



**ALINE FURTADO OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MICROFLUÍDICO BASEADO EM  
GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DIFUSIVO PARA BIOPROCESSOS**

***DEVELOPMENT OF MICROFLUIDIC SYSTEM BASED ON DIFFUSIVE  
CONCENTRATION GRADIENT FOR BIOPROCESS***

CAMPINAS  
2014





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Engenharia Química  
Departamento de Engenharia de Materiais e Bioprocessos

**ALINE FURTADO OLIVEIRA**  
*Autora*

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MICROFLUÍDICO BASEADO EM  
GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DIFUSIVO PARA BIOPROCESSOS**

***DEVELOPMENT OF MICROFLUIDIC SYSTEM BASED ON DIFFUSIVE  
CONCENTRATION GRADIENT FOR BIOPROCESS***

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação de mestrado defendida por Aline Furtado Oliveira e orientada pela Profa. Dra. Lucimara Gaziola de La Torre.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Lucimara Gaziola de La Torre".

Assinatura da orientadora

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química para obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

*Orientadora:* Profa. Dra. Lucimara Gaziola de La Torre

*Co-orientador:* Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

PL4d Oliveira, Aline Furtado, 1989-  
Desenvolvimento de sistema microfluídico baseado em gradiente difusivo para bioprocessos / Aline Furtado Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Lucimara Gaziola de La Torre.  
Coorientador: Reinaldo Gaspar Bastos.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Microfluídica. 2. Bioreatores. 3. Biotecnologia. 4. Microbiologia industrial. I. Torre, Lucimara Gaziola de la, 1971-. II. Bastos, Reinaldo Gaspar. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Development of microfluidic system based on diffusive concentration gradient for bioprocess

**Palavras-chave em inglês:**

Microfluidics

Bioreactors

Biotechnology

Industrial microbiology

**Área de concentração:** Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**Titulação:** Mestra em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Lucimara Gaziola de La Torre [Orientador]

Rosiane Lopes da Cunha

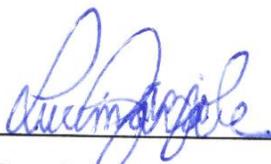
Marcelo Lancellotti

**Data de defesa:** 30-05-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação de mestrado defendida por Aline Furtado Oliveira e aprovada no dia 30 de Maio de 2014 pela banca examinadora constituída pelos seguintes doutores:



---

Profa. Dra. Lucimara Gaziola de La Torre  
Presidente da Comissão Julgadora  
Orientadora



---

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha



---

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

## RESUMO

A microfluídica é uma ciência que opera em pequenos volumes de fluídos dentro de canais em dimensões de micrômetros ( $10^{-6}$  m). Estes sistemas permitem controlar moléculas no espaço e no tempo, gerando resultados rápidos e confiáveis num sistema precisamente controlado e capaz de mimetizar ambientes celulares. Os dispositivos microfluídicos apresentam uma diversidade de geometrias aplicáveis para diversas áreas de pesquisas, sendo que a capacidade de formar gradientes permite avaliar as condições e o desempenho celular microbiano. Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver dispositivos microfluídicos capazes de formar gradiente de concentração difusivo e investigar sua aplicabilidade em bioprocessos. Diante disso, foram propostos três modelos de dispositivos usando materiais biocompatíveis: (i) dispositivo em base de vidro, denominado de Vidro-vidro; (ii) em base de vidro e poli dimetilsiloxano (PDMS), chamado de Vidro-PDMS e (iii) vidro e PDMS modificado quimicamente para tornar a superfície hidrofílica, Vidro-mPDMS. Os três dispositivos foram avaliados quanto à capacidade de formação de gradiente de concentração difusivo, os quais apresentaram um perfil linear. Além disso, validou-se o estudo do comportamento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 num gradiente de concentração de glicose de 0 a 40 g/L de glicose, sendo usado o dispositivo vidro-vidro. Foi observado que houve crescimento de células ao longo das câmaras microfluídicas, e isso possibilitou na determinação de parâmetros cinéticos, os quais não apresentaram diferença estatisticamente significativa com o cultivo em batelada convencional. As condições da microfluídica possibilitaram também a determinação da cinética de Monod, usando menores intervalos de gradiente. Portanto, este dispositivo microfluídico mostrou-se uma ferramenta com potencial para investigar comportamento celular frente à diferença de concentração e contribuirá para a otimização de bioprocessos através da determinação de parâmetros cinéticos.

Palavras-chave: *microfluídica, microbiorreator, bioprocessos.*

## ABSTRACT

Microfluidic is a science that operates in small amounts of fluids inside channels in dimensions of micrometers ( $10^{-6}$  m). These systems allow the precise control of molecules in space and time, generating fast and reliable results and it can also be used to mimics environment cellular . Microfluidic devices can be produced in diversity of geometries, it can be applied in several scientific areas and especially the formation of concentration gradients can be used to evaluate conditions and performance of microbial cell. Therefore, this work had the objective to develop microfluidic devices that are able to generate diffusive concentration gradients and investigate their applicability in bioprocesses. In this context, we propose three models of microfluidics devices using biocompatible materials: (i) Glass-based device, named glass-glass; (ii) glass and poli dimetilsiloxane (PDMS) based device, Glass-PDMS and (iii) glass and chemically modified PDMS (hydrophilic surface), Glass-mPDMS. The three devices were evaluated by their capacity of generating difusive concentration gradient, demonstrating linear concentration profile. Furthermore, the behavior of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 inside of glucose concentration gradient ranging from 0 to 40 g/L were validated, using the glass-glass device . It was observed that cell growth along the microfluidic chambers, having determined the kinetic parameters, which was considered statistically similar to conventional batch cultivation. Conditions of microfluidics also allowed determination of the Monod kinetic, using smaller intervals gradient Therefore, the use of concentration gradient in microfluidic device is a potential tool for investigate of microbial cell behavior against the concentration difference and it can contribute to the optimization of bioprocesses through the determination of kinetic parameters.

Key-words: *microfluidics, microbioreactor, bioprocess.*

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1 – Introdução Geral</b> .....	<b>19</b>
1 Introdução.....	19
2 Objetivos.....	21
3 Organização da dissertação em capítulos.....	22
Referências.....	22
<b>Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>24</b>
1 Microfluídica: propriedades e aplicações em biotecnologia.....	24
1.1 Aplicações em biotecnologia.....	25
1.2 Avanços em bioprocessos através da microfluídica.....	26
2 Construção e materiais de dispositivos microfluídicos.....	30
3 Dispositivos microfluídicos com formação de gradientes de concentração.....	33
3.1 Gradiente baseado em escoamento.....	34
3.2 Gradiente baseado em difusão.....	37
4 Utilização de gradientes de concentração em dispositivos microfluídicos para estudos com células.....	39
4.1 Emprego de gradiente de concentração para células animais.....	40
4.2 Emprego de gradiente de concentração para células microbianas.....	42
Referências.....	44
<b>Capítulo 3 – Dispositivos microfluídicos capazes de gerar gradiente de concentração difusivo</b> .....	<b>49</b>
1 Introdução.....	49
2 Material e Métodos.....	50
2.1 Material.....	50
2.2 Modelos de dispositivos microfluídicos.....	51
2.2.1 Dispositivo Vidro-vidro.....	52
2.2.2 Dispositivos Vidro-PDMS e Vidro-mPDMS.....	55
2.2.3 Caracterizações operacionais do dispositivo microfluídico.....	60
3 Resultados e Discussão.....	62
3.1 Construção dos dispositivos microfluídicos.....	62
3.1.1 Dispositivo Vidro-vidro.....	62
3.1.2 Dispositivo Vidro-PDMS.....	64

3.1.3 Dispositivo Vidro-mPDMS.....	66
3.2 Determinação das condições operacionais de escoamento dos dispositivos microfluídicos.....	67
3.3 Validade de gradiente de concentração difusivo na câmara de cultivo de células.....	68
4 Conclusão.....	72
Referências.....	73
<b>Capítulo 4 – Comportamento celular microbiano em gradiente de concentração difusivo .....</b>	<b>74</b>
1 Introdução.....	74
2 Material e métodos .....	75
2.1 Material.....	75
2.1.1 Inóculo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 7754 .....	75
2.1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em sistema microfluídico .....	75
2.1.3 Dispositivo Vidro-vidro .....	75
2.2 Metodologia.....	75
2.2.1 Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 7754 .....	75
2.2.2 Operação do sistema microfluídico com <i>S. cerevisiae</i> .....	76
2.2.3 Avaliação das células de <i>S. cerevisiae</i> nos dispositivos microfluídicos.....	77
2.2.4 Cultivo em batelada .....	79
2.2.5 Determinação dos parâmetros cinéticos.....	79
3 Resultados e Discussão.....	80
3.1 Comportamento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 7754 em ambiente de gradiente de concentração difusivo .....	80
3.1.1 Perfil de crescimento celular em dispositivo microfluídico com gradiente de concentração difusivo .....	81
3.1.2 Cinética de crescimento e comparação com cultivo convencional em batelada.....	83
3.1.3 Cinética de Monod na microfluídica .....	86
3.2 Análise crítica do perfil de gradiente no dispositivo microfluídico...	89
4 Conclusão.....	89
Referências.....	90
<b>Conclusões Gerais .....</b>	<b>92</b>
<b>Sugestões para trabalhos futuros.....</b>	<b>93</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>94</b>

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais que me ensinaram os valores e princípios éticos e que me incentivaram a continuar na pesquisa.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pelas oportunidades e pelas pessoas que colocou em minha vida, pelas dificuldades que me fizeram crescer e aprender.

Agradeço muito aos meus pais, Dalmo e Gilda Helena, que me deram todo o apoio e me ensinaram a ter paciência e sabedoria para enfrentar os desafios. Obrigada pelos ensinamentos e dedicação. Agradeço também a minha irmã, Janaina, que sempre esteve ao meu lado em todas as circunstâncias e, como irmã mais velha, sempre foi uma inspiração para mim.

Agradeço ao Pedro, meu namorado, que tornou os meus dias mais doces. Obrigada pelo carinho, companheirismo e por diversas vezes entender a minha ausência. Obrigada por todo o amor e cuidado que sempre teve comigo.

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Profa. Dra. Lucimara, e meu co-orientador, Prof. Dr. Reinaldo, que confiaram a mim uma tarefa ousada e inovadora. Obrigada pela oportunidade, pelas orientações e por me ajudarem a realizar esta missão.

Agradeço também à Profa. Dra. Maria Helena por ceder o espaço do laboratório para a realização dos meus trabalhos e ao técnico Gilson pela colaboração nas realizações das tarefas.

Aos pesquisadores Angelo Gobbi, Maria Helena Piazzetta e Rui Murer, do Laboratório de Microfabricação/LNNANO/CNPEM, pela construção dos dispositivos microfluídicos. Agradeço também ao Prof. Dr. José Alberto Fracassi e o aluno Richard Piffer pela ajuda na modificação química do PDMS, aos Professores Ranulfo (FEA/Unicamp) e Luiz Humberto Gomes (USP) pela doação das cepas da levedura, que tornou possível a validação dos sistemas com células.

Ao Prof. Dr. Carlos Lenz e aos técnicos, Vitor Pelegati e Mariana Baratti, do Instituto nacional de ciência de tecnologia de fotônica e biologia celular (INFABIC), IFGW/Unicamp, por tornarem possível a realização deste trabalho ao colaborar com a nossa pesquisa na validação dos sistemas microfluídicos. Obrigada por

terem me recebido no laboratório de vocês e terem colaborado com a minha pesquisa.

Agradeço também CNPQ pela bolsa de pesquisa.

Além disso, quero agradecer aos meus companheiros de trabalho do laboratório: Andréa, Paty, Amanda, Fernanda, Carol, Tiago, Micaela e André. E ainda, agradeço aos meus amigos da Biotec-UFSCar que fizeram esta etapa da minha vida mais animada e divertida com os papos 'nerds' de mestrado e os encontros dos biotecs. Sou muito feliz por vocês fazerem parte da minha vida e por estarem ao meu lado sempre que preciso.

Agradeço a todos vocês, por estarem presentes de alguma forma e por contribuírem para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada!

## Lista de Ilustrações

### Capítulo 2

- Figura 1:** Evolução das etapas de bioprocessos para os experimentos de rastreamento e avaliação das cepas: cultura de células microbianas em meio sólido; adaptação das cepas em meio líquido; seleção de micro-organismos e determinação de parâmetros cinéticos em reatores de bancada; aumento de escala. Adaptado de Hegab *et al.* (2013). ..... 27
- Figura 2:** Dispositivo microfluídico com sensores integrados para otimização em bioprocessos: (I) entradas para medir pH e OD; (II) sensor para OD; (III) tubo de fibra óptica; (IV) agitador magnético livre na câmara do dispositivo. Adaptado de Schapper *et al.* (2010). ..... 28
- Figura 3:** Dispositivo do tipo quimiostato (reator de tanque contínuo) para crescimento microbiano: a) geometria do dispositivo com seis microquimiostatos, b) estrutura do microquimiostato e a câmara circular para o crescimento celular. Adaptado de Balagaddé *et al.* (2005). ..... 28
- Figura 4:** Microbiorreator com sensores e agitador: a) representação esquemática de microbiorreator com sistemas de sensores e agitador magnético integrado ao sistema para cultivo de células de *Escherichia coli*; b) apresentação do microbiorreator. Adaptado de Zhang *et al.* (2007). ..... 29
- Figura 5:** Esquema de dispositivo microfluídico capaz de formar gradiente de concentração baseado em escoamento. As correntes miscíveis, contendo as soluções de fluo-3 e CaCl<sub>2</sub>, em correntes de entrada independentes, são injetadas em um microcanal. À medida que ocorre a mistura, os produtos da reação entre os componentes gera um complexo fluorescente, permitindo a caracterização do processo de mistura em função das velocidades de escoamento. Adaptado de Ismagilov *et al.* (2000). ..... 35
- Figura 6:** Geometria de rede de microcanais como sistema de mistura de difusão para formação de gradiente baseado em escoamento. Adaptado de Jeon *et al.* (2000). ..... 36
- Figura 7:** Dispositivo microfluídico capaz de formar gradiente baseado em difusão. Adaptado de Saadi *et al.* (2007). ..... 38
- Figura 8:** Dispositivo microfluídico com formação de gradientes de concentração: a) apresentação do dispositivo construído em dois níveis; b) nível superior para o escoamento de duas correntes de soluções e com formação de gradiente baseado em escoamento e, c) nível inferior, para gerar gradiente de concentração difusivo e avaliar o comportamento celular ao longo do tempo e em função da concentração de determinado reagente. Adaptado de Atencia *et al.* (2012). ..... 39
- Figura 9:** Microfluídica com formação de gradiente de concentração baseado em escoamento: a) sistema múltiplo de redes de microcanais, onde ocorre a diluição de solução e formação de gradiente; b) rede de microcanais e câmara de cultivo de células. Adaptado de Ye *et al.* (2007). ..... 41

**Figura 10:** Estrutura de sistema microfluídico para avaliar o comportamento de células de defesa do organismo (neutrófilos e monócitos) em resposta a uma inflamação local. Adaptado de Jones *et al.* (2012)..... 42

**Figura 11:** Dispositivo microfluídico para avaliar quimiotaxia bacteriana: a) geometria do dispositivo microfluídico circular, b) o efeito da quimiotaxia bacteriana em função da concentração de glicose. Adaptado de Atencia *et al.* (2009)..... 43

### Capítulo 3

**Figura 12:** Esquema da geometria dos dispositivos microfluídicos propostos e o escoamento de soluções do nível superior com acesso às câmaras do nível inferior: a) dispositivo Vidro-vidro, b) dispositivo Vidro-PDMS e, c) dispositivo Vidro-mPDMS. .... 52

**Figura 13:** Componentes do dispositivo modelo vidro-vidro. Nível inferior: 1) lamínula vidro lisa; 2) PDMS laminado contornando os canais. Nível superior: 3) lamínula de vidro com furos de ~0,5 mm de diâmetro, 4) PDMS laminado em canal em formato de Y e, 5) lâmina com entradas e saída. .... 54

**Figura 14:** Esquema de montagem do dispositivo microfluídico Vidro-vidro com selagem por aderência do PDMS laminado: a) lamínula de vidro lisa com PDMS laminado (nível inferior) e lamínula de vidro com furos, b) inoculação da suspensão de células dentro das câmaras de cultivo de células; c) adesão do PDMS laminado em canal na lâmina superior, d) adesão da parte superior com a inferior do dispositivo; e) dispositivo microfluídico Vidro-vidro montado..... 55

**Figura 15:** Componentes do dispositivo modelo Vidro-PDMS (mesma configuração para vidro-mPDMS): 1) lâmina de vidro com câmaras para o cultivo de células; 2) PDMS nativo em canal em formato de Y e com furos para acesso ao nível inferior e; 3) lâmina superior com entradas e saída, e conexões de material plástico para acoplar as mangueiras..... 56

