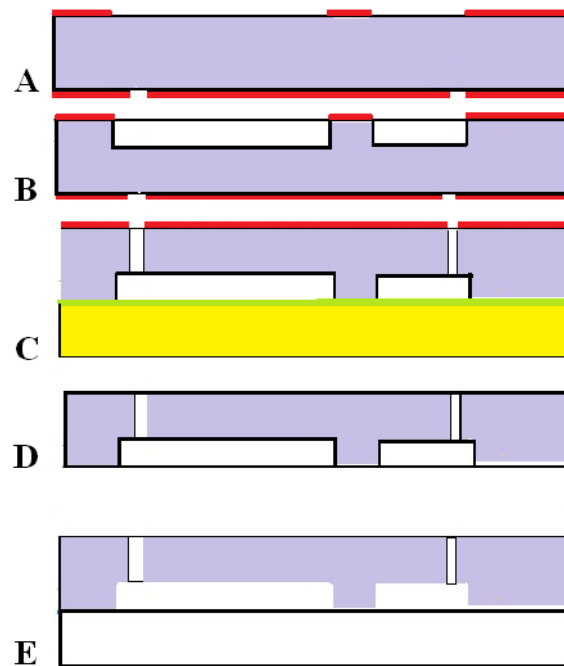


Figura 2. Etapele principale ale procesului de fabricație a cipului microfluidic

- (A) prelucrarea măștilor de SiO_2 pentru canalele microfluidice și orificiile de intrare/ieșire
- (B) Gravarea DRIE a canalului microfluidic
- (C) Gravarea DRIE a orificiilor de intrare/ieșire;
- (D) Oxidare termică
- (E) sudura anodică a plachetei de siliciu la sticlă .

Schița de asamblare a dispozitivului microfluidic (incluzând conectorii) este prezentată în Figura 3. O imagine cu cipul microfluidic asamblat este prezentată în Figura 4. Figura 5 prezintă o imagine cu diverse cipuri pentru fabricația nanoparticulelor.

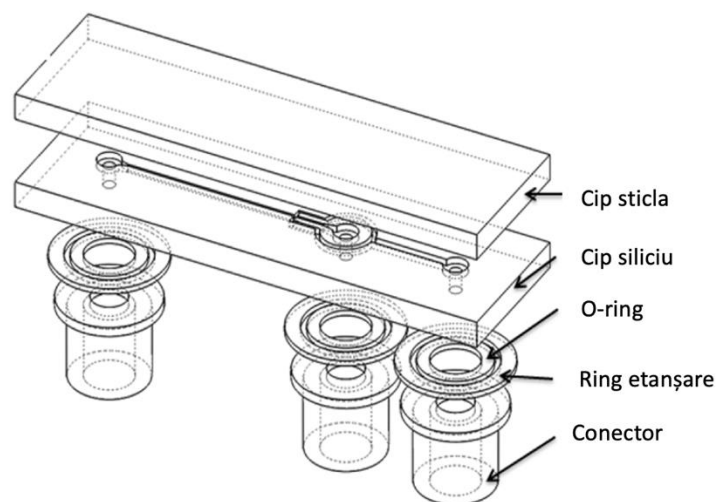


Figura 3. Schița de asamblare a cipului microfluidic

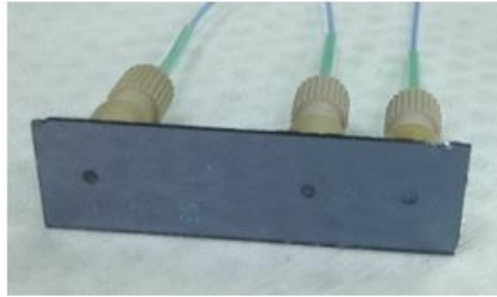


Figura 4. Cip microfluidic asamblat cu conectori „Nanoport”

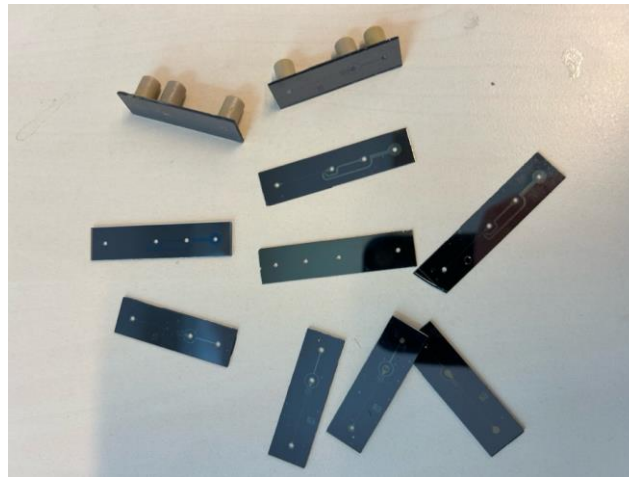


Figura 5. Imagine cu diverse cipuri proiectate pentru fabricarea nanoparticulelor prin autoasamblare

2.1.2 Tehnologia de fabricație PDMS-sticlă

Varianta 1:

Dispozitivul a fost fabricat folosind tehnologia „softlithography”. Principalele etape ale procesului de fabricație sunt descrise în Figura 6. În primul pas - Figura 6A- o mască cu canale microfluidice a fost transferată pe o placă de siliciu (Si) de 4” folosind un proces fotolitografic clasic, care a implicat fotorezist pozitiv AZ4620. În pasul următor- Figura 6B- a fost efectuat un proces de corodare izotropă cu adâncime de 40 μm prin masca de fotorezist folosind un procedeu clasic (Bosch) într-un reactor de tip ICP-DRIE. După îndepărtarea măștii de fotorezist în NMP (N-Methyl-2-pyrrolidone), un strat dublu de SiC (obținut prin depunere în plasmă - PECVD) și teflon (depunere în plasmă folosind C_4F_8) a fost folosit pentru o demulare ușoară a elastomerului (PDMS)- Figura 6C. Matrița de Siliciu a fost acoperită cu PDMS (în raport de 1/10 întăritor/polimer), degazat pentru $\frac{1}{2}$ ore într-o incintă vidată, urmat de proces de polimerizare la $80^\circ\text{C}/3\text{h}$ într-o etuvă - Figura 6D. După desprindere de pe matrița de siliciu (folosind alcool izopropilic), mulajul de PDMS a fost degresat și uscat. Găurile de intrare/ieșire au fost perforate cu o preducea, iar PDMS turnat a fost separat în dispozitive individuale, care au fost sudate pe lamela de sticlă după o activare de 30 de secunde a suprafeței PDMS în plasmă de $\text{O}_2/100\text{ W}$ - Figura 6E.