**Figura 16:** Esquema de fabricação de microcanais pelo método de litografia macia. Adaptado de LIN *et al.* (2011)..... 58

**Figura 17:** Dispositivo microfluídico modelo Vidro-PDMS ou Vidro-mPDMS com selagem reversível por pressão de presilhas de metal..... 60

**Figura 18:** Esquema de operação dos dispositivos microfluídicos: duas entradas para soluções de maior e menor concentração e uma saída para coleta da solução, no nível superior..... 61

**Figura 19:** Dimensões dos microcanais do dispositivo vidro-vidro em imagem panorâmica dos microcanais feitos pelo PDMS laminado (4x~0,9 mm) encaixados com os orifícios na lamínula de vidro (~0,5 mm de diâmetro), feitos por corrosão úmida..... 63

**Figura 20:** Dispositivo microfluídico do tipo Vidro-vidro com selagem reversível por aderência do PDMS laminado. .... 63

**Figura 21:** Dimensões dos microcanais (câmaras para o cultivo de células) em vidro, feitos por corrosão úmida, mensurados pelo ImageJ: a) imagem panorâmica das câmaras em lâmina de vidro com encaixe do canal em PDMS

com orifícios de ~0,5 mm de diâmetro; b) Abertura e profundidade do microcanal em lâmina de vidro, analisados em perfilômetro Dek Tak3..... 64

**Figura 22:** Dispositivo microfluídico do tipo Vidro-PDMS vedado por pressão de presilha de metal. .... 65

**Figura 23:** Diferença de transparência entre o (1) mPDMS e o (2) PDMS nativo. A modificação química foi realizada ainda com o dispositivo contendo 4 microcanais, sendo que posteriormente foram fabricados dispositivos com 3 microcanais para análises em triplicatas..... 66

**Figura 24:** Esquema do perfil escoamento das correntes do nível superior em função da vazão: a) característica oscilatória e instável; b) característica estável das correntes..... 67

**Figura 25:** Escoamento das correntes no nível superior com vazão de 15  $\mu\text{l}/\text{min}$ , onde pode ser observado o comportamento estável das soluções, sendo usado água destilada em uma corrente e solução de Rodamina 0,1 mM na outra. .... 68

**Figura 26:** Perfil linear do gradiente ao longo do microcanal microfluídico (Vidro-vidro): a) formação do gradiente linear com rodamina B (0,1 mM) e imagem em mosaico capturada após 30 min, aumento de 20x; b) perfil linear pela intensidade de fluorescência, analisado pelo *software* ZEN Blue 2012 (Carl Zeiss AG, Germany); c) perfil de gradiente praticamente linear pela intensidade de cor no dispositivo Vidro-vidro, analisado pelo *software* ImageJ. Sendo que as oscilações se devem à sensibilidade do *software* ImageJ que detecta qualquer ponto de cinza, uma vez que a intensidade é medida na escala de cinza. .... 69

**Figura 27:** Apresentação da formação de gradiente de corante através do sentido do fluxo mássico de corante ( $N_A$ ), em dispositivo Vidro-PDMS, em função do contato com as correntes do nível superior, compostas por duas soluções desgaseificadas com concentrações de 40 e 0 g/L de glicose e escoam no sentido do eixo z. .... 71

**Figura 28:** Perfil de gradiente de intensidade de cor ao longo do microcanal: a) dispositivo Vidro-PDMS; b) dispositivo Vidro-mPDMS, mostrando tendência linear do gradiente nos microcanais inferiores..... 72

#### Capítulo 4

**Figura 29:** Esquema de operação do sistema microfluídico com injeção dos fluídos por bomba seringa, microscópio com câmera e computador com *software* para observação das imagens. .... 77

**Figura 30:** Esquema ilustrativo da câmara onde o gradiente de concentração difusivo foi gerado em dispositivo microfluídico. Nesta câmara, as células foram inoculadas e observadas o seu crescimento ao longo do tempo. Para efetuar esta contagem, a câmara foi subdividida em compartimentos de 0,5 mm de comprimento, para concentração de glicose variando entre 0 e 40 g/L , compondo 6 microcâmaras. Enquanto que para o gradiente variando entre 0 e 3 g/L de glicose, 11 microcâmaras de 0,25 mm foram geradas (pequeno deslocamento de encaixe na composição do microcanal). .... 78

**Figura 31:** Imagem do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 ao longo do microcanal e do tempo: células com fluorescência FUN 1 a 20  $\mu\text{M}$ , experimento teste com gradiente de 40 a 0 g/L de glicose, nos tempos 0 e 1 h, com concentração inicial de  $1,02 \times 10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$ ..... 81

**Figura 32:** Cultivo em microcanal microfluídico: a) perfis de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 ao longo do microcanal (posição) e do tempo ( $N_0 \sim 0,5 \times 10^2 \text{ cel}/\mu\text{L}$ ), as barras de erros representam o erro padrão das triplicatas e b) diagrama esquemático da microcanal e as subdivisões de contagem de células (microcâmaras de 0,5 mm)..... 82

**Figura 33:** Curvas de crescimento da *S. cerevisiae* ATCC 7754 em: a) dispositivo microfluídico, sendo observado o perfil de crescimento em câmara com gradiente linear de concentração de glicose, variando de 40 a 0 g/L e b) cultivo convencional em batelada: sendo observado o crescimento em meio YPD com concentrações de 10, 20, 30 e 40 g/L e meio YPD sem glicose, apenas como controle, cujo LN ( $N/N_0$ ) manteve-se próximo a 0,5. Em ambos os sistemas,  $N_0 \sim 0,5 \times 10^2 \text{ cel}/\mu\text{L}$  e as barras de erros representam o erro padrão de triplicatas independentes..... 84

**Figura 34:** Dados experimentais (■) e modelo (linha contínua), obtida a partir de ajuste dos mínimos quadrados). Parâmetros cinéticos estimados para a cinética de crescimento celular para *S. cerevisiae*, descrito por Monod. Através deste gráfico obteve-se os valores para  $\mu_{\text{máx}} = 0,32 \pm 0,014 \text{ h}^{-1}$  e  $K_s = 0,27 \pm 0,045 \text{ g/L}$ . As barras de erro para os dados experimentais indicam o erro padrão das triplicatas ( $N_0 = 64 \text{ cel}/\mu\text{L}$ ). ..... 87

## Anexo 1

**Figura 35:** Curva de calibração da contagem de células (por câmara de Neubauer) por leitura de absorvância (600 nm) e os barras de erros representam o erro padrão das triplicatas, das contagens e das leituras de absorvância. .... 94

## Lista de Tabelas

### Capítulo 3

**Tabela 1:** Resumo dos três modelos de dispositivos microfluídicos propostos:..... 51

**Tabela 2:** Etapas de preparação da corrosão úmida ..... 53

**Tabela 3:** Descrição do processo de construção do molde negativo por fotolitografia..... 57

**Tabela 4:** Etapas do processo de modificação química do PDMS por reação com divinil éter com polietilenoglicol (DEV-PEG). ..... 59

### Capítulo 4

**Tabela 5:** Distância do microcanal (mm) e seus respectivos perfis de gradiente de glicose (g/L) no intervalo de 0 a 40 g/L de glicose..... 78

**Tabela 6:** Distância do microcanal (mm) e as subdivisões em microcâmaras de 0,25 mm para o gradiente de 0 a 3 g/L de glicose. .... 79

**Tabela 7:** Comparação entre a velocidade específica de crescimento da *S. cerevisiae* ATCC 7754 em sistema microfluídico com gradiente de concentração e fermentação batelada..... 85

**Tabela 8:** Valores de  $k_s$  e  $\mu_{m\acute{a}x}$  em sistemas de fermentação convencional e sistema microfluídico. .... 87

### Anexo 1

**Tabela 9:** Curva de calibração do número de células por leitura de absorvância (600 nm) ..... 94

## Lista de abreviaturas e siglas

$\mu$	velocidade específica de crescimento
$\mu_{\text{máx}}$	velocidade específica de crescimento máxima
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
DEV-PEG	divinil éter com polietilenoglicol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GFP	<i>Green Fluorescence Protein</i>
HF	Ácido fluorídrico
HL60	Células humana de leucemia promielocítica
$k_s$	Constante de Monod
MIC	Concentração mínima inibitória
mPDMS	Poli dimetilsiloxano modificado quimicamente
N	Número de células por volume
$N_0$	Número inicial de células por volume
$N_A$	Fluxo total
OD	Oxigênio dissolvido
PBS	Solução fosfato salino
PDMS	Poli dimetilsiloxano
PMMA	Poli dimetil metacrilado
RNA	Ácido ribonucleico
YPD	<i>Yeast-Peptone-Dextrose</i>
YPDA	<i>Yeast-Peptone-Dextrose Agar</i>

### 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, diferentes áreas de pesquisa buscam por tecnologias inovadoras e que sejam aliadas à alta produtividade com menores custos e tempo operacional. Nesta busca, a microfluídica é a ciência que aplica esses princípios e amplia as alternativas de estudos em diversos campos de pesquisas. Na biotecnologia, a microfluídica está sendo aplicada em diversas áreas, em que o desenvolvimento de sistemas pode contribuir para determinação de condições ideais para uma reação e otimização de bioprocessos, sendo uma das grandes promessas de microtecnologia.

A microfluídica utiliza um pequeno volume de amostras e reagentes ( $10^{-6}$  a  $10^{-12}$  L) que escoam por canais em escala micrométrica. Desta forma, os processos de transferência de massa e calor são rápidos, as reações ocorrem em regime de escoamento laminar e por isso simulam o microambiente celular. Tais características permitem o controle e manipulação das moléculas no espaço e no tempo de forma precisa, o que viabiliza estudos com células, manipulando-as em diferentes situações num ambiente controlado (WHITESIDES, 2006; RAHMAN *et al.*, 2009; SCHÄPPER *et al.*, 2009)

A microfluídica originou-se de outras ciências que buscavam novas técnicas com resultados rápidos e confiáveis. A analítica foi a área mais influente, quando Manz *et al.* (1990) apresentou a microfluídica para otimizar os métodos analíticos, usando o termo *micro-total-analytical systems* ( $\mu$ TAS), também conhecido por *Lab on a chip*. Enquanto que a microeletrônica colaborou para a construção dos dispositivos microfluídicos com a técnica de fotolitografia, uma técnica já consolidada na fabricação dos sistemas microeletrônicos em base de silício (WHITESIDES, 2006).

Posteriormente, outros suportes e métodos de construção foram testados. As técnicas de microfabricação impulsionaram a produção de dispositivos microfluídicos em diversas geometrias e tipos de materiais, configurados de

acordo com a finalidade de cada pesquisa (MCDONALD & WHITESIDES, 2002). A configuração de um dispositivo pode permitir, por exemplo, a separação e manipulação de amostras, a geração de gradientes de concentrações e com isso avaliar, inclusive, o comportamento celular frente ao gradiente de determinada substância (RAHMAN *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2010).

A microfluídica amplia ainda mais as possibilidades de estudos celulares, uma vez que mimetiza o microambiente celular e a geração de gradiente permite avaliar as células em diversas condições, principalmente células animais. Com isso, microfluídica tem sido usada para monitorar o comportamento dinâmico das células, os mecanismos de respostas, desenvolvimento de novas técnicas de isolamento e cultivo de células microbianas (WEIBEL *et al.*, 2007).

Nestes estudos são usados dispositivos microfluídicos com o objetivo de fornecer um ambiente promissor para cultivo celular, como os microbiorreatores que atuam como biorreatores convencionais (EDLICH *et al.*, 2010). Tais dispositivos podem avaliar o comportamento biológico e a cinética das reações em tempo real por meio de sistemas de sensores, reduzindo o tempo de ensaios (ZHANG *et al.*, 2007). Ainda, simulam operações em macro escala, permitindo a otimização de processos com maior eficácia *in vitro* do que as técnicas tradicionais (SOMMER *et al.*, 2008).

Sendo assim, a microfluídica mostra-se uma ferramenta importante para diversas pesquisas em biotecnologia, com destaque para bioprocessos. Além disso, os dispositivos microfluídicos possuem capacidade de formação de gradientes de concentração que contribui para os estudos em microbiologia industrial, avaliando o comportamento celular frente a diferentes concentrações de substrato.

Desta forma, este trabalho visa o emprego da microfluídica para realizar análises de etapas iniciais em bioprocessos com resultados mais rápidos do que as técnicas atuais. No entanto, o estudo de células microbianas em dispositivos microfluídicos ainda está nos primeiros estágios de desenvolvimento e esforços são necessários para o estabelecimento de novas estratégias que possam contribuir nas etapas de desenvolvimento destes processos.

## 2 OBJETIVOS

A proposta deste trabalho consistiu em projetar, construir e desenvolver dispositivos microfluídicos capazes de gerar gradiente de concentração difusivo e investigar a aplicabilidade desta tecnologia em bioprocessos.

A prova de conceito consistiu em avaliar o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 em um ambiente contendo um gradiente de concentração difusivo, sendo usado a glicose como substrato limitante, no sistema microfluídico e em condição anaeróbia. Este crescimento celular foi também comparado com cultivo convencional em batelada, tendo as mesmas condições usadas na microfluídica.

Para alcançar estes objetivos, as seguintes etapas de pesquisa foram estabelecidas:

Projetar diferentes dispositivos microfluídicos: estruturá-los de forma a induzir a formação de gradiente de concentração difusivo e definir os materiais que sejam aplicáveis ao estudo com células microbianas em condição anaeróbia.

Construir, montar os dispositivos e determinar as condições operacionais: construir os dispositivos, estabelecer as faixas operacionais de concentração de glicose e as vazões para geração de gradiente de concentração difusivo estável.

Operação do sistema microfluídico com *Saccharomyces cerevisiae*: a partir dos dispositivos criados, escolher o dispositivo que apresentou melhores propriedades em termos de geração de gradiente de concentração, observar e quantificar o crescimento celular neste ambiente (variando a concentração do substrato limitante, a glicose). A partir das curvas de crescimento, comparar os dados cinéticos obtidos por sistema microfluídico com o cultivo convencional em batelada.

### 3 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO EM CAPÍTULOS

Os resultados dos objetivos da presente dissertação estão organizados em capítulos, a fim de apresentar didaticamente a constituição deste trabalho.

O capítulo 2 abordará o estado da arte da microfluídica baseado em gradiente de concentração e as diversas aplicações em biotecnologia.

O capítulo 3 mostrará os modelos de dispositivos microfluídicos que foram desenvolvidos e as etapas de construção destes sistemas, além da validação do gradiente de concentração linear.

Já o capítulo 4 apresentará a utilização de um dos dispositivos propostos, para avaliar o comportamento da *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 num gradiente de glicose e verificar se os parâmetros cinéticos obtidos na microfluídica são semelhantes ao processo de cultivo convencional.

Por fim, serão relatadas as conclusões gerais deste trabalho e as sugestões para trabalhos futuros usando estes modelos de sistemas microfluídicos.

### REFERÊNCIAS

EDLICH, A.; MAGDANZ, V.; RASCH, D.; DEMMING, S.; ALIASGHAR ZADEH, S.; SEGURA, R.; KÄHLER, C.; RADESPIEL, R.; BÜTTGENBACH, S.; FRANCO-LARA, E. Microfluidic reactor for continuous cultivation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology progress**, v. 26, n. 5, p. 1259-1270, 2010. ISSN 1520-6033.

KIM, S.; KIM, H. J.; JEON, N. L. Biological applications of microfluidic gradient devices. **Integrative Biology**, v. 2, n. 11-12, p. 584-603, 2010.

MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing. **Sensors and actuators B: Chemical**, v. 1, n. 1, p. 244-248, 1990. ISSN 0925-4005.

MCDONALD, J. C.; WHITESIDES, G. M. Poly (dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. **Accounts of chemical research**, v. 35, n. 7, p. 491-499, 2002. ISSN 0001-4842.

RAHMAN, P. K.; PASIRAYI, G.; AUGER, V.; ALI, Z. Development of a simple and low cost microbioreactor for high-throughput bioprocessing. **Biotechnology letters**, v. 31, n. 2, p. 209-214, 2009. ISSN 0141-5492.

SCHÄPPER, D.; ALAM, M. N. H. Z.; SZITA, N.; LANTZ, A. E.; GERNAEY, K. V. Application of microbioreactors in fermentation process development: a review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 395, n. 3, p. 679-695, 2009. ISSN 1618-2642.

SOMMER, G. J.; CHANG, D. S.; JAIN, A.; LANGELIER, S. M.; PARK, J.; RHEE, M.; WANG, F.; ZEITOUN, R. I.; BURNS, M. A. Introduction to microfluidics. In: TIAN, W.-C. & FINEHOUT, E. (Ed.). **Microfluidics for biological applications**. New York: Springer Science, 2008. cap. 1, p.1-34.

WEIBEL, D. B.; DILUZIO, W. R.; WHITESIDES, G. M. Microfabrication meets microbiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 209-218, 2007. ISSN 1740-1526.

WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368-373, 2006. ISSN 0028-0836.

ZHANG, Z.; PEROZZIELLO, G.; BOCCAZZI, P.; SINSKEY, A. J.; GESCHKE, O.; JENSEN, K. F. Microbioreactors for bioprocess development. **Journal of the Association for Laboratory Automation**, v. 12, n. 3, p. 143-151, 2007. ISSN 2211-0682.

### 1 MICROFLUÍDICA: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES EM BIOTECNOLOGIA

Microfluídica trata-se de uma área inovadora e aplicada a diversas ciências com o intuito de avançar as tecnologias existentes. A funcionalidade dos dispositivos microfluídicos tem atraído o interesse entre os pesquisadores de diversas áreas (BARRY & IVANOV, 2004; WHITESIDES, 2006), que variam desde o desenvolvimento de técnicas analíticas (*Lab on a chip*) ao conhecimento de reações complexas numa escala micrométrica (SOMMER *et al.*, 2008).

A microfluídica opera com pequenas quantidades de fluidos dentro de microcanais, tendo geometrias que influenciam na dinâmica dos fluidos (BEEBE *et al.*, 2002). Além disso, o comportamento dos fluidos se deve à interação entre os diversos fenômenos físicos: difusão, convecção, forças interfaciais, capilaridade e viscosidade; e também as forças de superfície, relacionadas às características de serem hidrofóbicas ou hidrofílicas. Tais conceitos físicos são importantes ao estabelecer o objetivo de cada pesquisa (SQUIRES & QUAKE, 2005).

Existem números adimensionais que caracterizam o comportamento dos fluidos, sendo usados na microfluídica, principalmente, o número de Reynolds (Re), que determina o limite entre o regime laminar e turbulento, e o número de Péclet (Pe) que é utilizado para definir a dinâmica do processo de mistura, sendo definido pela razão entre a convecção e a difusão. Esses, dentre outros número adimensionais, são utilizados na avaliação do escoamento de fluidos dentro de microcanais (BEEBE *et al.*, 2002; SQUIRES & QUAKE, 2005).

No ambiente microfluídico as reações são rápidas e precisas, devido ao pequeno tamanho da seção transversal e ao escoamento em regime laminar, uma vez que possui um baixo número de Reynolds ( $Re < 100$ ) e o processo de transporte de massa que ocorre principalmente pela difusão (SQUIRES & QUAKE, 2005). Por isso, é possível a manipulação de moléculas no tempo e no espaço de forma a proporcionar condições estáticas e dinâmicas para investigar reações e

interações entre as células como ocorrem num sistema *in vivo* ou em condições adversas (WHITESIDES, 2006; TAVANA *et al.*, 2008). Isso aponta a relevância da microfluídica em estudos biotecnológicos, por simular um sistema *in vivo* (TAVANA *et al.*, 2008).

## 1.1 Aplicações em biotecnologia

A microfluídica apresenta diversas vantagens para aplicações biotecnológicas. Nesta área, o maior impulso da microfluídica está direcionado às pesquisas em genômica, proteômica e metabolômica, pois o alto custo de equipamentos para processamento e análises de DNA e RNA torna a microfluídica uma alternativa viável, devido à confiabilidade e rapidez dos resultados (WHITESIDES, 2006; FREDLAKE *et al.*, 2008).

Dentre outras aplicações, as pesquisas visam também monitorar o desenvolvimento de células animais em situações ideais (CIMETTA *et al.*, 2013), sequenciar o DNA em eletroforese microchip e realizar análises de expressão gênica, com um desempenho maior do que as técnicas convencionais (FREDLAKE *et al.*, 2008), bem como, avaliar o comportamento de novos fármacos em células animais (YE *et al.*, 2007). Além do desenvolvimento de processos, como na construção de sistemas não virais para terapia gênica (BALBINO *et al.*, 2013).

Outra área em que a microfluídica mostra-se promissora na biotecnologia é na microbiologia industrial. O interesse em estudá-la por meio da microfluídica tem crescido nos últimos anos, devido aos diversos campos de pesquisa que podem ser beneficiados por esta ferramenta (WEIBEL *et al.*, 2007), incluindo: a imobilização de células e avaliação de processos de biocatálise (STOJKOVIČ & ŽNIDARŠIČ-PLAZL, 2012); dispositivos para investigar a produção de metabólitos secundários (RAHMAN *et al.*, 2009) e sistemas que permitem o crescimento celular com análises de densidade celular de bactéria, fungos e algas em dispositivos com sensores integrados (AU *et al.*, 2011).

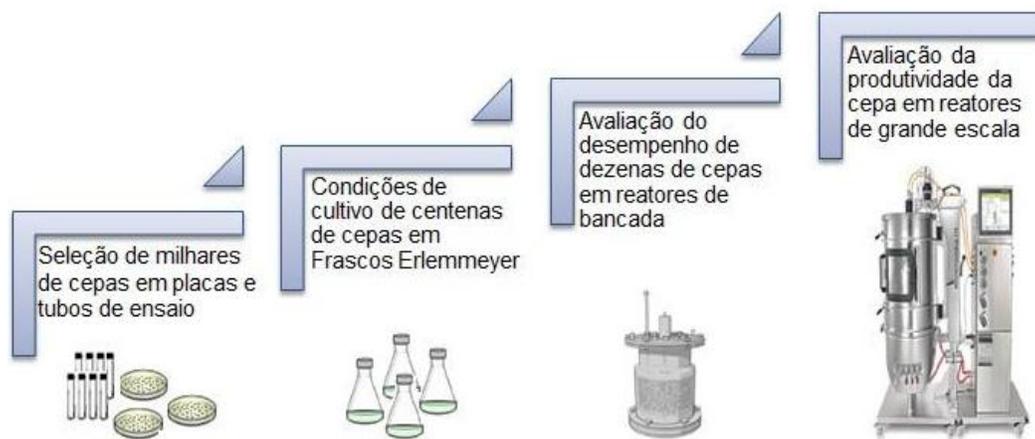
Em bioprocessos, a microfluídica tem sido usada também para monitorar o crescimento celular e inovar as técnicas de cultivo, realizar análises dinâmicas das populações e morfologia das células microbianas a fim de aumentar a produtividade em bioprocessos. É ainda investigar como ocorrem as respostas celulares no seu microambiente em menor tempo de ensaio (SOMMER *et al.*, 2008; STOJKOVIČ & ŽNIDARŠIČ-PLAZL, 2012).

## 1.2 Avanços em bioprocessos através da microfluídica

Os bioprocessos consistem na obtenção de produtos a partir de reações bioquímicas onde estão envolvidas enzimas e/ou células microbianas, tratando-se de etapas essenciais nos processos industriais. Os micro-organismos são os principais responsáveis pelo processo de biocatálise para a biotransformação de metabólitos primários, como aminoácidos, vitaminas e etanol, e os secundários, como os antibióticos (DORAN, 1995). Devido a sua alta aplicabilidade industrial, a biotecnologia busca o alto rendimento e produtividade dos processos por meio de rastreamento, seleção e otimização das condições para as cepas microbianas (HEGAB *et al.*, 2013).

Em escala industrial, os micro-organismos são cultivados em biorreatores com volumes que chegam a milhares de litros. Entretanto, as condições ideais para o crescimento microbiano e/ou formação de produtos são determinados em menor escala laboratorial e piloto. Sendo assim, o processo inicial de estudo dos processos fermentativos se dá por meio de pesquisas que demandam de grandes quantidades de amostras, análises químicas e tempo (KUMAR *et al.*, 2004). Além disso, tais ensaios de investigação para bioprocessos levam à produção de resíduos, pois as etapas são escalonadas desde tubos de ensaios, passando por Frascos Erlenmeyer de volumes que variam entre 25 mL a 5 L e biorreatores de bancada com volumes de 1 a 30 L (Figura 1). Ainda, os ensaios estão sujeitos a diversos interferentes, possíveis contaminações cruzadas, demandam de maior quantidade de energia devido ao tamanho dos equipamentos envolvidos e não

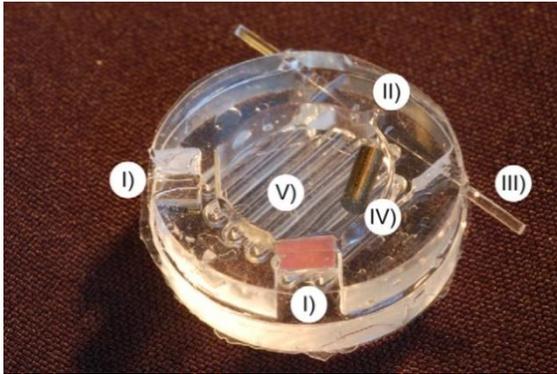
são passíveis de realização de ensaios em paralelo (KUMAR *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2007; AU *et al.*, 2011; HEGAB *et al.*, 2013).



**Figura 1:** Evolução das etapas de bioprocessos para os experimentos de rastreamento e avaliação das cepas: cultura de células microbianas em meio sólido; adaptação das cepas em meio líquido; seleção de micro-organismos e determinação de parâmetros cinéticos em reatores de bancada; aumento de escala. Adaptado de Hegab *et al.* (2013).

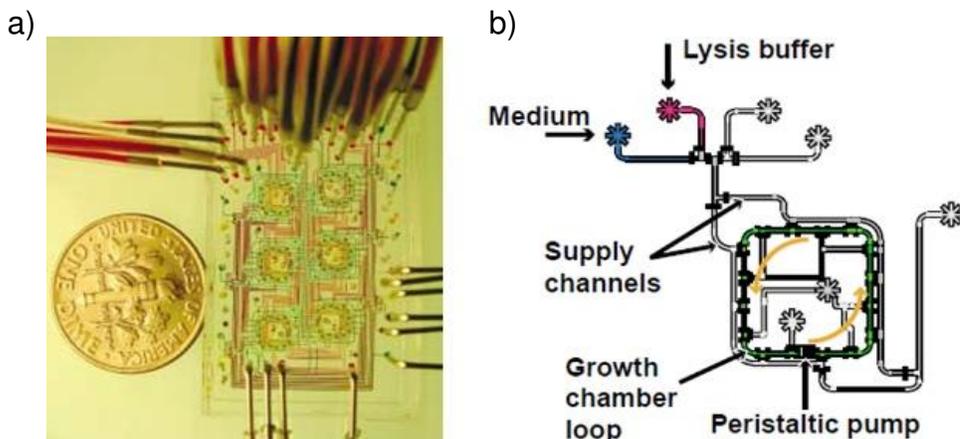
Diante disso, existe a necessidade de desenvolver sistemas que sejam precisamente controlados e que acelerem as etapas de investigação dos bioprocessos. Nesse sentido, a microfluídica possui o potencial para tal otimização, pois a biossíntese é rápida e eficaz, tendo as condições similares aos processos industriais, permitindo a avaliação paralela dos experimentos. Além disso, os microbiorreatores possibilitam a análise em tempo real, quando integrados com sistemas de sensores (EL-ALI *et al.*, 2006; RAHMAN *et al.*, 2009; SCHÄPPER *et al.*, 2009)

A contribuição da microfluídica para bioprocessos foi demonstrada por Schäpper *et al.* (2010). Para isso, foi proposto um dispositivo microfluídico circular com sistemas sensores para o cultivo de células em suspensão, tanto no modo contínuo como em batelada. A fim de avaliar o dispositivo para bioprocessos utilizaram células de *Saccharomyces cerevisiae*, onde mostraram que a partir de microbiorreatores pode-se determinar a faixa de pH, temperatura, aeração, oxigênio dissolvido (OD) e a perda de água ao longo do tempo (Figura 2).



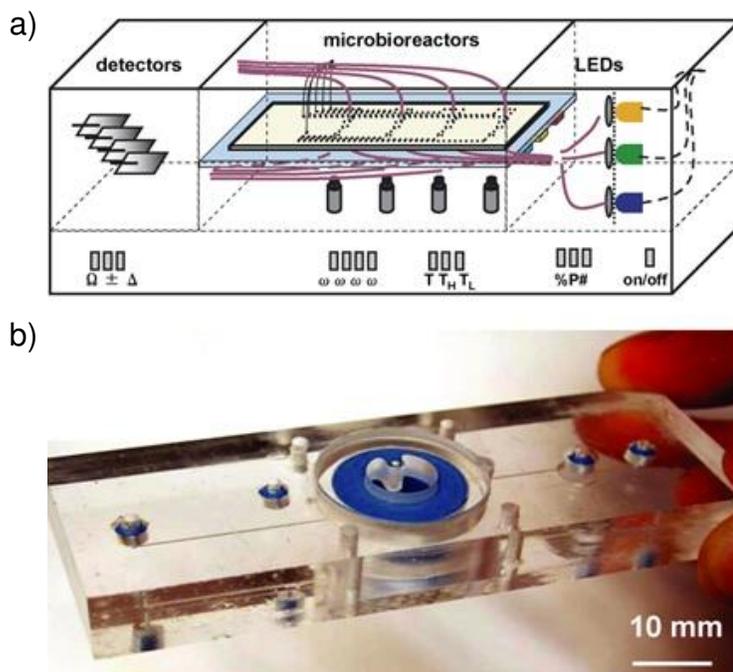
**Figura 2:** Dispositivo microfluídico com sensores integrados para otimização em bioprocessos: (I) entradas para medir pH e OD; (II) sensor para OD; (III) tubo de fibra óptica; (IV) agitador magnético livre na câmara do dispositivo. Adaptado de Schapper *et al.* (2010).

Já no trabalho de Balagaddé *et al.* (2005) um microbiorreator foi usado para monitorar o crescimento e comportamento de células de *Escherichia coli*, por longo período de tempo, utilizando uma pequena população celular. Tal sistema viabiliza as análises de densidade celular e as alterações morfológicas durante o processo de reação. Enquanto que em biorreatores, a alta demanda de reagentes e a população densa de bactérias torna inviável o estudo de comportamento celular nesta escala (Figura 3).



**Figura 3:** Dispositivo do tipo quimiostato (reator de tanque contínuo) para crescimento microbiano: a) geometria do dispositivo com seis microquimiostatos, b) estrutura do microquimiostato e a câmara circular para o crescimento celular. Adaptado de Balagaddé *et al.* (2005).

Além dos sistemas de sensores, os microbiorreatores podem ser integrados com sistema de agitação. No trabalho de Zhang *et al.* (2007) o microbiorreator utilizado possui, além de sensores para detecção de pH, densidade e oxigênio dissolvido, um agitador magnético em miniatura. Desta forma, o microbiorreator apresenta uma relação bem definida com os biorreatores, o que permitiu correlacionar os resultados obtidos nas mesmas condições operacionais. Este microbiorreator foi testado com células de *Escherichia coli* (Figura 4).



**Figura 4:** Microbiorreator com sensores e agitador: a) representação esquemática de microbiorreator com sistemas de sensores e agitador magnético integrado ao sistema para cultivo de células de *Escherichia coli*; b) apresentação do microbiorreator. Adaptado de Zhang *et al.* (2007).

Com isso, a microfluídica vem contribuindo para a investigação das reações em bioprocessos. No entanto, ainda há poucos trabalhos utilizando esta tecnologia para selecionar cepas, fontes de nutrientes, determinar parâmetros cinéticos, bem como as condições de temperatura e pH, que são fatores que podem aumentar a produtividade de bioprocessos. Além de reduzir o trabalho intenso em laboratório e os erros inerentes às etapas de manipulação, a diversidade vista em geometrias

de dispositivos microfluídicos pode contribuir com novas estratégias de estudos em processos biotecnológicos (SCHÄPPER *et al.*, 2010; HEGAB *et al.*, 2013).

Diante disso, nota-se que a variedade em geometrias e a inserção de componentes dos sistemas microfluídicos, tais como técnicas de misturas, bombeamento, estratégias que permitem a manipulação de amostras e geração de gradientes são propriedades que ampliam as possibilidades de estudos com as células em microfluídica (WEIBEL & WHITESIDES, 2006). Assim como as técnicas de construção e os materiais utilizados nos dispositivos que podem contribuir para o avanço de estudos biológicos a um nível de microescala.

## **2 CONSTRUÇÃO E MATERIAIS DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS**

As técnicas em microfabricação tem avançado cada vez mais as possibilidades de configurações de dispositivos microfluídicos, que são definidos de acordo com o objetivo de cada pesquisa, de forma a contribuir com os estudos biotecnológicos na microfluídica (SOMMER *et al.*, 2008).

Os dispositivos microfluídicos são construídos, na maioria das vezes, a partir de uma placa de vidro, bolacha de silício, polímeros como o poli dimetilsiloxano (PDMS) e poli metilmetacrilato (PMMA) (SATO & KITAMORI, 2010). O método mais usado para obter a geometria dos microcanais é a fotolitografia, que consiste na transferência da imagem de uma máscara para uma bolacha de silício através da incidência de luz (MCDONALD & WHITESIDES, 2002).