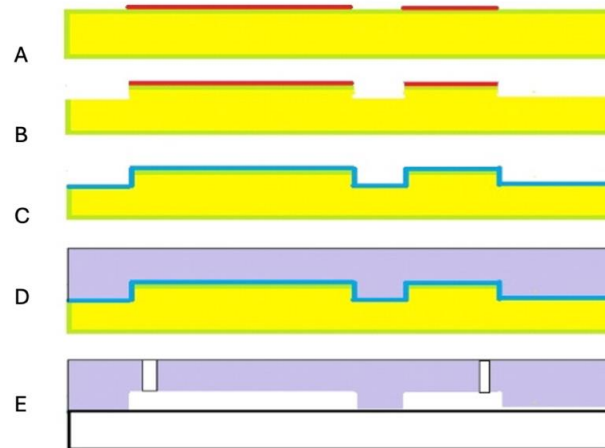


Figura 6. Etapele procesului de fabricație a cipurilor microfluidice PDMS/sticlă:

- A) Masca de fotorezist
- B) Corodare anizotropă în plasmă (Deep RIE)
- C) Acoperire SiC-teflon
- D) Mulare PDMS
- E) Separarea cipurilor de PDMS, realizarea găurilor de acces, sudura cip PDMS/Sticlă

Varianta 2

Într-o a doua variantă, matriță pentru turnarea PDMS-ului pentru dispozitivul de focusare hidrodinamică s-a realizat prin printare 3D folosind un sistem de printare CADworks3D- Profluidics. Printarea s-a realizat prin metoda „stereolithography” folosind o rășină recomandată de furnizor (μ Microfluidics Resin – Master Mold for PDMS). Desenul matriței pentru mulajul PDMS-ului prezentat în Figura 7 s-a realizat în SolidWorks (s-a urmărit respectarea unui raport înălțime/grosime de maxim 2/1). Printarea s-a realizat folosind un program care asigură o rezoluție de 30 μ m. Figura 8 prezintă realizarea practică a acestei matrițe de mulare iar Figura 9 prezintă un cip microfluidic sudat pe lamelă de sticlă.

Etapele procesului de fabricare a dispozitivului microfluidic au fost:

1. Printare 3D
2. Curățire în alcool izopropilic-IPA (pentru înlăturare grosieră a rășinii de printare)- 2 minute
3. Uscare sub aer comprimat
4. A doua curățire în IPA -20 min
5. Uscare sub aer comprimat
6. Expunere UV 40 minute
7. Pregătire PDMS (SYLGARD™ 184 1/10 Întăritor/polimer)- degazare în desicator pentru 30 min
8. Turnare PDMS în matriță – menținere în desicator 15 min pentru eliminarea bulelor de aer care pot apărea la interfață matriță-elastomer
9. Întărire - etuvă 3h/80°C
10. Desprindere din matriță (în prezența IPA)
11. Degresare

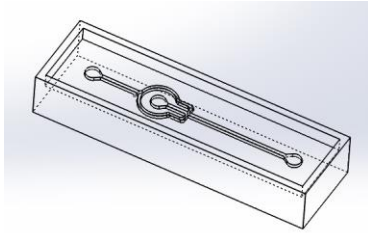


Figura 7. Desenul matriței pentru realizarea cipului din PDMS



Figura 8. Matrița pentru realizarea cipului din PDMS

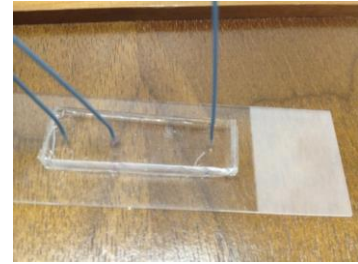


Figura 9. Cip microfluidic sudat pe lamela de sticlă

2.1.3 Printare directă a dispozitivului microfluidic

O altă variantă de procesare a dispozitivelor microfluidice este printarea directă folosind o rășină transparentă („Clear microfluidic resin”- de la CADworks3D). Metoda are marele avantaj al printării simultane a circuitului microfluidic și al conectoarelor fluidice. Un prim design testat este prezent în Figura 10.

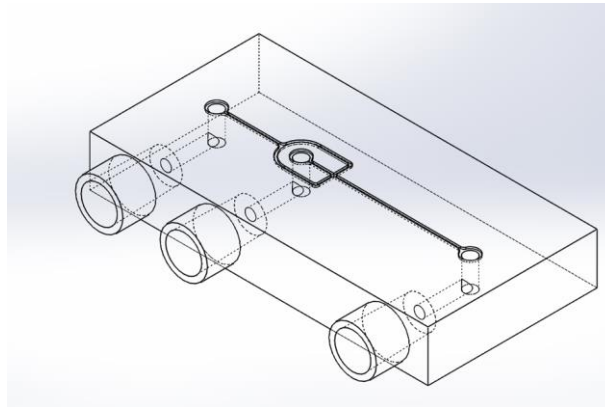


Figura 10. Desenul cipului microfluidic ce cuprinde și conectoarele fluidice

Realizarea practică este prezentată în Figura 11. O folie adezivă PCR a fost folosită pentru etanșizarea circuitului microfluidic.



Figura 11. Cip microfluidic printat

Etapele procesului de fabricare a dispozitivului microfluidic au fost:

1. Printare 3D
2. Curățire în alcool izopropilic-IPA (pentru înlăturare grosieră a rășinii de printare)- 2 minute

3. Uscare sub aer comprimat
4. A doua curățire în IPA -2 min
5. Uscare sub aer comprimat
6. Expunere UV - 2 minute

S-a observat că expunerea îndelungată la UV în IPA conduce la „mătuirea” și reducerea transparenței dispozitivului microfluidic. De asemenea transparența este influențată și de rugozitatea plăcii suport (pe care se printează dispozitivul microfluidic). Pentru o aderență mai bună a cipului, placa suport trebuie să fie rugoasă. Pentru printarea directă s-a achiziționat recent o placă suport cu suprafață lucioasă (rugozitate $<2n$). Există însă riscul desprinderii dispozitivului microfluidic în timpul printării. Un test preliminar este prezentat în Figura 12.

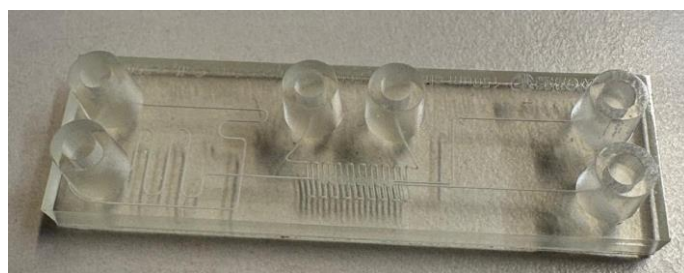


Figura 12. Test preliminar cu un dispozitiv microfluidic printat (complet) folosind o placă suport lucioasă

1.4 Concluzii privind tehnologiile de fabricație a cipurilor microfluidice pentru auto-asamblarea nanoparticulelor

S-au elaborat 5 variante tehnologice de fabricație a cipurilor microfluidice

1. Tehnologia de fabricație Si/sticlă
 - este o tehnologie robustă foarte bine pusă la punct
 - cipurile pot fi reutilizate după o curățare în NMP
 - rezoluție foarte bună atât în plan (de 2 μ m poate fi obținut ușor) cât și pe verticală-adâncimea canalului- prin controlul procesului de corodare
 - necesită clean-room
 - timp îndelungat de procesare, dar se procesează 10-16 cipuri/plachetă
 - conectorii (Nanoport) destul de scumpi iar lipirea lor nu este foarte fiabilă
 - suprafața canalelor este hidrofilă
2. Tehnologia de fabricație PDMS/sticlă
 - Foarte versatilă
 - Fabricarea matrițelor prin printare 3D este relativ simplă,
 - Fabricarea matrițelor prin metoda fotolitografică poate asigura o rezoluție mai bună
 - Rezoluția cipurilor este limitată, în mod practic se pot realiza canale microfluidice având lățimea de 100 μ m și adâncimi de 50-60 μ m
 - Tubulatura de alimentare se poate monta direct în PDMS printr-o dimensionare corectă a perforării (simplitate în conectarea la sistemele de pompare)
 - Cipuri de unică folosință
 - Transparența bună a cipurilor
 - Suprafața canalelor este hidrofobă (75%- suprafață de PDMS) necesită modificarea suprafeței cu PEG

3. Printare 3D

- Simplitate și rapiditate în proiectarea dispozitivelor
- Suprafața circuitului microfluidic trebuie modificată (PEG)
- Conectorii pot fi printați direct
- Cipurile de unică folosință
- Rezoluția cipurilor este limitată, în mod practic se pot realiza canale microfluidice având lățimea de 100um și adâncimi de 50-60um

A2.2. Testarea funcționalității cipurilor microfluidice

Schema modului de testare este prezentată în Figura 13. Două pompe automate („New Era Pump Systems” au fost folosite pentru a injecta polisulfonă dizolvată în NMP și apă deionizată. Calitatea solventului a fost schimbată rapid prin focalizarea hidrodinamică a fluxului. Pe scurt, un flux de polisulfonă în NMP a fost intercalat între unul, două fluxuri laterale de apă pură, sau mixat printr-un mixer fluidic (figura 14). Ca rezultat, fluxul de polisulfonă a fost strâns și lățimea sa a fost redusă la câțiva micrometri în funcție de raportul debitului, în timp ce canalul avea o lățime de 100 um. Apa a difuzat apoi printr-un strat subțire de soluție de polisulfonă precipitând sub forma unor nanoparticule. O estimare aproximativă a timpului de amestecare τ_{mix} poate fi dedusă din conservarea masei fluidelor presupunând incompresibilitatea acestora :

$$\tau_{mix} \approx \frac{w_o^2}{9(1 + R)^2 D}$$

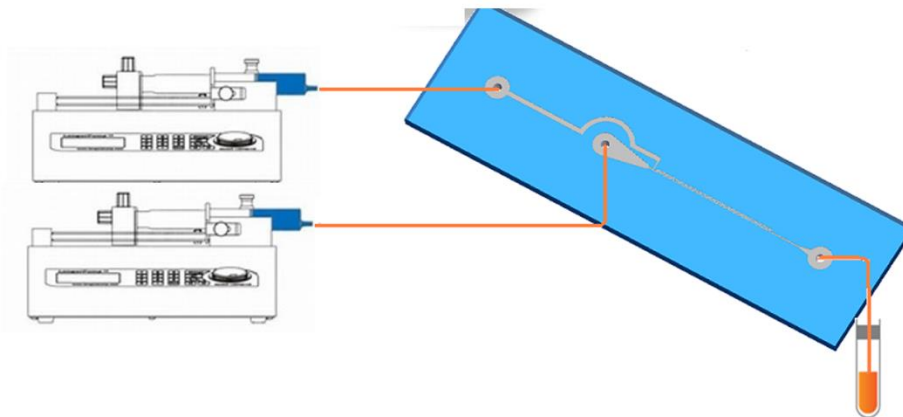


Figura 13. Metoda de testare pentru auto-asamblarea particulelor



Figura 14. Diverse configurații ale canalelor microfluidice

unde w_0 desemnează lățimea canalului, R raportul polisulfonă la debitul de apă și D coeficientul de difuzie al apei, adică $10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$. Cu o lățime a canalului de $100 \mu\text{m}$ și un raport al debitului de 10, ajungem la un timp de amestecare de aproximativ 9 ms. Această valoare a fost mai mică decât timpul obișnuit de agregare deoarece diametrul hidrodinamic al nanoparticulelor de polisulfonă nu s-a schimbat mult de la $R = 10$ ($\tau_{\text{mix}} = 9,2 \text{ ms}$) la $R = 40$ ($\tau_{\text{mix}} = 0,66 \text{ ms}$). Diametru hidrodinamic, care a fost obținut la $R = 10$, a fost de 74 nm pentru focalizare centrală, 80 nm și 93nm pentru mixerul fluidic. Indicele de polidispersitate a fost 0,12, 0.09 și 0.65 (pentru dispozitivele fluidice menționate în ordinea de mai sus). Putem concluziona că focusarea hidrodinamică reprezintă o soluție viabilă comparativ cu mixerul fluidic.

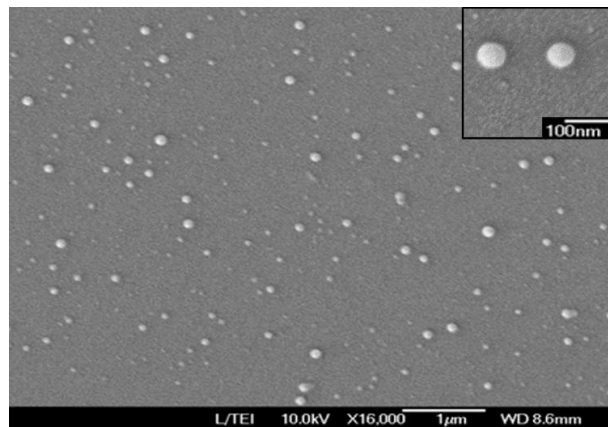


Figura 15. Imagini SEM cu nanoparticulele procesate

S-a făcut o comparație între dispozitivele fabricate prin tehnologia Si/Sticlă și tehnologia PDMS/sticlă. Rezultatele curgerii prin aceste canale sunt prezentate în Figura 16. Nu s-au observat diferențe majore. Canalele în Si sunt mai bine definite. Principalul avantaj rămâne cel al refolosirii dispozitivului și posibilitatea curățării folosind sistemul microfluidic, prin simpla înlocuire a seringii cu PS cu o seringă cu dizolvant (NMP).