Os primeiros dispositivos microfluídicos foram construídos em suporte de silício, como usado nas técnicas de fabricação em microeletrônica. Mas por ser um material caro e opaco à luz visível e ultravioleta, logo foi substituído pelo vidro que é transparente e também se liga facilmente a outros materiais (SOMMER *et al.*, 2008). Porém, devido à impermeabilidade aos gases e a rigidez para inserção de componentes de microanálises, que inviabilizam alguns ensaios, foram empregados os polímeros elastoméricos que se comportam como um sólido

elástico, mantém a sua estrutura moldada após a cura e permite as trocas gasosas (WHITESIDES, 2006; SOMMER *et al.*, 2008).

A composição dos dispositivos microfluídicos é determinada em função das necessidades de cada aplicação, dependendo das características e da biocompatibilidade do material utilizado. Ainda, a metodologia de construção dos microcanais é aplicada de acordo com o material empregado que, em geral, são baseados na técnica de fotolitografia.

Os dispositivos microfluídicos construídos em placas de vidros são adequados para várias aplicações, devido à estabilidade química e física, a biocompatibilidade e por se tratar de um material transparente, hidrofílico e impermeável aos gases. Tais características são importantes para estudos biológicos que necessitam de condições anaeróbias e mobilidade de partículas, devido à propriedade hidrofílica do vidro e as células não se aderirem pela característica de hidrofobicidade celular (SATO & KITAMORI, 2010; NGE *et al.*, 2013).

Em geral, os microcanais de dispositivos em vidro são construídos pela técnica de fotolitografia por corrosão úmida. Esta técnica consiste no processo de fotolitografia em vidro e depois, este é submetido à corrosão com solução de ácido fluorídrico (HF) e a profundidade do canal é determinada pelo tempo de contato com o ácido. A finalização do dispositivo é feita por colagem (soldagem térmica ou através do emprego de resinas) de duas placas vidros, constituindo as microestruturas (STJERNSTRÖM & ROERADE, 1998; GROVER *et al.*, 2003; SATO & KITAMORI, 2010). Além desta técnica, atualmente, a fabricação dos microcanais em vidros pode ser feita também por ablação usando sistemas de laser de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (FU *et al.*, 2013).

Entre os polímeros, o PDMS é o mais utilizado e apresenta as seguintes características: estabilidade térmica e flexibilidade, aderência reversível a outras superfícies, biocompatibilidade com fluidos biológicos, hidrofóbico, atóxico, durável e a permeabilidade gasosa já é conhecida, sendo o coeficiente de difusão de oxigênio de  $41 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s e para o dióxido de carbono,  $26 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s, sendo os coeficientes de difusão obtidos a 308 K (CHARATI & STERN, 1998). Estas

características permitem a aplicação deste polímero em sistemas de cultivo celular em ambiente microfluídico e de baixo custo para a fabricação (MCDONALD & WHITESIDES, 2002; SIA & WHITESIDES, 2003).

Embora seja altamente aplicável à microfluídica, o PDMS possui característica hidrofóbica e é capaz de adsorver pequenas moléculas hidrofóbicas em sua superfície, o que afeta, por exemplo, a cinética da reação e o resultado final de um processo biológico (SIA & WHITESIDES, 2003). Por isso, estratégias que envolvem combinação de polímeros e poli (etileno glicol) em multicamadas absorvidos ao PDMS (SCHMOLKE *et al.*, 2010) e o uso de tensoativo no meio de cultivo celular (AU *et al.*, 2011) são usadas para reduzir a aderência de células animais e microbianas e proteínas às superfícies hidrofóbicas.

Outra possível desvantagem do PDMS é a permeabilidade gasosa, fazendo com que a taxa de transferência de oxigênio possa ser um empecilho para o cultivo de células anaeróbias (WALKER *et al.*, 2002; MEHTA *et al.*, 2007). Neste caso, é possível adaptar os dispositivos, utilizando uma base de vidro para impedir a permeabilidade de gases (ATENCIA *et al.*, 2012) ou revestir o dispositivo de PDMS com outro polímero, como o parileno C (polímero com propriedades de barreiras), para aumentar a resistência à transferência de oxigênio (MEHTA *et al.*, 2007). No entanto, o PDMS é aplicável a diferentes dispositivos por permitir manipulações na sua estrutura química.

Esta versatilidade dos dispositivos permite além de estratégias geométricas, a integração de componentes que podem empregar sensores para controlar faixas de pH (BUCHENAUER *et al.*, 2009), misturadores de soluções dentro dos sistemas (AU *et al.*, 2011) e geometrias que podem formar e intensificar a convecção com soluções viscosas (XIA *et al.*, 2010) ou formação de gradientes de concentração (ATENCIA *et al.*, 2012) dentro dos microcanais.

A composição e estrutura dos dispositivos microfluídicos são determinantes inclusive para aperfeiçoar processos em grande escala, pois a tecnologia em microescala atua como uma ferramenta para analisar precisamente os fatores importantes de uma reação.

### 3 DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS COM FORMAÇÃO DE GRADIENTES DE CONCENTRAÇÃO

As geometrias dos sistemas microfluídicos são variadas de acordo com as aplicações. Recentemente, uma estratégia que vem sendo investigada é a utilização de dispositivos capazes de gerar gradientes de concentração para observar o comportamento de células animais ou microbianas (KIM *et al.*, 2010). Como exemplo, identificar a faixa crítica em que ocorre a toxicidade de uma célula, quando esta é submetida a variações de concentrações conhecidas de determinado reagente tóxico (ATENCIA *et al.*, 2012).

A importância de estudar as respostas celulares em modo dinâmico e complexo como acontece no sistema *in vivo* foi apresentada no estudo de Cimetta *et al.* (2013). Estes autores utilizaram dispositivo microfluídico com formação de gradiente de concentração para analisar o comportamento de corpos embrióides, obtidos a partir de embriões humanos e células tronco pluripotentes induzidas, submetidos em diferentes concentrações de fatores moleculares a fim de entender o desenvolvimento de tecidos.

Existem também estudos que visam interpretar os sinais bioquímicos das células quando submetidas a ambientes com concentrações de determinado reagente que varie no espaço e no tempo. No entanto, o sucesso destas aplicações depende da construção de dispositivos microfluídicos capazes de gerar gradientes de concentração estáveis e similares ao que ocorre em sistemas *in vivo* (SCHÄPPER *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2010).

Sob o ponto de vista de projeto de sistemas microfluídicos, diversas estratégias são reportadas na literatura com geometrias capazes de formar gradientes de concentração. Os tipos de gradientes podem ser divididos em duas categorias:

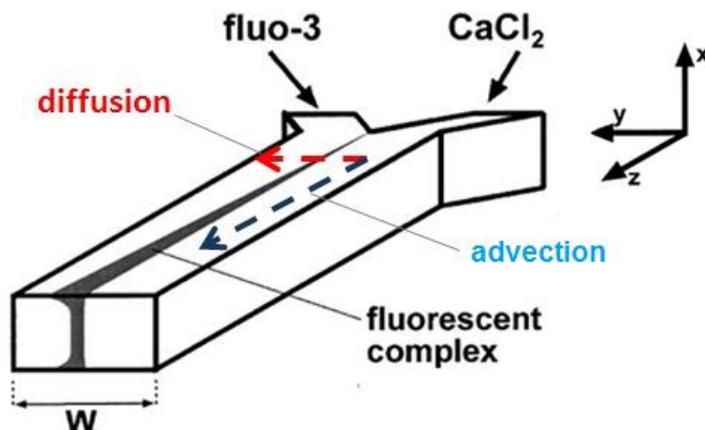
(i) Gradiente baseado em escoamento: em que a formação do gradiente ocorre por meio da contribuição convectiva (ou advecção), pela própria presença do escoamento laminar e,

(ii) Gradiente baseado em difusão: o qual depende do transporte de moléculas apenas por difusão molecular, sem a presença de escoamentos.

A principal diferença entre estas duas categorias é a presença direta do escoamento na região onde o gradiente de concentração é formado (KIM *et al.*, 2010).

### 3.1 Gradiente baseado em escoamento

No sistema de gradiente baseado em escoamento, a formação de gradientes de concentração é gerada a partir do contato de duas correntes independentes que possuem concentrações diferentes de um determinado soluto. O baixo número de Reynolds e a configuração dos microcanais, principalmente em formato de Y ou T, permitem a justaposição destas duas correntes, iniciando um processo de mistura. Neste processo, a difusão molecular predomina em sentido transversal ao escoamento e gera um gradiente de concentração perpendicular à direção do fluxo (ISMAGILOV *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2010) (Figura 5). O escoamento imposto também contribui para a mistura das correntes, através da convecção (ou advecção).



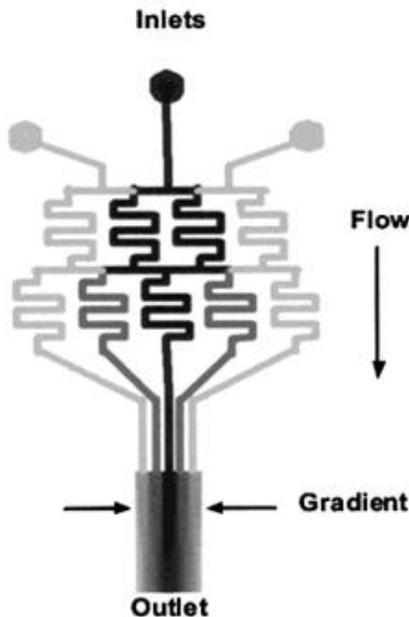
**Figura 5:** Esquema de dispositivo microfluídico capaz de formar gradiente de concentração baseado em escoamento. As correntes miscíveis, contendo as soluções de fluo-3 e  $\text{CaCl}_2$ , em correntes de entrada independentes, são injetadas em um microcanal. À medida que ocorre a mistura, os produtos da reação entre os componentes gera um complexo fluorescente, permitindo a caracterização do processo de mistura em função das velocidades de escoamento. Adaptado de Ismagilov *et al.* (2000).

Ismagilov *et al.* (2000) utilizaram um dispositivo microfluídico em formato de Y (com duas entradas) e injetaram duas soluções diferentes, fluo-3 e  $\text{CaCl}_2$ , para mostrar esse processo de mistura. Quando as soluções entraram em contato, reagiram e formaram um complexo fluorescente (Figura 5) e assim, se pôde avaliar a influência da velocidade média de escoamento no processo de mistura. Neste caso, quando o sistema opera em regime permanente, foi observado que o tamanho da região de mistura (identificada pela fluorescência) reduz conforme se aumenta a velocidade de escoamento (Figura 5).

Considerando a presença de perfis de velocidade parabólicos, pela própria característica de escoamento laminar, a distribuição dos reagentes em uma determinada seção transversal do microcanal é função da velocidade do escoamento (CHEN & LAM, 2004). Desta forma, para que haja gradiente de concentração uniforme é necessário um sistema de mistura bem definido (KIM *et al.*, 2010), como as redes de microcanais. Tal sistema consiste na divisão das correntes, mistura e recombinação das correntes de soluções para formar o

gradiente de concentração com distribuição homogênea (JEON *et al.*, 2000; DHUMPA & ROPER, 2012) (Figura 6).

O trabalho de Jeon *et al.* (2000) apresenta um dispositivo microfluídico com sistema de mistura por rede de microcanais. O dispositivo é composto por três entradas, onde são inseridas diferentes concentrações de soluções que percorrem o sistema de redes e os fluxos são divididos e misturados. Ao final do sistema de rede, cada canal possui diferentes proporções das soluções inseridas, as quais são reunidas num único canal que gera o gradiente de concentração baseado no escoamento com distribuição homogênea das concentrações (Figura 6).



**Figura 6:** Geometria de rede de microcanais como sistema de mistura de difusão para formação de gradiente baseado em escoamento. Adaptado de Jeon *et al.* (2000).

Além destes dispositivos (Figura 6) misturarem homogêneas as soluções em cada corrente de escoamento e controlarem os gradientes de concentração, as estruturas em redes de microcanais viabilizam as pesquisas de quimiotaxia, que se refere à migração celular em função das modificações químicas ocorridas no microambiente ao longo do tempo (FRIEDRICH *et al.*, 2012). Porém, nestes sistemas as células livres estão expostas à tensão de

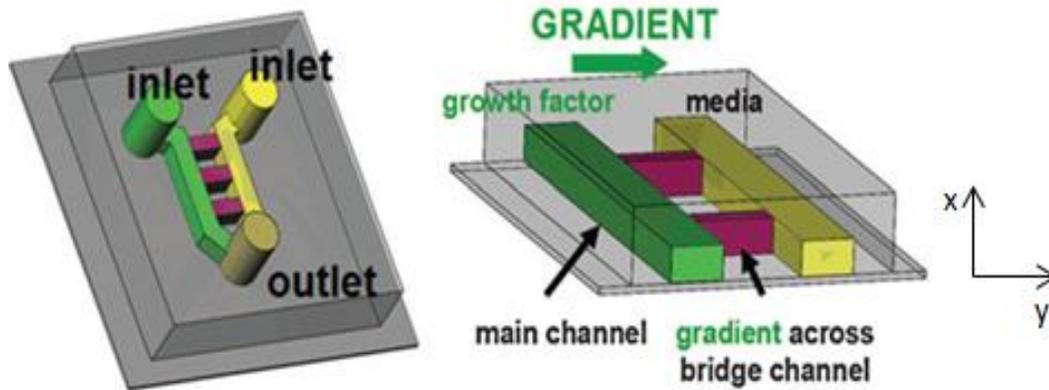
cisalhamento e o escoamento pode interferir tanto no direcionamento celular como no arraste de metabólitos (WALKER *et al.*, 2005).

A influencia do fluxo laminar sobre a migração celular e a tensão de cisalhamento em células foi estudado por Walker *et al.* (2005). Neste trabalho, avaliaram o processo de quimiotaxia de células de leucemia humana (HL60) em função de diferentes velocidades de escoamento nos microcanais e a distância percorrida pelas células. Analisando a mobilidade celular, notou-se que taxas maiores de fluxos influenciam significativamente na distância percorrida pelas células livres devido à força de arraste. Sendo assim, o fluxo pode ser uma característica indesejável para estudos que envolvem migração celular, o qual está presente em sistemas com gradiente baseado em escoamento.

### **3.2 Gradiente baseado em difusão**

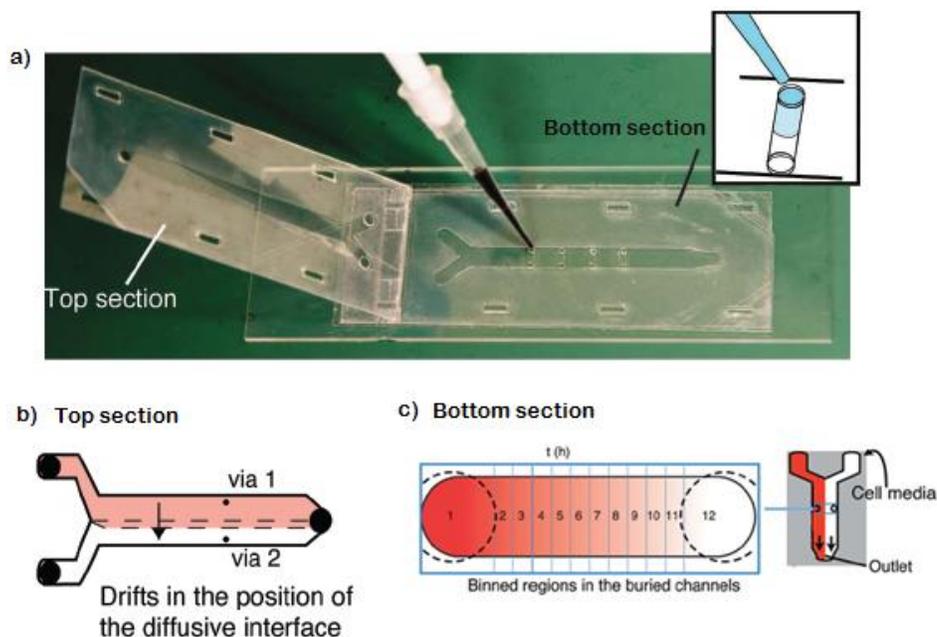
Já nos dispositivos microfluídicos com formação de gradiente baseados em difusão, o transporte de matéria é puramente difusivo e não há escoamento na região onde o gradiente de concentração é estudado, viabilizando os estudos com células livres. Neste caso, a formação do gradiente de concentração depende da difusividade da molécula de interesse e da configuração dos microcanais. Os sistemas são simples, compatíveis com experimentos de alto rendimento e o ambiente é propício para estudos ao nível molecular (KIM *et al.*, 2010)

Saadi *et al.* (2007) apresentaram um dispositivo microfluídico capaz de gerar gradiente de concentração baseado em difusão para cultura de células animais. Para demonstrar a eficiência do sistema, utilizaram células de neutrófilos para investigar a migração celular quando submetidas a diferentes concentrações de soluções quimioatrativas. Neste caso, a formação de gradiente ocorre em câmaras onde não há um escoamento, mas através do contato com canais de escoamento livre é possível observar o comportamento celular (Figura 7).