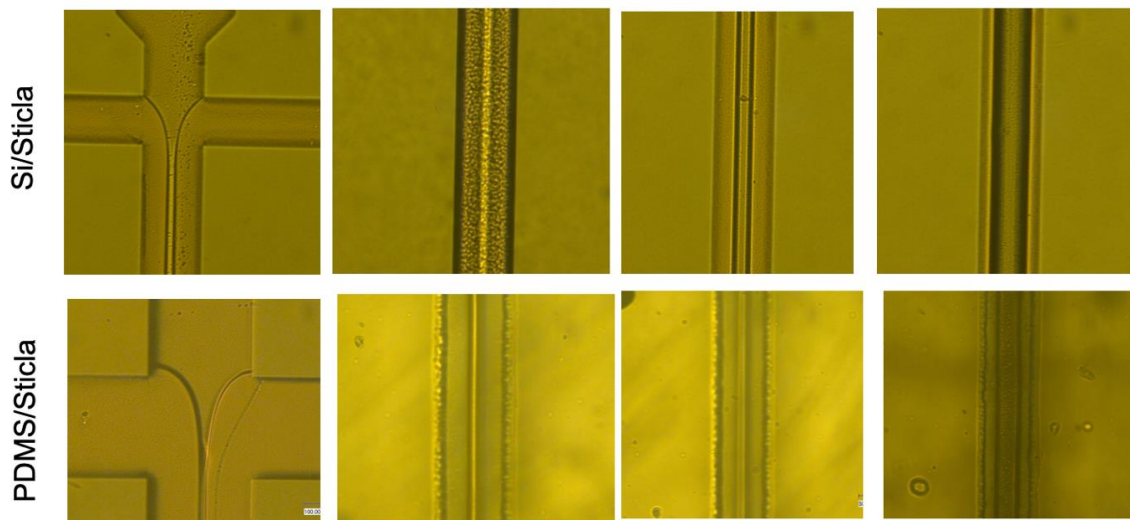


Figura 16. Comparație cu focusarea hidrodinamică prin două dispozitive fabricate în tehnologii diferite

A2.3. Dezvoltarea unor tehnologii de fabricare a plasturilor cu microace folosind matrite generate prin printare 3D

2.3.1. Tehnologie de fabricație a matrițelor

Design:

Designul vine să răspundă nevoii de inovație în domeniul polimerilor durabili și pune accentul pe lanțul de aprovizionare chimic eficient. Arhitectura propusă prezintă microace solide și canaliculare cu rezervor.

Matrițele pentru turnarea polimerilor pentru dispozitivele de microace s-au realizat prin printare 3D. Desenele matrițelor de mulare pentru polimerul biocompatibil și al celei pentru mulajul PDMS-ului sunt prezentate în Figura 17 (C) și respectiv (D) s-au realizat în SolidWorks. Printarea s-a realizat folosind un program care asigură o rezoluție de 30 μ m.

Schițele matrițelor cu microace sunt prezentate în Figura 17.

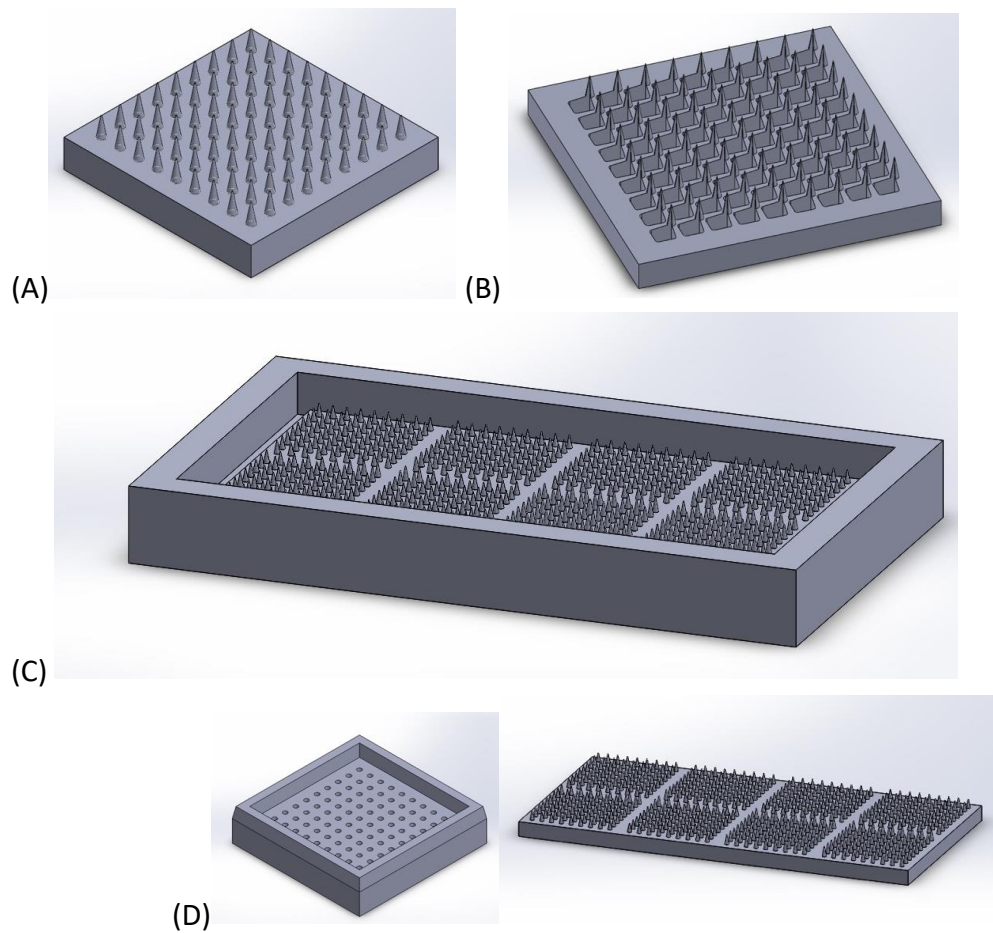


Figura 17. Schițele matrițelor de microace prin stereolitografie (A) solide (B) canaliculare cu rezervor, (C) pentru mulajul de PDMS

2.3.2 Tehnologia de fabricație a plasturilor cu microace

Varianta 1. Printare directă a matrițelor cu microace

Printarea 3D prin stereolitografie cu polimerizare într-o singură etapă pare a fi cea mai promițătoare alternativă, datorită ușurinței sale de fabricare într-un singur pas și capacității sale

de a încorpora scanări 3D a diverselor porțiuni de interes a corpului uman (unde se dorește aplicarea tratamentului transdermic) pentru a obține un patch cu microace personalizat a care să țină cont de toate contururile pielii.

Tipărirea directă folosește rășini (MasterMold și Clear microfluidic resin de la CADworks3D). Metoda ar prezenta marele avantaj al printării simultane a detaliilor canaliculelor.