**Figura 7:** Dispositivo microfluídico capaz de formar gradiente baseado em difusão. Adaptado de Saadi *et al.* (2007).

O trabalho de Atencia *et al.* (2012) mostra um sistema microfluídico com formação de gradiente baseado em difusão para estudar os sinais bioquímicos de células ao longo do tempo. O dispositivo é construído em dois níveis, sendo possível a formação tanto de gradiente baseado em escoamento como de difusão. No nível superior, duas correntes de soluções com concentrações diferentes acessam o nível inferior, onde é formado gradiente puramente difusivo e onde ocorre os ensaios com células. Neste dispositivo, os autores avaliaram as respostas químicas de células VERO (células do epitélio renal de macaco-verde africano, *Cercopithecus aethiops*) na presença de perfis de concentração cicloheximida, uma toxina que inibe a síntese de proteínas verdes fluorescentes (GFP) inseridas nestas células (Figura 8). Além disso, estes autores demonstraram que na câmara inferior, o gradiente de concentração gerado possui perfil linear (ATENCIA *et al.*, 2012).



**Figura 8:** Dispositivo microfluídico com formação de gradientes de concentração: a) apresentação do dispositivo construído em dois níveis; b) nível superior para o escoamento de duas correntes de soluções e com formação de gradiente baseado em escoamento e, c) nível inferior, para gerar gradiente de concentração difusivo e avaliar o comportamento celular ao longo do tempo e em função da concentração de determinado reagente. Adaptado de Atencia *et al.* (2012).

Estas configurações de dispositivos microfluídicos capacitam à formação de gradientes de concentração, usados para interpretar a mobilidade celular e analisar as funções e o comportamento de células animais e de micro-organismos. Isto leva a entender os mecanismos fundamentais de respostas imunológicas, interação entre células e os tratamento para doenças que envolvem migração celular (TAVANA *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2010)

#### 4 UTILIZAÇÃO DE GRADIENTES DE CONCENTRAÇÃO EM DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS PARA ESTUDOS COM CÉLULAS

A formação de gradientes de concentração bem definidos nos microcanais trata-se de uma característica que não pode ser obtida em macroescala e importante nos estudos de células, pois possibilitam as pesquisas que visam

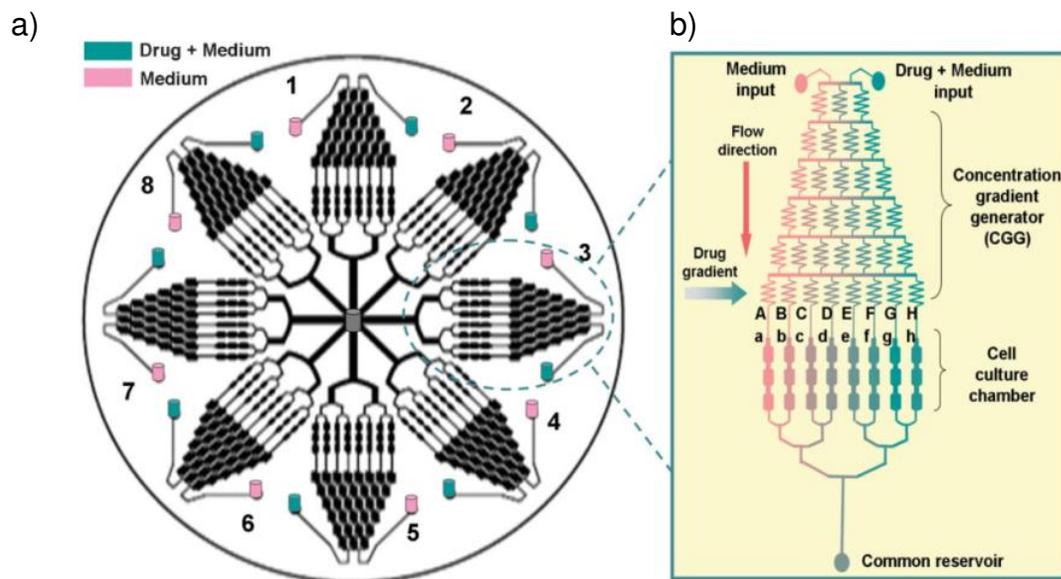
conhecer ou determinar os níveis de concentração ou a quantidade de consumo de biomoléculas que são fundamentais para o metabolismo celular (EL-ALI *et al.*, 2006; SAHAI *et al.*, 2011).

Além disso, a capacidade de exercer controle sobre as células em escala micrométrica permite também investigar populações e também observar precisamente células individuais (TAVANA *et al.*, 2008; VAN NOORT *et al.*, 2009). Existem pesquisas em diferentes estágios de desenvolvimento tanto para células animais como para células microbianas.

Assim, os dispositivos microfluídicos com capacidade de formação de gradientes de concentração podem ser empregados para otimizar processos biotecnológicos, com resultados mais rápidos e confiáveis para determinação de parâmetros e seleção de faixas ótimas de crescimento celular. Ainda, pode-se considerar a aplicação dos resultados obtidos com a microfluídica em escala industrial.

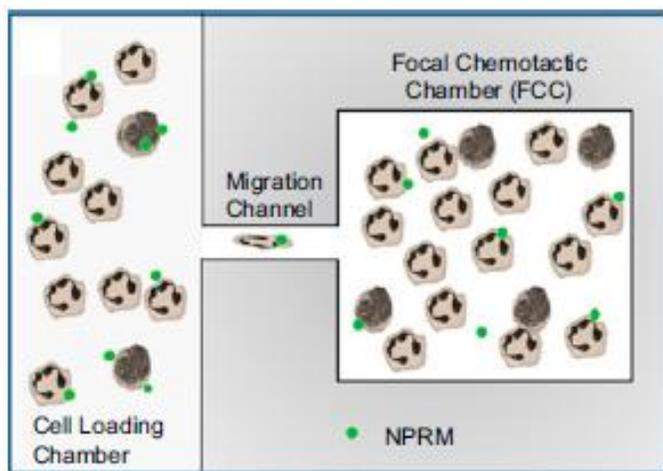
#### **4.1 Emprego de gradiente de concentração para células animais**

Os dispositivos com formação de gradientes de concentração, baseado em escoamento ou em difusão, estão sendo usados para compreender diversas reações celulares. No estudo apresentado por Ye *et al.* (2007), o dispositivo com gradiente baseado em escoamento é usado para triagem celular, o qual consiste em redes de microcanais para gerar perfis de vários fármacos e com câmaras de cultura celulares em cada nível de concentração. Neste dispositivo são mensurados diversos parâmetros de respostas celulares de carcinoma de fígado humano em função de diferentes concentrações de fármacos (Figura 9).



**Figura 9:** Microfluídica com formação de gradiente de concentração baseado em escoamento: a) sistema múltiplo de redes de microcanais, onde ocorre a diluição de solução e formação de gradiente; b) rede de microcanais e câmara de cultivo de células. Adaptado de Ye *et al.* (2007).

Além da interação entre células-moléculas, a formação de gradientes permite entender a interação e o comportamento entre as células-células do corpo humano frente ao gradiente biomolecular. O trabalho de Jones *et al.* (2012) estudou a influência mútua entre neutrófilos e monócitos (que são células responsáveis pela defesa do organismo) que migram em resposta a vários compostos químicos. O comportamento destas células foi avaliado em um dispositivo microfluídico capaz de reproduzir ambientes críticos de uma inflamação local, em câmaras de quimiotáticos com diferentes concentrações de estímulos inflamatórios. Por difusão molecular, as células de defesa migram para estas câmaras onde podem ser quantificadas (Figura 10).



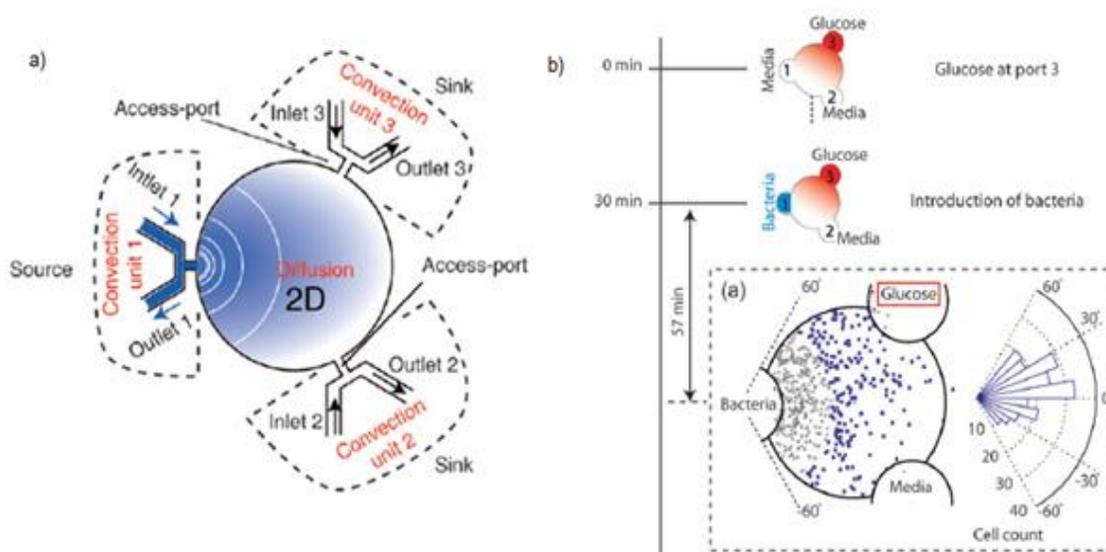
**Figura 10:** Estrutura de sistema microfluídico para avaliar o comportamento de células de defesa do organismo (neutrófilos e monócitos) em resposta a uma inflamação local. Adaptado de Jones *et al.* (2012).

Assim, a microfluídica tem contribuído com o avanço nas pesquisas biológicas em função da sensibilidade dos resultados e das diversas estratégias que podem ser aplicadas às células animais, tais como a interação, respostas celulares frente a modificações químicas, mobilidade e efeito de fármacos sobre as células. Além de reduzir consideravelmente o tempo de análises e a necessidade de amostras, bem como a possibilidade de estudos entre células animais e microbianas (WHITESIDES, 2006; VAN NOORT *et al.*, 2009).

#### 4.2 Emprego de gradiente de concentração para células microbianas

Os dispositivos com capacidade de formar gradientes de concentração podem simular sistemas adequados para o cultivo celular. No trabalho de Groisman *et al.* (2005) é apresentado um dispositivo microfluídico do tipo quimiostato e com característica de formação de gradiente baseado em escoamento e mistura por rede de microcanais. O dispositivo é usado para acompanhar o crescimento microbiano a partir de uma única célula de *Escherichia coli*, determinando sua viabilidade celular em função da temperatura e demandam de nutrientes.

Outra área influente na microbiologia é o uso dos microcanais para avaliar a quimiotaxia microbiana (WEIBEL *et al.*, 2007). No trabalho de Atencia *et al.* (2009) o estudo de quimiotaxia bacteriana é feito por meio de um dispositivo circular que permite a formação, simultânea, de vários gradientes de concentração em fluxo. Em função dos diferentes perfis de fonte de carbono que se forma no interior do sistema é possível observar a quimiotaxia e compreender as respostas químicas das células frente à concentração de substrato (Figura 11).



**Figura 11:** Dispositivo microfluídico para avaliar quimiotaxia bacteriana: a) geometria do dispositivo microfluídico circular, b) o efeito da quimiotaxia bacteriana em função da concentração de glicose. Adaptado de Atencia *et al.* (2009).

Além dos mecanismos e respostas celulares, a aplicação da microfluídica aos estudos com células microbianas permite compreender, avaliar e determinar os parâmetros cinéticos relacionados aos bioprocessos. Desta forma, aperfeiçoá-los de modo a aumentar a produtividade e a qualidade dos processos convencionais e industriais, com menor tempo operacional. Com isso, a microfluídica tem sido visada no emprego de triagem rápida de parâmetros cinéticos para otimização em bioprocessos.

## REFERÊNCIAS

ATENCIA, J.; COOKSEY, G. A.; LOCASCIO, L. E. A robust diffusion-based gradient generator for dynamic cell assays. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 2, p. 309-316, 2012.

ATENCIA, J.; MORROW, J.; LOCASCIO, L. E. The microfluidic palette: a diffusive gradient generator with spatio-temporal control. **Lab on a Chip**, v. 9, n. 18, p. 2707-2714, 2009.

AU, S. H.; SHIH, S. C.; WHEELER, A. R. Integrated microbioreactor for culture and analysis of bacteria, algae and yeast. **Biomedical microdevices**, v. 13, n. 1, p. 41-50, 2011. ISSN 1387-2176.

BALAGADDÉ, F. K.; YOU, L.; HANSEN, C. L.; ARNOLD, F. H.; QUAKE, S. R. Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. **Science**, v. 309, n. 5731, p. 137-140, 2005. ISSN 0036-8075.

BALBINO, T. A.; AZZONI, A. R.; TORRE, L. G. D. L. Microfluidic devices for continuous production of pDNA/cationic liposome complexes for gene delivery and vaccine therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2013. ISSN 0927-7765.

BARRY, R.; IVANOV, D. Microfluidics in biotechnology. **Journal of nanobiotechnology**, v. 2, n. 1, p. 2, 2004. ISSN 1477-3155.

BEEBE, D. J.; MENSING, G. A.; WALKER, G. M. Physics and applications of microfluidics in biology. **Annual review of biomedical engineering**, v. 4, n. 1, p. 261-286, 2002. ISSN 1523-9829.

BUCHENAUER, A.; HOFMANN, M.; FUNKE, M.; BÜCHS, J.; MOKWA, W.; SCHNAKENBERG, U. Micro-bioreactors for fed-batch fermentations with integrated online monitoring and microfluidic devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 5, p. 1411-1416, 2009. ISSN 0956-5663.

CHARATI, S.; STERN, S. Diffusion of gases in silicone polymers: molecular dynamics simulations. **Macromolecules**, v. 31, n. 16, p. 5529-5535, 1998. ISSN 0024-9297.

CHEN, X.; LAM, Y. C. An Analytical Solution on Convective and Diffusive Transport of Analyte in Laminar Flow of Microfluidic Slit. 2004.

CIMETTA, E.; SIRABELLA, D.; YEAGER, K.; DAVIDSON, K.; SIMON, J.; MOON, R. T.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Microfluidic bioreactor for dynamic regulation of early mesodermal commitment in human pluripotent stem cells. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 3, p. 355-364, 2013.

DHUMPA, R.; ROPER, M. G. Temporal gradients in microfluidic systems to probe cellular dynamics: A review. **Analytica chimica acta**, v. 743, p. 9-18, 2012. ISSN 0003-2670.

DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles**. Access Online via Elsevier, 1995. ISBN 0080528120.

EL-ALI, J.; SORGER, P. K.; JENSEN, K. F. Cells on chips. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 403-411, 2006. ISSN 0028-0836.

FREDLAKE, C. P.; HERT, D. G.; KAN, C.-W.; CHIESL, T. N.; ROOT, B. E.; FORSTER, R. E.; BARRON, A. E. Ultrafast DNA sequencing on a microchip by a hybrid separation mechanism that gives 600 bases in 6.5 minutes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 2, p. 476-481, 2008. ISSN 0027-8424.

FRIEDRICH, D.; PLEASE, C. P.; MELVIN, T. Design of novel microfluidic concentration gradient generators suitable for linear and exponential concentration ranges. **Chemical Engineering Journal**, v. 193, p. 296-303, 2012. ISSN 1385-8947.

FU, L.-M.; JU, W.-J.; YANG, R.-J.; WANG, Y.-N. Rapid prototyping of glass-based microfluidic chips utilizing two-pass defocused CO<sub>2</sub> laser beam method. **Microfluidics and nanofluidics**, v. 14, n. 3-4, p. 479-487, 2013. ISSN 1613-4982.

GROISMAN, A.; LOBO, C.; CHO, H.; CAMPBELL, J. K.; DUFOUR, Y. S.; STEVENS, A. M.; LEVCHENKO, A. A microfluidic chemostat for experiments with bacterial and yeast cells. **Nature methods**, v. 2, n. 9, p. 685-689, 2005. ISSN 1548-7091.

GROVER, W. H.; SKELLEY, A. M.; LIU, C. N.; LAGALLY, E. T.; MATHIES, R. A. Monolithic membrane valves and diaphragm pumps for practical large-scale integration into glass microfluidic devices. **Sensors and actuators B: Chemical**, v. 89, n. 3, p. 315-323, 2003. ISSN 0925-4005.