Un prim design printat este prezent în Figura 18(A) - o matrice de 8x9x9 microace conice cu înălțimea de 800um și diametrul bazei de 400um. Figura 18 (B) prezintă o matrice de microace canaliculare cu rezervor cu înălțimea de 800um și diametrul bazei de 400um, pentru activare SAW.

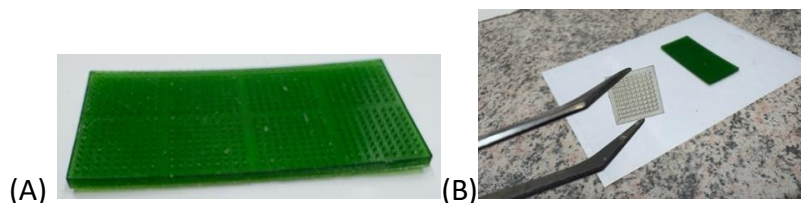


Figura 18. Matricele de microace printate (A) conice solide și (B) conice cu rezervor

Vizualizarea SEM a dispozitivelor este în Figura 19.

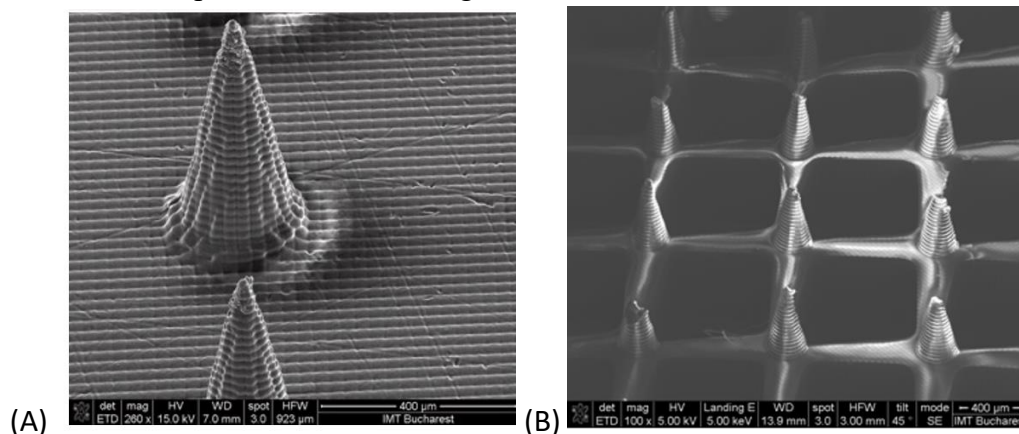


Figura 19. Imaginea SEM a matricele de microace prin stereolitografie (A) solide conice și (B) canaliculare cu rezervor

Etapile procesului de fabricare prin printare directă a dispozitivului cu microace au fost:

1. Printare 3D
2. Curățare în alcool izopropilic-IPA (înlăturarea grosieră a rășinii de printare)- 2 minute
3. Uscare sub aer comprimat
4. A doua curățare în IPA -2 min
5. Uscare sub aer comprimat
6. Expunere UV 2 minute

Varianta 2.

Procesul se bazează pe softlitography cu 2 forme determinate de tipul de polimer pentru matricea finală de microace polimerice biocompatibile. Dificultatea constă în găsirea materialelor adecvate necesare pentru a obține reacții bune de polimerizare (cinetică rapidă, greutate moleculară mare, reticulare bună etc.), piese finale stabile din punct de vedere mecanic (procesabilitate bună) și reciclabilitate.

Diacrilatul de polietilenglicol (PEGDA, MW700 Da) ca monomer fotoreactiv și prezent sub formă de lichid la temperatura camerei, este un candidat potrivit. În plus, polimerizează în polimeri biocompatibili care au fost utilizați în aplicații farmaceutice. Concentrația fotoinițiatorului (BAPO) a fost menținută la 0,5% g/g. Fiecare lichid monomer a fost cântărit cu precizie și apoi a fost obținut amestecul. La rășina rezultată, s-a adăugat o cantitate cântărită cu precizie de BAPO și s-a vortexat până la dizolvarea completă.

Forma 1.

Matrița pentru turnarea PDMS-ului pentru dispozitivul de microace s-a realizat prin printare 3D folosind un sistem de printare CADworks3D- Profluidics. Printarea s-a realizat prin metoda „stereolithography” folosind o rășină recomandată de furnizor (μ Microfluidics Resin – Master Mold for PDMS). Desenul matriței pentru mulajul PDMS-ului este prezentat în Figura 17 (D) s-a realizat în SolidWorks. Printarea s-a realizat folosind un program care asigură o rezoluție de 30 μ m. Figura 20 (A) prezintă realizarea practică a acestei matriței de mulare iar Figura 20 (B) mulajul PDMS.

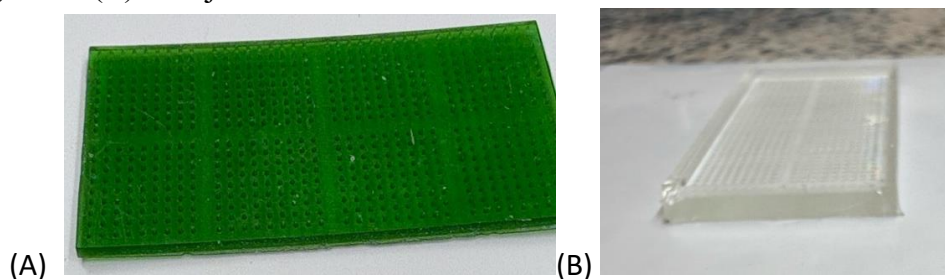


Figura 20. Matrițele de microace prin stereolitografie (A) de mulare pentru PDMS și (B) mulajul de PDMS

Etapile procesului de fabricare a dispozitivului microfluidic au fost:

1. Printare 3D
2. Curățare în alcool izopropilic-IPA (pentru înlăturare grosiera a rășinii de printare)-2minute
3. Uscare sub aer comprimat
4. A doua curățare în IPA -20 min
5. Uscare sub aer comprimat
6. Expunere UV 40 minute
7. Pregătire PDMS (SYLGARD™ 184 1/10 Întăritor/polimer)-degazare în desicator pentru 30 min
8. Turnare PDMS în matriță – menținere în desicator 15 min pentru eliminarea bulelor de aer care pot apărea la interfață matriță-elastomer
9. Întărire – etuva 3h/80°C
10. Desprindere din matriță (în prezența IPA)
11. Degresare
12. Pregătirea PEGDA
13. Turnarea PEGDA pe master mould
14. Tratarea la UV 405nm -15 min
15. Verificarea polimerizării
16. Post polimerizare – UV 405nm – 5 min

Figura 21 prezintă matricea de microace polimerice.