HEGAB, H. M.; ELMKAWY, A.; STAKENBORG, T. Review of microfluidic microreactor technology for high-throughput submerged microbiological cultivation. **Biomicrofluidics**, v. 7, n. 2, p. 021502, 2013. ISSN 1932-1058.

ISMAGILOV, R. F.; STROOCK, A. D.; KENIS, P. J.; WHITESIDES, G.; STONE, H. A. Experimental and theoretical scaling laws for transverse diffusive broadening in two-phase laminar flows in microchannels. **Applied Physics Letters**, v. 76, n. 17, p. 2376-2378, 2000. ISSN 0003-6951.

JEON, N. L.; DERTINGER, S. K.; CHIU, D. T.; CHOI, I. S.; STROOCK, A. D.; WHITESIDES, G. M. Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems. **Langmuir**, v. 16, n. 22, p. 8311-8316, 2000. ISSN 0743-7463.

JONES, C. N.; DALLI, J.; DIMISKO, L.; WONG, E.; SERHAN, C. N.; IRIMIA, D. Microfluidic chambers for monitoring leukocyte trafficking and humanized nanopresolving medicines interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 50, p. 20560-20565, 2012. ISSN 0027-8424.

KIM, S.; KIM, H. J.; JEON, N. L. Biological applications of microfluidic gradient devices. **Integrative Biology**, v. 2, n. 11-12, p. 584-603, 2010.

KUMAR, S.; WITTMANN, C.; HEINZLE, E. Review: minibioreactors. **Biotechnology letters**, v. 26, n. 1, p. 1-10, 2004. ISSN 0141-5492.

MCDONALD, J. C.; WHITESIDES, G. M. Poly (dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. **Accounts of chemical research**, v. 35, n. 7, p. 491-499, 2002. ISSN 0001-4842.

MEHTA, G.; MEHTA, K.; SUD, D.; SONG, J. W.; BERSANO-BEGEY, T.; FUTAI, N.; HEO, Y. S.; MYCEK, M.-A.; LINDERMAN, J. J.; TAKAYAMA, S. Quantitative measurement and control of oxygen levels in microfluidic poly (dimethylsiloxane) bioreactors during cell culture. **Biomedical microdevices**, v. 9, n. 2, p. 123-134, 2007. ISSN 1387-2176.

NGE, P. N.; ROGERS, C. I.; WOOLLEY, A. T. Advances in microfluidic materials, functions, integration, and applications. **Chemical reviews**, v. 113, n. 4, p. 2550-2583, 2013. ISSN 0009-2665.

RAHMAN, P. K.; PASIRAYI, G.; AUGER, V.; ALI, Z. Development of a simple and low cost microbioreactor for high-throughput bioprocessing. **Biotechnology letters**, v. 31, n. 2, p. 209-214, 2009. ISSN 0141-5492.

SAADI, W.; RHEE, S. W.; LIN, F.; VAHIDI, B.; CHUNG, B. G.; JEON, N. L. Generation of stable concentration gradients in 2D and 3D environments using a microfluidic ladder chamber. **Biomedical microdevices**, v. 9, n. 5, p. 627-635, 2007. ISSN 1387-2176.

SAHAI, R.; CECCHINI, M.; KLINGAUF, M.; FERRARI, A.; MARTINO, C.; CASTRATARO, P.; LIONETTI, V.; MENCIASSI, A.; BELTRAM, F. Microfluidic chip for spatially and temporally controlled biochemical gradient generation in standard cell-culture Petri dishes. **Microfluidics and nanofluidics**, v. 11, n. 6, p. 763-771, 2011. ISSN 1613-4982.

SATO, K.; KITAMORI, T. Development of Fundamental Technologies for Micro Bioreactors. In: (Ed.). **Nano/Micro Biotechnology**: Springer, 2010. p.251-265. ISBN 3642149464.

SCHÄPPER, D.; ALAM, M. N. H. Z.; SZITA, N.; LANTZ, A. E.; GERNAEY, K. V. Application of microbioreactors in fermentation process development: a review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 395, n. 3, p. 679-695, 2009. ISSN 1618-2642.

SCHÄPPER, D.; STOCKS, S. M.; SZITA, N.; LANTZ, A. E.; GERNAEY, K. V. Development of a single-use microbioreactor for cultivation of microorganisms. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, n. 3, p. 891-898, 2010. ISSN 1385-8947.

SCHMOLKE, H.; DEMMING, S.; EDLICH, A.; MAGDANZ, V.; BÜTTGENBACH, S.; FRANCO-LARA, E.; KRULL, R.; KLAGES, C.-P. Polyelectrolyte multilayer surface functionalization of poly (dimethylsiloxane)(PDMS) for reduction of yeast cell adhesion in microfluidic devices. **Biomicrofluidics**, v. 4, n. 4, p. 044113, 2010. ISSN 1932-1058.

SIA, S. K.; WHITESIDES, G. M. Microfluidic devices fabricated in poly (dimethylsiloxane) for biological studies. **Electrophoresis**, v. 24, n. 21, p. 3563-3576, 2003. ISSN 1522-2683.

SOMMER, G. J.; CHANG, D. S.; JAIN, A.; LANGELIER, S. M.; PARK, J.; RHEE, M.; WANG, F.; ZEITOUN, R. I.; BURNS, M. A. Introduction to microfluidics. In: TIAN, W.-C. & FINEHOUT, E. (Ed.). **Microfluidics for biological applications**. New York: Springer Science, 2008. cap. 1, p.1-34.

SQUIRES, T. M.; QUAKE, S. R. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. **Reviews of modern physics**, v. 77, n. 3, p. 977, 2005.

STJERNSTRÖM, M.; ROERADE, J. Method for fabrication of microfluidic systems in glass. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 8, n. 1, p. 33, 1998. ISSN 0960-1317.

STOJKOVIČ, G.; ŽNIDARŠIČ-PLAZL, P. Continuous synthesis of L-malic acid using whole-cell microreactor. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1102-1107, 2012. ISSN 1359-5113.

TAVANA, H.; CHUNG, Y.-K.; KUO, C.-H.; TAKAYAMA, S. Microfluidic Systems for Cellular Applications. **Arbor**, v. 1001, p. 48109, 2008.

VAN NOORT, D.; ONG, S. M.; ZHANG, C.; ZHANG, S.; AROOZ, T.; YU, H. Stem cells in microfluidics. **Biotechnology progress**, v. 25, n. 1, p. 52-60, 2009. ISSN 1520-6033.

WALKER, G.; OZERS, M.; BEEBE, D. Insect cell culture in microfluidic channels. **Biomedical microdevices**, v. 4, n. 3, p. 161-166, 2002. ISSN 1387-2176.

WALKER, G. M.; SAI, J.; RICHMOND, A.; STREMLER, M.; CHUNG, C. Y.; WIKSWO, J. P. Effects of flow and diffusion on chemotaxis studies in a microfabricated gradient generator. **Lab on a Chip**, v. 5, n. 6, p. 611-618, 2005.

WEIBEL, D. B.; DILUZIO, W. R.; WHITESIDES, G. M. Microfabrication meets microbiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 209-218, 2007. ISSN 1740-1526.

WEIBEL, D. B.; WHITESIDES, G. M. Applications of microfluidics in chemical biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 6, p. 584-591, 2006. ISSN 1367-5931.

WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368-373, 2006. ISSN 0028-0836.

XIA, H.; WANG, Z.; KOH, Y.; MAY, K. A microfluidic mixer with self-excited 'turbulent' fluid motion for wide viscosity ratio applications. **Lab on a Chip**, v. 10, n. 13, p. 1712-1716, 2010.

YE, N.; QIN, J.; SHI, W.; LIU, X.; LIN, B. Cell-based high content screening using an integrated microfluidic device. **Lab on a Chip**, v. 7, n. 12, p. 1696-1704, 2007.

ZHANG, Z.; PEROZZIELLO, G.; BOCCAZZI, P.; SINSKEY, A. J.; GESCHKE, O.; JENSEN, K. F. Microbioreactors for bioprocess development. **Journal of the Association for Laboratory Automation**, v. 12, n. 3, p. 143-151, 2007. ISSN 2211-0682.

## CAPÍTULO 3 – DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS CAPAZES DE GERAR GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DIFUSIVO

---

### 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos altamente eficazes através da microfluídica vem contribuindo com o avanço de diversas áreas de pesquisas, como no campo da biotecnologia. A diversidade em dispositivos microfluídicos amplia ainda mais as possibilidades de estudos em microescala, sendo a capacidade de gerar gradiente difusivo uma das promessas em investigação do comportamento celular.

Características importantes da microfluídica como o regime de escoamento laminar, a formação de gradiente de concentração puramente difusivo, capacidade de mimetizar ambientes celulares, bem como a relação de igualdade entre os resultados da microfluídica com processos convencionais, impulsionam as investigações envolvendo o comportamento celular frente a diferentes concentrações de substratos (SOMMER *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2010).

A eficácia destas pesquisas depende não apenas da capacidade do dispositivo microfluídico em gerar o gradiente difusivo, mas também dos materiais que compõem o sistema. Em casos de estudos biológicos a superfície hidrofílica, como o vidro, é mais adequada para pesquisas com células livres devido à característica de hidrofobicidade celular. Da mesma forma, deve-se considerar a necessidade de transferência gasosa para determinar os materiais e/ou as estratégias de microfabricação que devem ser adotadas para compor os dispositivos microfluídicos.

Desta forma, os dispositivos microfluídicos podem ser arquitetados com materiais e geometrias diferentes de acordo com suas aplicações. Isso permite diversas aplicações usando os dispositivos microfluídicos baseados em gradiente difusivo. Diante disso, o objetivo deste trabalho consiste em propor modelos de dispositivos microfluídicos que sejam capazes de formar gradiente de concentração difusivo e compostos por materiais aplicáveis ao estudo com células microbianas em condição anaeróbia.

Com base nisso, neste trabalho, três modelos de dispositivos microfluídicos foram propostos, com a geometria baseada no trabalho de Atencia *et al.* (2012) e usando materiais e estratégias para adequar o sistema à aplicação desejada, sendo os dispositivos compostos por:

- (i) Vidro-vidro;
- (ii) Vidro-PDMS e
- (iii) Vidro-mPDMS (polidimetilsiloxano modificado quimicamente).

Sendo que para os dois últimos dispositivos devem ser adotadas estratégias para impedir a adesão de células, uma vez que o PDMS é hidrofóbico. No caso do dispositivo Vidro-PDMS, pode-se adicionar tensoativo ao meio de cultura celular e para o dispositivo Vidro-mPDMS, a modificação química do PDMS com reação de divinil éter com polietilenoglicol (DEV-PEG) a fim de tornar a superfície do polímero hidrofílica.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

Para a construção dos dispositivos microfluídicos utilizou-se os seguintes materiais: lâmina de microscopia (76x26mm, Exacta) e lamínula de microscopia (50x24mm, Exacta); kit de Elastômero de Silicone Sylgard 184 (Dow Corning, Midland, MI, USA) e fotorresiste MicroChem SU-8 25 (Newton, MA, USA) que foram fornecidos pelo Laboratório de Microfabricação (LMF-CNPEN) e PDMS laminado de 0,51 mm de espessura (Stockwell Elastomerics, USA).

Para a fabricação de microcanais nos vidros realizou-se o processo de corrosão úmida com: Buffer HF ( $\text{NH}_2\text{F}$  645 g/L; HF 120 mL;  $\text{H}_2\text{O}$  880 mL) e HF a 20%, para a modificação química do PMDS utilizou-se: bis (2-metoxietil) éter; DC1107 agente secante,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , divinil éter com poli etilenoglicol (DEV-PEG), fornecidos pelo Grupo de Eletroforese e Microsistemas de Análise (GEM) do Instituto de Química/Unicamp. Enquanto que as configurações de microcanais no PDMS laminado foram criadas por ablação usando uma máquina de laser de  $\text{CO}_2$ ,

modelo L-Solution 100 (Gravograph, USA) também do Instituto de Química/Unicamp.

O funcionamento dos sistemas microfluídicos depende dos seguintes acessórios e equipamentos: seringa de 10 mL (Hamilton, USA), mangueiras de silicone (1,2 mm de diâmetro interno), presilhas de metal, bombas do tipo seringa (KD Scientific, USA), microscópio confocal (Zeiss LSM780-NLO; Carl Zeiss AG, Germany), sistema de controle de temperatura (Pecon GmbH, Germany) e estereoscópio (Bel Photonics, Italy).

Para os ensaios com microfluídica para avaliar os perfis dos fluxos, foram utilizados Rodamina B a 0,1 mM (*Sulforhodamine B sodium salt*, Sigma-Aldrich) e corante alimentício líquido e hidrofílico (cor vermelho, Arcólor).

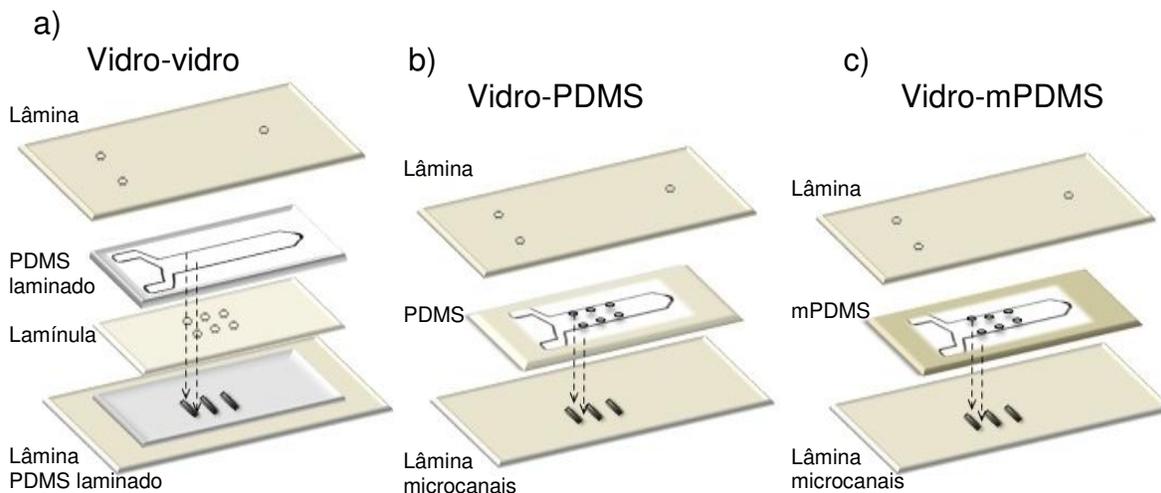
## 2.2 Modelos de dispositivos microfluídicos

Os dispositivos microfluídicos propostos foram baseados no trabalho de Atencia *et al.* (2012) e possuem dois níveis: inferior e superior. Tendo como base esta configuração, foram propostos três modelos de dispositivos microfluídicos com diferentes materiais, denominados de: (i) Vidro-vidro, (ii) Vidro-PDMS e (iii) Vidro-mPDMS (Tabela 1):

**Tabela 1:** Resumo dos três modelos de dispositivos microfluídicos propostos:

DESCRIÇÃO	MODELOS DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS		
Material	Vidro-vidro	Vidro-PMDS	Vidro-mPDMS
<b>Base dos dispositivos</b>	Lâmina ou lamínula de vidro lisa	Lâmina de vidro com câmaras para cultivo de células	Lâmina de vidro com câmaras para cultivo de células
	PDMS laminado	PDMS com furos e formato de canal em Y	PDMS modificado quimicamente, para tornar a superfície hidrofílica, com furos e canal em formato de Y
	Lamínula de vidro com furos	Lâmina de vidro com entradas e saídas	Lâmina de vidro com entradas e saídas
	PDMS laminado em formato de canal em Y		
	Lâmina de vidro com entradas e saída		

Nesta configuração dos dispositivos microfluídicos, o nível inferior possui microcanais para o cultivo de células, denominados de câmaras, e onde ocorre a formação do gradiente de concentração difusivo. Enquanto que no nível superior, escoam duas soluções de concentrações diferentes, em regime laminar, que acessam o nível inferior por meio de orifícios localizados nas extremidades das câmaras inferiores e é neste ponto onde se inicia o gradiente difusivo (Figura 12).



**Figura 12:** Esquema da geometria dos dispositivos microfluídicos propostos e o escoamento de soluções do nível superior com acesso às câmaras do nível inferior: a) dispositivo Vidro-vidro, b) dispositivo Vidro-PDMS e, c) dispositivo Vidro-mPDMS.

O processo de construção dos modelos de dispositivos fez-se de acordo com os diferentes componentes de cada dispositivo.