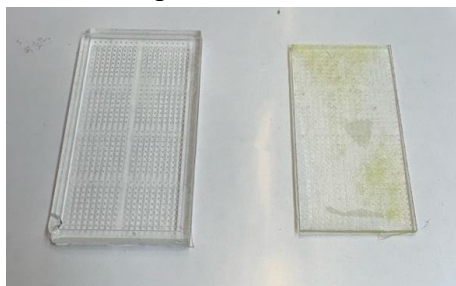


Figura 21. Matricea de microace din PEGDA (dreapta) lângă matrița de PDMS

Forma 2:

Matrița pentru turnarea polimerului pentru dispozitivul de microace s-a realizat prin printare 3D folosind un sistem de printare CADworks3D- Profluidics. Printarea s-a realizat prin metoda „stereolithography” folosind o rășină recomandată de furnizor (μ Microfluidics Resign – Master Mold). Desenul matriței prezentat în Figura 17(C) s-a realizat în SolidWorks. Printarea s-a realizat folosind un program care asigură o rezoluție de $30\mu\text{m}$. Figura 22 prezintă realizarea practică a acestei matrițe de mulare și mulajul de PEGDA.



Figura 22. Matricele de microace din PEGDA (mijloc) lângă matrițele de PDMS (stânga) și rășină (dreapta)

Etapile procesului de fabricare a dispozitivului microfluidic au fost:

1. Printare 3D
1. Curățire în alcool izopropilic-IPA (pentru înlăturare grosiera a rășinii de printare)-2minute
2. Uscare sub aer comprimat
3. A doua curățire în IPA -20 min
4. Uscare sub aer comprimat
5. Expunere UV - 40 minute
6. Pregătire PEGDA - degazare în desicator pentru 30 min
7. Turnare PEGDA în matriță - menținere în desicator 15 min pentru eliminarea bulelor de aer care pot apare la interfață matriță- elastomer
8. Polimerizare UV 405 nm - 15 min
9. Desprindere din matriță (în prezenta IPA)
10. Degresare
11. Verificarea polimerizării
12. Post polimerizare - UV 405 nm - 5 min

Concluzii privind tehnologiile de fabricație

S-au dezvoltat 3 tehnologii de fabricare a plasturilor cu microace folosind matrițe generate prin printare 3D. Procedeele pot fi utilizate pentru fabricarea microacelor cuplate cu alte dispozitive de exemplu SAW și iontoforeza.

Ambele metode ce au folosit litografia s-au bazat pe contactul fizic al ștampilei/sondei cu substratul. Contactul fizic este mediatorul cheie al transferului de model și este, în principiu, limitat doar de contactul van der Waals și de granularitatea atomică și moleculară inerentă a materiei. Prin urmare, uscarea a fost un pas esențial în proces.

2.4.Dezvoltarea unui protocol pentru fabricare in câmp acustic (SAW) a modelului de piele folosind fibroblaste

4.1 Dispozitivele SAW

Rezonatoarele SAW tradiționale utilizează electrozi interdigitali depuși pe materiale piezoelectrice prin tehnici de microtehnologie, în special fotolitografie. Aceasta permite controlul undelor acustice la suprafața materialului. Rezonatoarele SAW operează într-un domeniu de frecvență cuprins între 10 și 1.000 MHz, dar pentru aplicațiile microfluidice, se utilizează de obicei o gamă de frecvență mai mică, între 10 și 50 MHz. Undele acustice de suprafață pot fi utilizate pentru manipularea fluidelor la microscală, ceea ce poate duce la dezvoltarea de dispozitive pentru aplicații precum analize chimice rapide, microfabricarea de structuri sau sisteme de control al fluxului de lichide. Designul electrozilor interdigitali și selecția materialului piezoelectric sunt esențiale pentru performanța acestor dispozitive. În raportul anterior am prezentat designul a 6 tipuri de dispozitive SAW pe care intenționăm să le utilizăm (Figura 23).

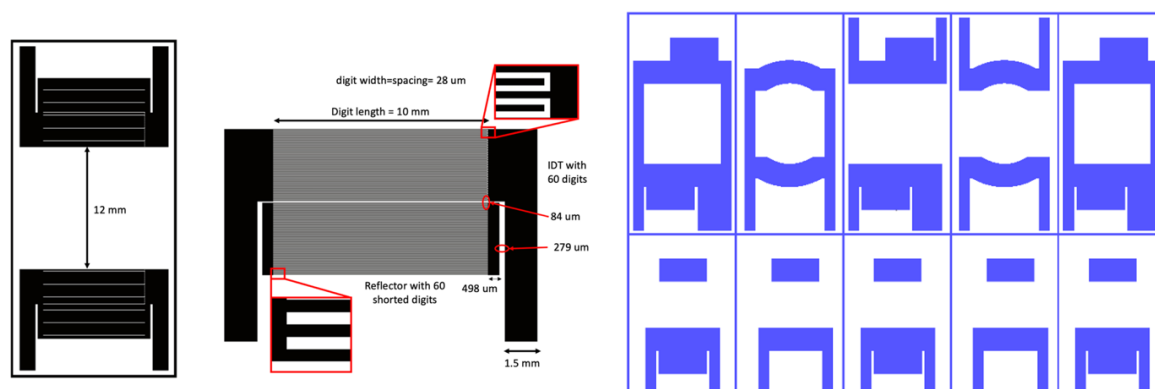


Figura 23. Proiectul unui dispozitiv SAW și masca (metalizare) de realizare a cipurilor

Procesul de fabricație a unor asemenea dispozitive este bazat pe procese specifice microtehnologiei. În cazul nostru, o placheta LiNbO₃, 4", 500um grosime a fost folosită. Un strat de Al cu o grosime de 1,2 um a fost depus în vid folosind o evaporator „e-Beam”. Un proces fotolitografic a fost folosit pentru generarea unei măști de fotoresist (pozitiv). Prin această mască stratul de aluminiu a fost corodat folosind o soluție disponibilă comercial (Aluminium Etchant Type A- Sigma Aldrich). După înlăturarea fotorezistului într-o soluție de NMP, placheta procesată de LiNbO₃ a fost tăiată în cipuri individuale.

Frecvența de rezonanță a dispozitivelor SAW obținute a fost 30MHz. Imagini cu dispozitivele realizate montate pe PCB sunt prezentate în Figura 24.

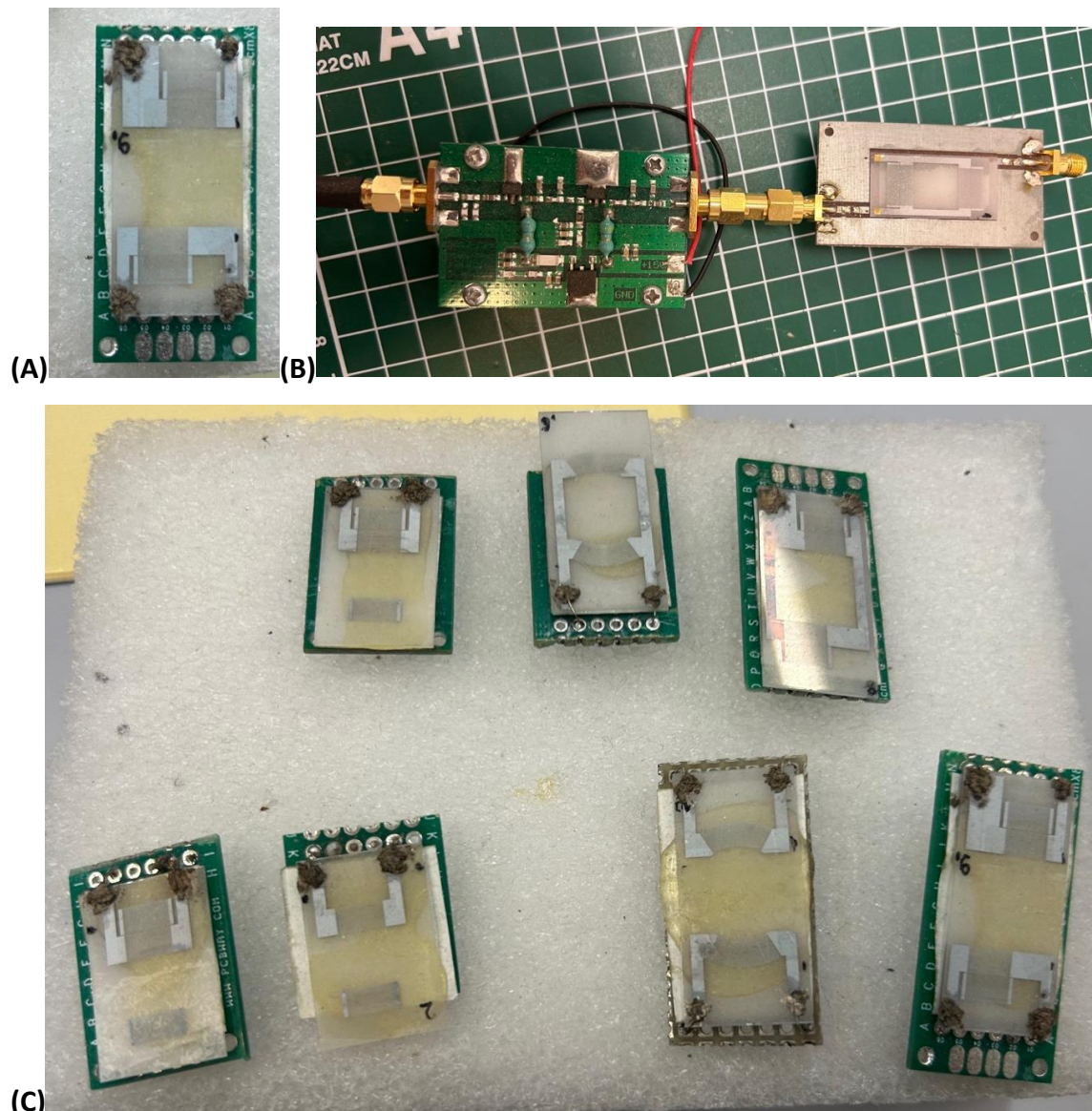


Figura 24. Imagini cu dispozitivele SAW: (A) dispozitiv SAW montat pe PCB, (B) varianta dispozitivului SAW + amplificator (1W), (C) gama de dispozitive SAW fabricate .

4.2 Cultura de celule- Fibroblaste

Fibroblastele sunt, în mod tradițional, celule care creează și mențin o gamă diversă de țesuturi conjunctive, bogate în matrice extracelulară (ECM), esențiale pentru susținerea unor funcții vitale ale organelor. Acestea asigură rezistență la leziuni contondente ori cu obiecte ascuțite asupra pielii sau permit întinderea și refulul elastic al unor organe, cum ar fi plămânii. Astfel, fibroblastele furnizează informații importante pentru celulele din vecinătate, prin semnale microarhitecturale, biomecanice și biochimice în ECM și prin secreția specializată a unor mediatori solubili, cum ar fi citokinele, factorii de creștere și metaboliții.

Pe lângă producerea țesuturilor conjunctive, fibroblastele joacă rolul de progenitori pentru celule mezenchimale specializate, cum ar fi osteoblastele, care formează oasele, sau

adipocitele, care acumulează lipidele. Aceste procese au loc pe parcursul dezvoltării embrionare, în homeostazia adulților și în timpul leziunilor, regenerării și remodelării țesuturilor. În literatura de specialitate, termenul de „fibroblast” se referă la celulele care: 1) secretă macromolecule structurale și de semnalizare ce contribuie la compunerea spațiului extracelular al țesutului, 2) adoptă un fenotip miofibroblast tranzitoriu și contractil ca răspuns la leziuni, 3) acționează ca celule de nișă pentru semnalizarea celulelor stem rezidente în țesuturi și/sau 4) servesc ca progenitori, uneori denumite celule stem mezenchimale, pentru celule mezenchimale diferențiate și specializate.

S-a dezvoltat o cultură de celule (fibroblast)-Figurile 25-27 pentru a vedea în ce măsură SAW ar putea contribui la (a) organizarea celulelor pe suprafață (b) viabilitatea modelelor celulare 3D în cazul în care culturile celulare sunt expuse undelor SAW (se așteaptă o îmbunătățire a difuziei a nutrienților și oxigenului)

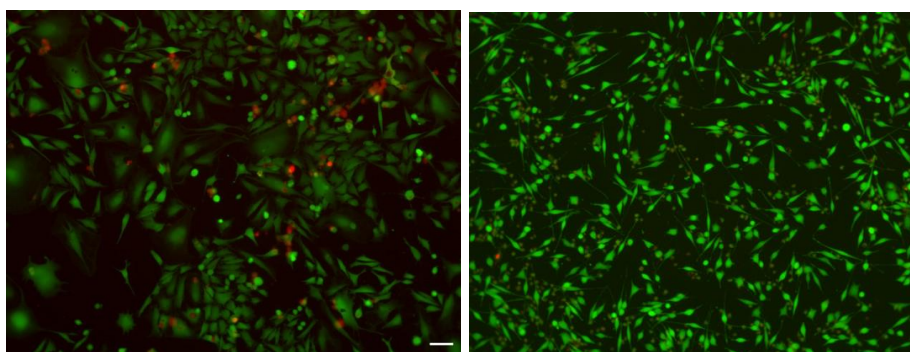


Figura 25. Human Dermal Fibroblasts (HDF) vizualizate prin microscopie de fluorescență în urma analizei Live/ Dead. Un procent ridicat de celule care apar verzi sub lumina fluorescentă, acestea fiind considerate celule viabile.