### 2.2.1 Dispositivo Vidro-vidro

O dispositivo Vidro-vidro tem suas bases compostas por vidro, sendo o nível inferior formado por lamínula (ou lâmina) de vidro liso (Figura 13.1) e os microcanais formados pelo PDMS laminado, que contorna as paredes dos canais e promove a aderência entre os vidros que compõem a base e o topo do microcanal (Figura 13.2). As geometrias dos microcanais no PDMS laminado

foram desenhadas no software Corel draw® e criados por ablação em máquina de laser de CO<sub>2</sub> L-Solution 100 (Gravograph, USA), numa potência de 35 W.

O nível superior do dispositivo Vidro-vidro foi feito com uma lamínula de vidro contendo orifícios (~0,5 mm de diâmetro), que se ajustam perfeitamente aos microcanais inferiores (Figura 13.3). Estes orifícios foram feitos por processo de corrosão úmida, sendo que a geometria dos orifícios, impressos em fotolito, foram fotogravados na lamínula para a corrosão úmida. As etapas que precedem o processo de corrosão úmida estão descritos na Tabela 2.

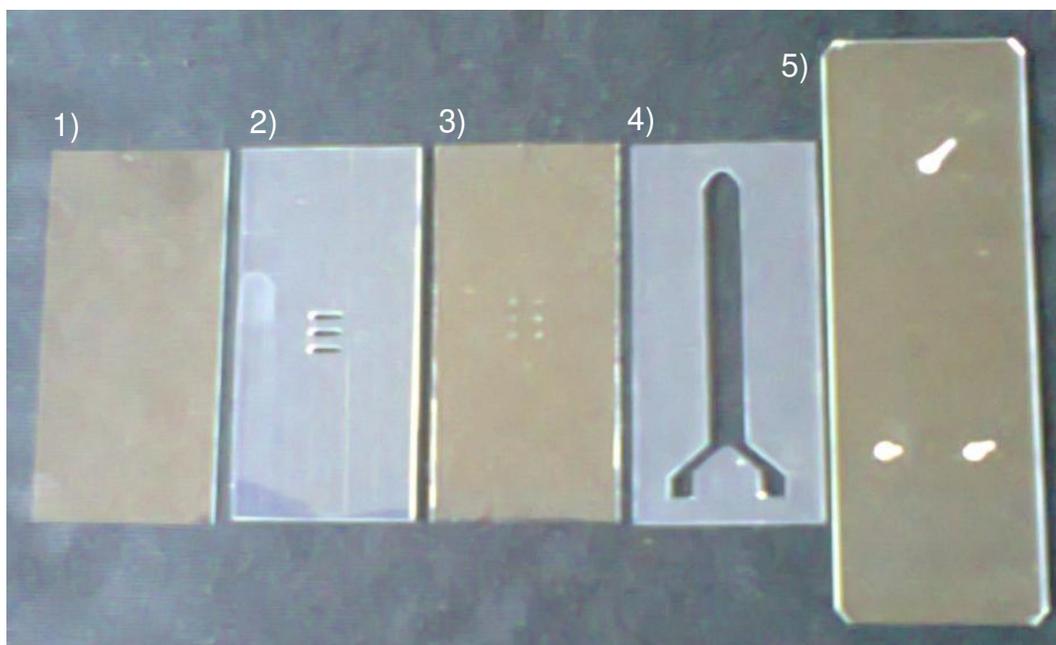
**Tabela 2:** Etapas de preparação da corrosão úmida

<b>Processo de Corrosão</b>	<b>Detalhes do processo</b>
Lavagem das lamínulas	Ultra-som Detergente Extran® MA 02, a 5% (Merck) 90 °C (20 min)
<b>Face superior da lamínula</b>	
HMDS (hexametildissiloxano)	Spin coating: 3000 rpm (30 s) 90 °C (20 min)
Fotorresiste AZ 4620	3000 rpm (30 s) 120 °C (20 min)
Exposição à luz UV	Fotoalinhadora MJB-3 UV300 70 s
Fotorrevelador K400	30 s 120 °C (20 min)
<b>Face inferior da lamínula</b>	
HMDS	3000 rpm (30 s) 90 °C (20 min)
Fotorresiste AZ 4620	3000 rpm (30 s) 120 °C (20 min)

Após a fotogração, a lamínula foi submetida ao processo de corrosão propriamente dito: solução de *Buffer* HF (1000 rpm) por 6 min e solução de HF 20% (1000 rpm) por 20 min. Após este processo, as lamínulas foram lavadas em

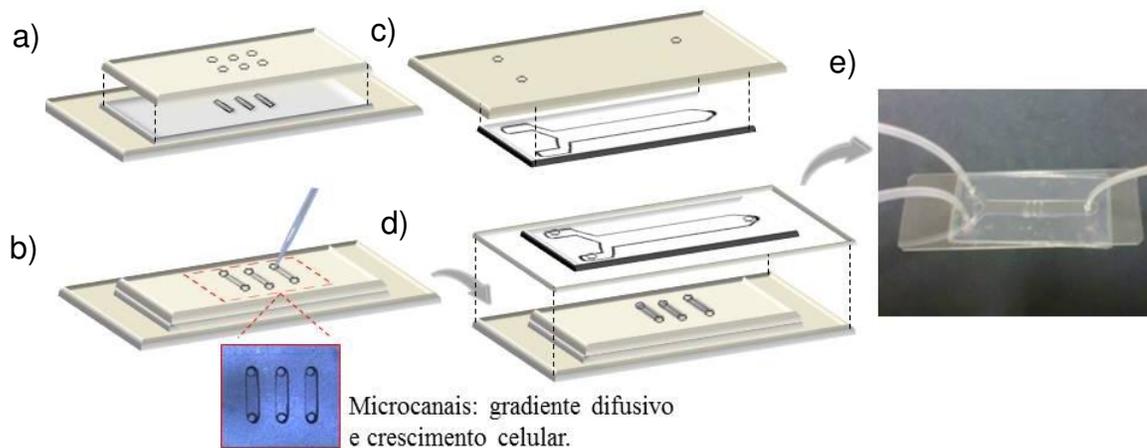
solução de HCl 1N para remoção de cristais de vidro e depois, em solução de acetona para remover o fotorresiste.

Acima da lamínula com orifícios, colocou-se o PDMS laminado na geometria de canal em Y (Figura 13.4), por onde escoam as soluções. Fechou-se este microcanal superior com lâmina de vidro, a qual possui duas entradas e uma saída (1 mm de diâmetro, cada) feitos com Dremel® usando broca diamantada de 1 mm com rotação 3500 rpm. E, para servir de conexão para as mangueiras, foram colados nas bordas dos furos, pontas de ponteira de micropipeta (10  $\mu$ L) usando cola para vidro (Figura 13.5).



**Figura 13:** Componentes do dispositivo modelo vidro-vidro. Nível inferior: 1) lamínula vidro lisa; 2) PDMS laminado contornando os canais. Nível superior: 3) lamínula de vidro com furos de  $\sim 0,5$  mm de diâmetro, 4) PDMS laminado em canal em formato de Y e, 5) lâmina com entradas e saída.

A selagem do dispositivo Vidro-vidro foi realizada pela aderência do PDMS laminado, sendo um dispositivo de selagem reversível e montado por etapas (Figura 14).

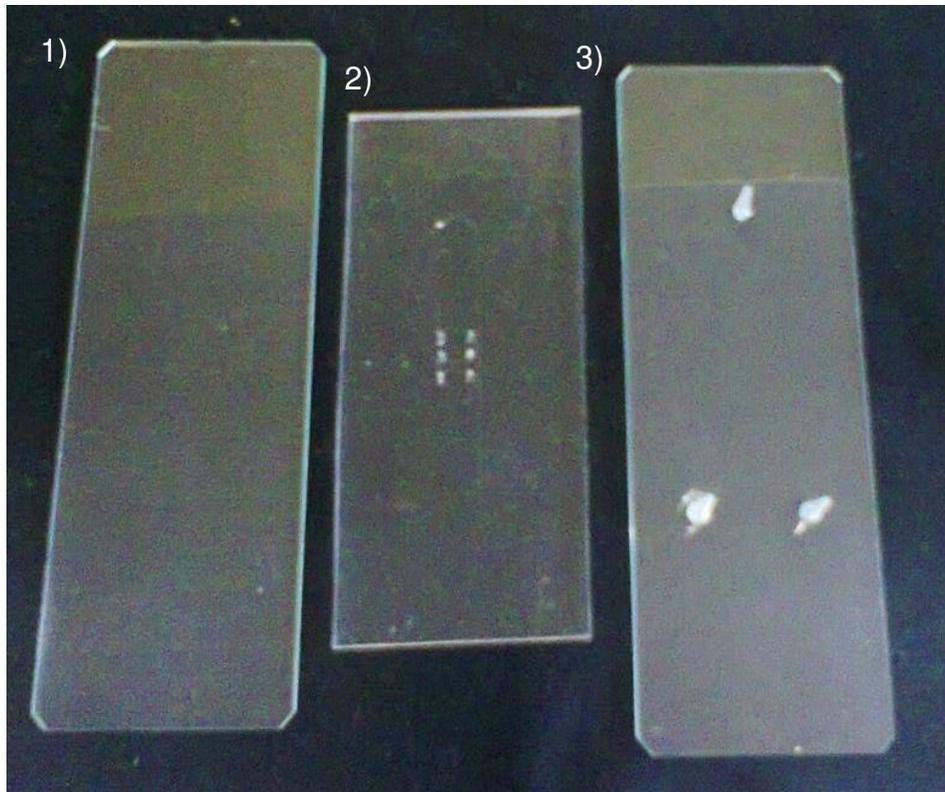


**Figura 14:** Esquema de montagem do dispositivo microfluídico Vidro-vidro com selagem por aderência do PDMS laminado: a) lamínula de vidro lisa com PDMS laminado (nível inferior) e lamínula de vidro com furos, b) inoculação da suspensão de células dentro das câmaras de cultivo de células; c) adesão do PDMS laminado em canal na lâmina superior, d) adesão da parte superior com a inferior do dispositivo; e) dispositivo microfluídico Vidro-vidro montado.

### 2.2.2 Dispositivos Vidro-PDMS e Vidro-mPDMS

A configuração dos dispositivos do tipo vidro-PDMS e vidro-mPDMS possuem a mesma base, sendo o nível inferior formado por lâmina de vidro contendo os microcanais para cultivo de células (câmaras) (Figura 15.1), feito pelo processo de corrosão úmida (Tabela 2). Após as etapas de preparação, as lâminas foram colocadas em solução de *Buffer HF* sob agitação magnética a 1000 rpm por 6 min e, depois, em solução de HF 20% a 1000 rpm por 8 min.

O nível superior destes modelos compõe-se de PDMS configurando o microcanal em formato de Y e contendo os orifícios ( $\sim 0,5$  mm de diâmetro, feito com ponta de agulha) servindo de entrada para o nível inferior (Figura 15.2). Sendo o dispositivo fechado com lâmina de vidro, a qual possui as entradas e saída (Figura 15.3). Para a fabricação do PDMS foi usada a técnica de litografia macia (Figura 16), indicada para polímeros macios como o PDMS (DUFFY *et al.*, 1998).



**Figura 15:** Componentes do dispositivo modelo Vidro-PDMS (mesma configuração para vidro-mPDMS): 1) lâmina de vidro com câmaras para o cultivo de células; 2) PDMS nativo em canal em formato de Y e com furos para acesso ao nível inferior e; 3) lâmina superior com entradas e saída, e conexões de material plástico para acoplar as mangueiras.

A geometria do microcanal em Y foi desenhada em programa de AUTOCAD 2002 e impressa em fotolito, usada como molde positivo no processo de litografia macia. E, para obter os desenhos dos microcanais no polímero, fez-se o molde negativo por fotolitografia e o processo de construção do molde foi desenvolvido de acordo com a literatura citada (Tabela 3).

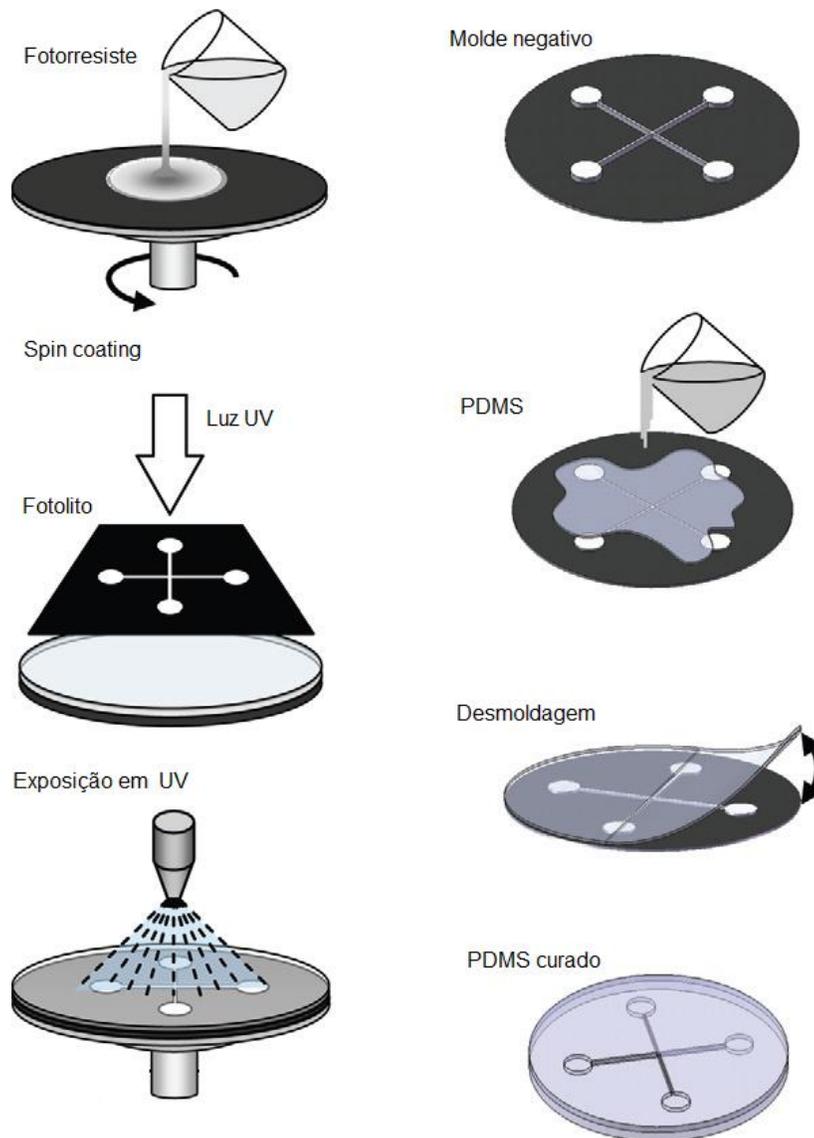
**Tabela 3:** Descrição do processo de construção do molde negativo por fotolitografia.

PROCESSO LITOGRAFICO	ETAPAS
<b>Base do molde</b>	Bolacha de silício
<b>Fotorresiste</b>	MicroChen SU-8 25 (Newton, MA, USA)
<b>Spin coating</b>	1000 rpm (30 s)
<b>Espessura</b>	~100 $\mu\text{m}$
<b>Cozimento pré-exposição</b>	30 °C (60 min) 95 °C (90 min)
<b>Fotogravação (geometria no fotolito para o molde negativo)</b>	Fotoalinhadora MJB-3 UV300 (KarlSuss, Garching, Germany), fonte de mercúrio de 350 W de 280 a 350 nm
<b>Fotoalinhadora Tempo de exposição</b>	70 s
<b>Cozimento pós-exposição</b>	120 °C (30 min)
<b>Revelador</b>	Revelador MicroChem SU-8 (Newton, MA, USA) 30 s

O material usado para compor a camada de PDMS foi o kit de Elastômero de Silicone Sylgard 184 (Dow Corning, Midland, MI, USA) e realizada a mistura do agente de cura e do polímero na proporção mássica de 1:10, como descrito pelo fabricante. Esta mistura foi deixada em um dessecador com sistema a vácuo a ~6 Pa por 40 min para remoção de bolhas de ar.

Após esta etapa, o PDMS foi vertido sobre o molde negativo e colocado em chapa aquecida a 100 °C por 45 min para o processo de cura do polímero. Por fim, o molde foi retirado do molde e a estrutura ficou configurada com os microcanais feitos da fotolitografia (Figura 16).

### CAPÍTULO 3



**Figura 16:** Esquema de fabricação de microcanais pelo método de litografia macia. Adaptado de LIN *et al.* (2011)

No dispositivo vidro-PDMS utilizou-se o PDMS nativo, isto é, sem modificação química (Figura 17), enquanto que no dispositivo Vidro-mPDMS, o PDMS foi modificado quimicamente com DVE (PEG), para obter uma superfície menos hidrofóbica.