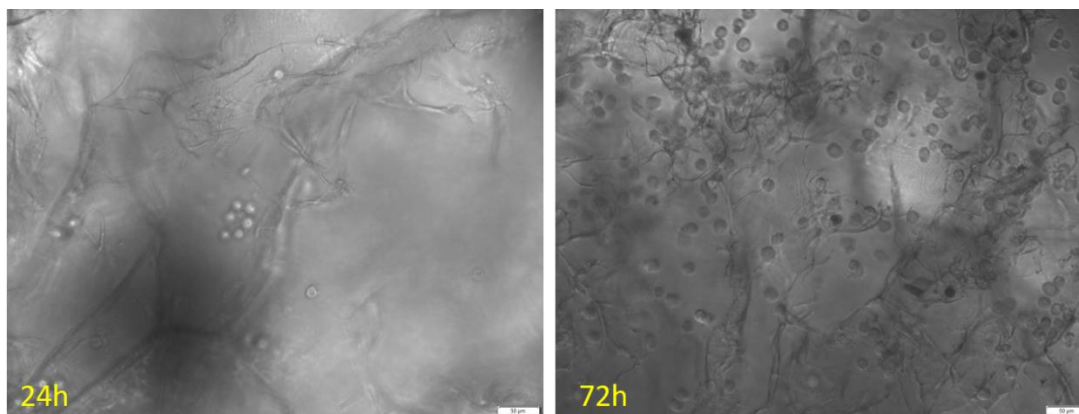


Figura 26. Fibroblaste cultivate în interiorul unui burete colagenic utilizat în managementul rănilor -la 24, și 72 ore de cultivare (Microscopie contrast de fază, 20X).

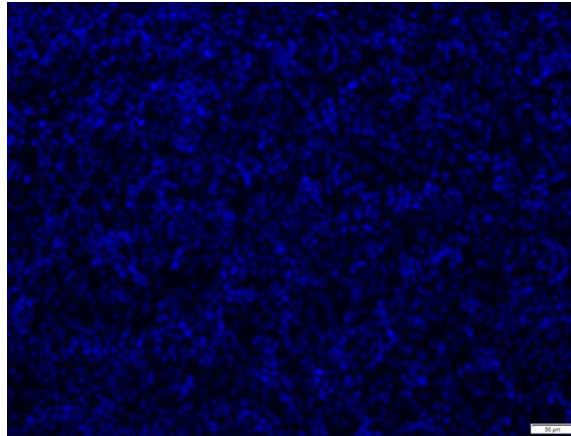


Figura 27. Fibroblaste cultivate în interiorul materialului colagenic -la 72 ore de cultivare (Microscopie de fluorescență, colorație DAPI, 20X).

1.3 Testarea preliminară a dispozitivului SAW

Dispozitivul SAW a fost activat prin furnizarea unui semnal electric oscilant la frecvența de rezonanță de 30 MHz/1W timp de 1 min la fiecare 5 minute (timp de 3h), folosind un generator de semnal multifuncțional și amplificator coaxial pentru a induce undele acustice în cultura celulară. Poziția dispozitivului SAW sub placa de godeu a fost apoi mutată sub alte godeuri pentru a repeta același proces, deși mai multe dispozitive SAW, câte unul sub fiecare godeu, pot fi, de asemenea, utilizate pentru a rula mai multe procese în paralel pentru operare cu randament ridicat.

Energia acustică generată de dispozitivul SAW a fost apoi transmisă într-un microgodeu în care se afla cultura celulară de fibroblast (volum 20 μ l). Acest lucru a fost realizat prin plasarea dispozitivului SAW sub microgodeu, intercalând un strat subțire de cuplare fluidă -gel PRIMA folosit la ecografie). Această tehnică de cuplare a energiei acustice de la dispozitivul SAW într-un strat de superstrat a fost folosită pentru o varietate de operații acustomicrofluidice pe suprastraturi. Schița sistemului de testare este prezentată în Figura 28.

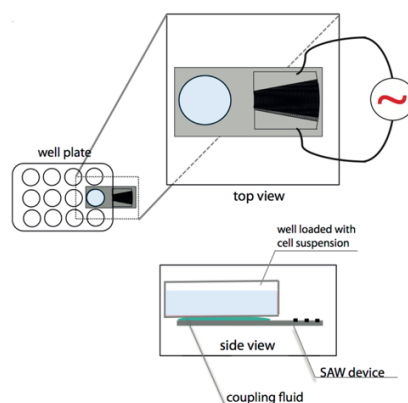
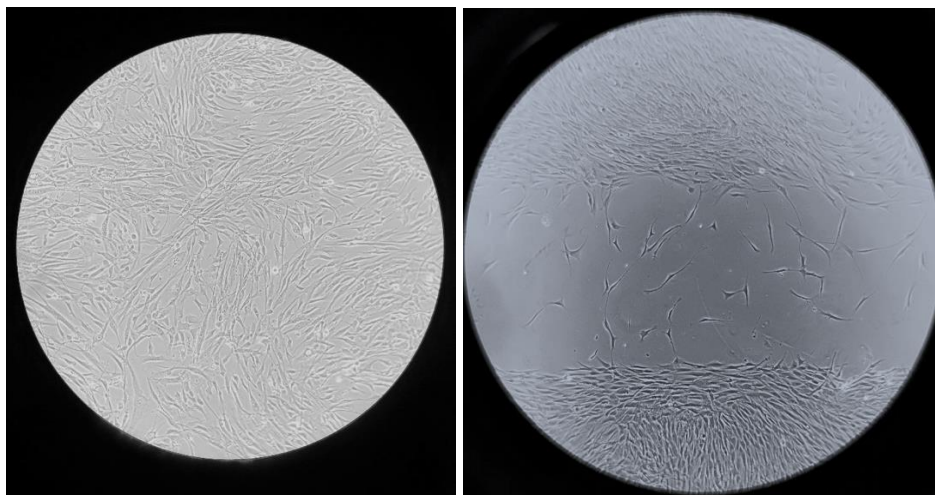


Figura 28. Schița sistemului de testare

În Figura 29 se prezintă rezultate primului test făcut pe cultura de fibroblast. Aplicarea undelor acustice la o putere (relativ mare) poate contribui la o rearanjare a celulelor (zone mai dense și mai puțin dense (figura din dreapta sugerând inducerea unei leziuni)



*Figura 29. Prima imagine descrie creșterea normală a celulelor, la o confluență de 80-90%.
A doua imagine ilustrează un gap de 0,9 mm -indus de aplicația undelor SAW*

În concluzie, s-a pregătit primul setup pentru testarea folosirii SAW în culturi celulare. Mai multe experimente sunt necesare pentru stabilirea clară a regimului de lucru, pentru observare clară a influenței undelor acustice de suprafață asupra viabilității culturilor celulare și de ce nu a menținerii funcțiilor celulare. Folosirea SAW poate oferi rezultate interesante în domeniul ingineriei tisulare.

Întocmit,
Era Chair, CS1 Ciprian Iliescu

Director proiect,
Prof. dr. ing. Horia Iovu