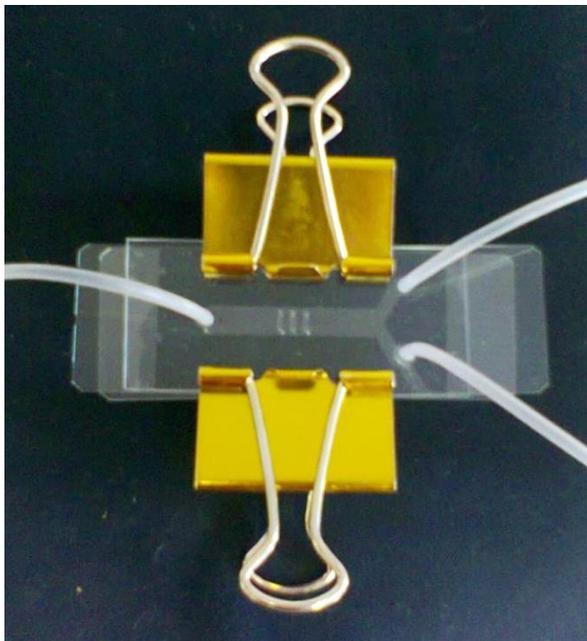
O processo de modificação do PDMS ocorreu por reação com divinil éter com polietilenoglicol (DEV-PEG), em trabalho já desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Prof. José Alberto Fracassi, do Instituto de Química da UNICAMP.

Após o processo de cura, o PDMS foi submetido a uma série de tratamentos para tornar a superfície hidrofílica, em que a reação funcionaliza a superfície e permite a combinação com Si-H (Tabela 4) (CAMPOS *et al.*, 2014).

**Tabela 4:** Etapas do processo de modificação química do PDMS por reação com divinil éter com polietilenoglicol (DEV-PEG).

PROCESSO DE MODIFICAÇÃO QUÍMICA	ETAPAS DA REAÇÃO
<b>PDMS curado colocado em:</b>	
<b>Solução A:</b> 30 mL de bis(2-metoxietil)éter; 10 mL de DC1107 poli(metilsiloxano); 0,5 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> P.A	Agitação (30 min)
<b>Lavagem com solução de bis(2-metoxietil)éter</b>	80 °C (10 min) Dessecador (1 h)
<b>Solução B:</b> 5 mL de DVE-PEG; 25 mL de bis(2-metoxietil)éter; 2 gotas de catalisador de platina (Q2-7368)	Agitação (2 h)
<b>Lavagem com solução de bis(2-metoxietil)éter</b>	Dessecador (10 min) 120 °C (24 h)

Ambos os dispositivos foram finalizados com lâmina superior contendo as duas entradas e saída, como descrito no dispositivo Vidro-vidro (Figura 13) e vedados com pressão de presilhas de metal (Figura 17).

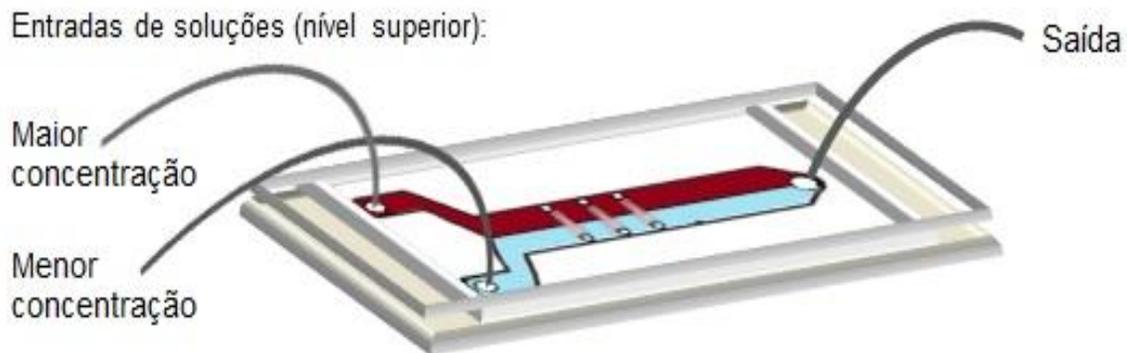


**Figura 17:** Dispositivo microfluídico modelo Vidro-PDMS ou Vidro-mPDMS com selagem reversível por pressão de presilhas de metal

### 2.2.3 Caracterizações operacionais do dispositivo microfluídico

#### *2.2.3.1 Limites de vazões para geração de fluxos constantes*

Após a montagem dos dispositivos, a determinação das vazões foi definida em função da geração de fluxos constantes no nível superior e assim, formar o gradiente de concentração difusivo no nível inferior. Desta forma, foram determinados os limites de vazões a partir da observação da formação de oscilações dos fluxos na interface do microcanal superior, por onde escoam as correntes de diferentes concentrações (Figura 18).



**Figura 18:** Esquema de operação dos dispositivos microfluídicos: duas entradas para soluções de maior e menor concentração e uma saída para coleta da solução, no nível superior.

### 2.2.3.2 Formação do gradiente de concentração difusivo

A fim de avaliar a capacidade de geração do gradiente de concentração difusivo de moléculas para o dispositivo Vidro-vidro, utilizou-se solução de Rodamina B (0, 1 mM), em uma das correntes e, na outra, água destilada. A câmara de cultivo de células foi preenchida com água destilada e avaliado a capacidade e o tempo de geração de gradiente linear através do *software* ZEN Blue 2012 (Carl Zeiss AG, Germany

Enquanto que nos demais dispositivos utilizou-se corante alimentício líquido e hidrofílico e ausente de glicose (cor vermelho, Arcólor) com a concentração de 40 g/L de corante, inserido nas câmaras inferiores de cada dispositivo, e nas correntes de entrada, solução de 40 e 0 g/L de glicose, tendo água como solvente. Foi utilizado este método nos dispositivos Vidro-PDMS e Vidro-mPDMS por ser de fácil operação.

O perfil de gradiente de concentração por difusão foi avaliado em função da intensidade de cor dentro do microcanal inferior (câmara para cultivo de células), fez-se a medida através do *software* ImageJ, nos dispositivos Vidro-PDMS e Vidro-mPDMS.

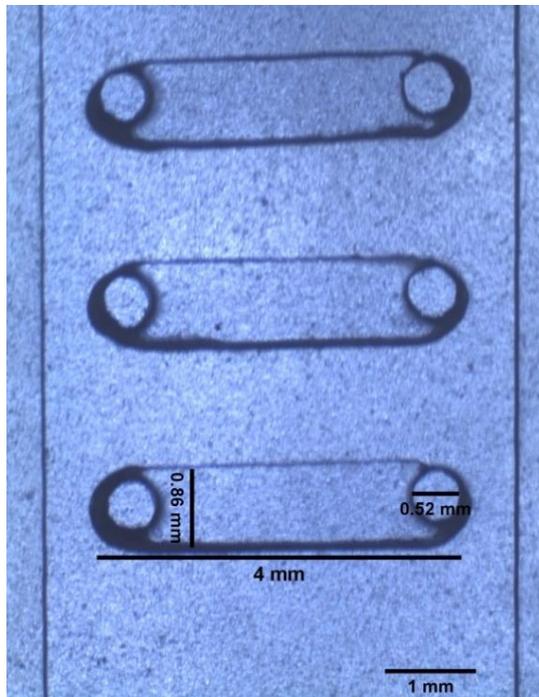
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Construção dos dispositivos microfluídicos

Os dispositivos microfluídicos propostos foram construídos em dois níveis e possuem selagem em modo reversível. As camadas que compõe cada nível foram construídas e, por fim, avaliado a montagem e a eficiência do método de selagem.

##### 3.1.1 Dispositivo Vidro-vidro

O dispositivo Vidro-vidro foi construído em bases de vidro, constituindo um sistema de superfícies hidrofílicas e sem a interferência de gases dentro dos microcanais. A fim de obter uma triplicata, foram construídas três câmaras para o cultivo de células e as dimensões de 4x0,9x0,51mm apresentaram melhor distribuição do gradiente ao longo do canal. Além disso, o diâmetro dos orifícios nas lamínulas foram determinadas pelo tempo de contato com a solução de corrosão úmida, em que 20 min conferiu num diâmetro de ~0,5 mm, mensurados pelo *software* ImageJ (National Institutes of Health, USA) (Figura 19).



**Figura 19:** Dimensões dos microcanais do dispositivo vidro-vidro em imagem panorâmica dos microcanais feitos pelo PDMS laminado ( $4 \times \sim 0,9$  mm) encaixados com os orifícios na lamínula de vidro ( $\sim 0,5$  mm de diâmetro), feitos por corrosão úmida.

No dispositivo Vidro-vidro, a selagem pela aderência do PDMS laminado apresentou eficácia, sem apresentar vazamentos no dispositivo microfluídico do tipo Vidro-vidro, dentro da vazão estudada ( $15 \mu\text{L}/\text{min}$ ) (Figura 20).

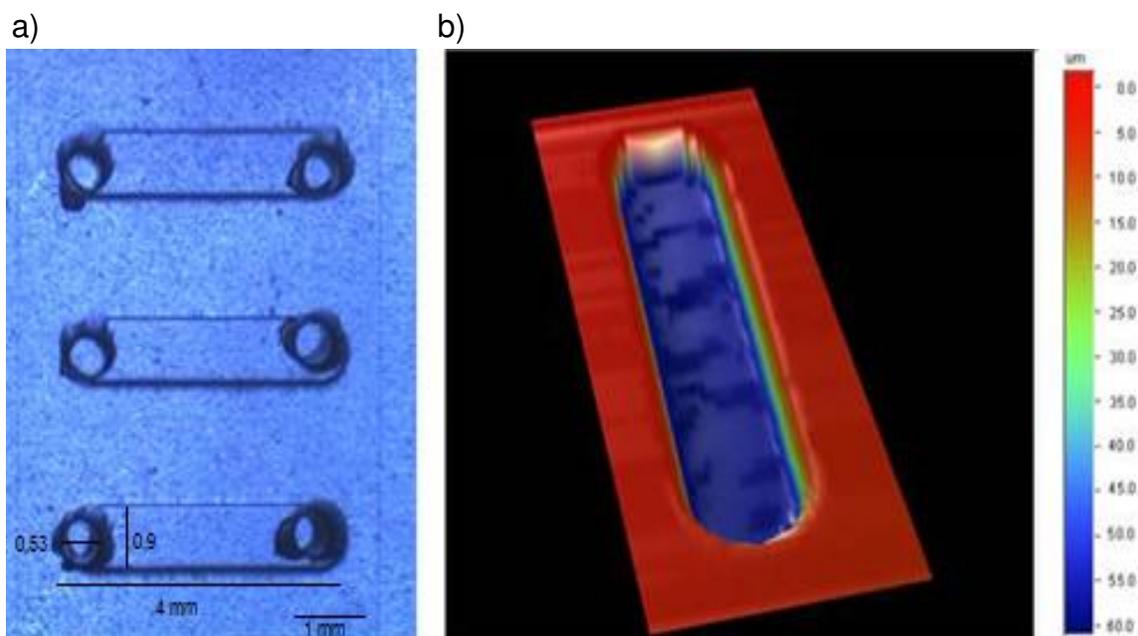


**Figura 20:** Dispositivo microfluídico do tipo Vidro-vidro com selagem reversível por aderência do PDMS laminado.

Além disso, o dispositivo Vidro-vidro não apresentou formação de bolhas ao longo do tempo, mantendo o escoamento em regime laminar e, como o vidro é hidrofílico mostrou-se mais adequado para trabalhos envolvendo células sem a necessidade de adição de qualquer substância ao sistema.

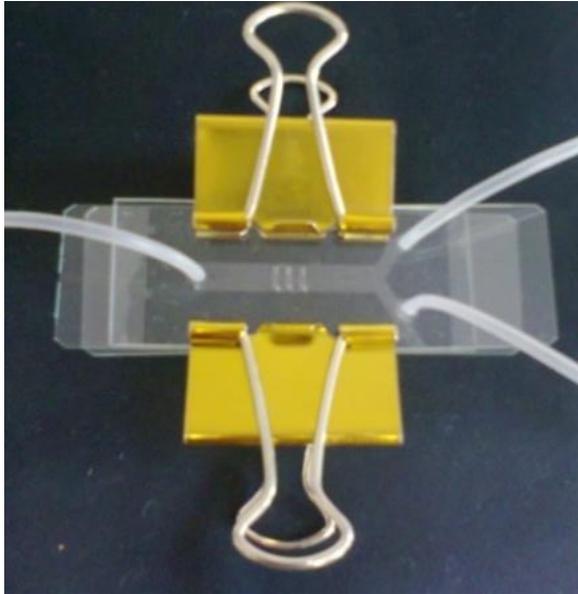
### 3.1.2 Dispositivo Vidro-PDMS

No dispositivo Vidro-PDMS, o nível inferior foi construído em lâminas de vidro e os microcanais, que constituem nas câmaras para o cultivo de células, foram feitos por corrosão úmida. A profundidade e a abertura das câmaras foram definidas pelo tempo de corrosão (8 min), sendo que a profundidade ficou em torno de 0,58 mm (Figura 21.b), mensurado pelo perfilômetro Dek Tak3 (Veeco,USA). Enquanto que o comprimento foi de 4 mm e a largura ficou em torno de 0,53 mm e abertura dos furos no PDMS, feitos com ponta de agulha, apresentou um diâmetro de ~0,5 mm (Figura 21.a), medidos através do ImageJ,.



**Figura 21:** Dimensões dos microcanais (câmaras para o cultivo de células) em vidro, feitos por corrosão úmida, mensurados pelo ImageJ: a) imagem panorâmica das câmaras em lâmina de vidro com encaixe do canal em PDMS com orifícios de ~0,5 mm de diâmetro; b) Abertura e profundidade do microcanal em lâmina de vidro, analisados em perfilômetro Dek Tak3

O nível superior foi construído em PDMS e a montagem do sistema mostrou-se mais fácil do que o dispositivo em vidro-vidro. Porém, para garantir a selagem do dispositivo foi necessário pressionar o sistema usando presilhas de metal, colocadas em paralelo para não desestabilizar a pressão interna do dispositivo (Figura 22).



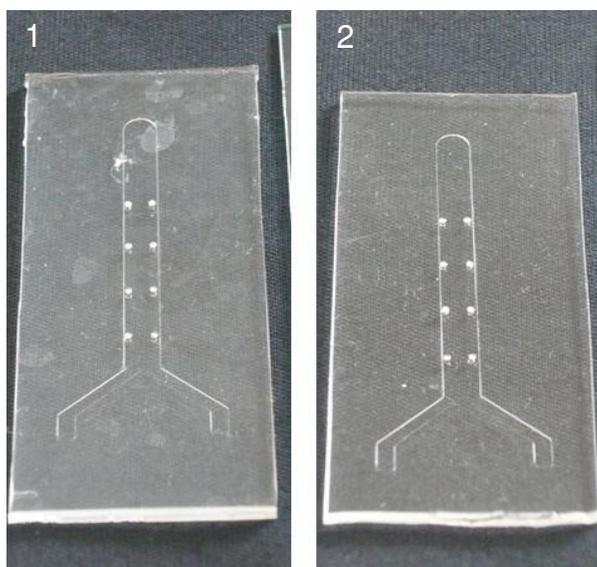
**Figura 22:** Dispositivo microfluídico do tipo Vidro-PDMS vedado por pressão de presilha de metal.

Embora o dispositivo Vidro-PDMS tenha se mostrado eficiente para a geração de gradientes, o microcanal não é totalmente hidrofílico e por isso notou-se a presença de bolha e não é ideal para estudos com células livres, uma vez que o PDMS é hidrofóbico. Neste modelo de dispositivo Vidro-PDMS, em que foi usado o PDMS nativo, sugeriu-se a adição de tensoativo Pluronic F68 0,1%.

Considerando que a concentração de tensoativos na suspensão de células é um fator importante, pois pode haver a formação de micelas e influenciar no comportamento dos fluídos e das células, além de ser mais um componente que poderia afetar a geração do gradiente.

### 3.1.3 Dispositivo Vidro-mPDMS

O dispositivo microfluídico Vidro-mPDMS possui as mesmas características de construção, apenas houve a modificação do PDMS com divinil éter com poli etilenoglicol (DEV-PEG). Além de tornar a superfície menos hidrofóbica, mostrou-se eficiente também para reduzir a formação de bolhas dentro dos microcanais. No entanto, o PDMS modificado ficou com a aparência menos transparente e reduziu a aderência à superfície de vidro (Figura 23).



**Figura 23:** Diferença de transparência entre o (1) mPDMS e o (2) PDMS nativo. A modificação química foi realizada ainda com o dispositivo contendo 4 microcanais, sendo que posteriormente foram fabricados dispositivos com 3 microcanais para análises em triplicatas.

Ainda, a modificação química não é permanente, ficando estável até 10 dias, sendo necessária a repetição da modificação. Embora esta técnica represente uma redução significativa do caráter hidrofóbico, de 21% quando comparado ao PDMS nativo (CAMPOS, 2012), não se mostrou ideal para este estudo com células livres, pois as células ainda assim poderiam aderir ao polímero.

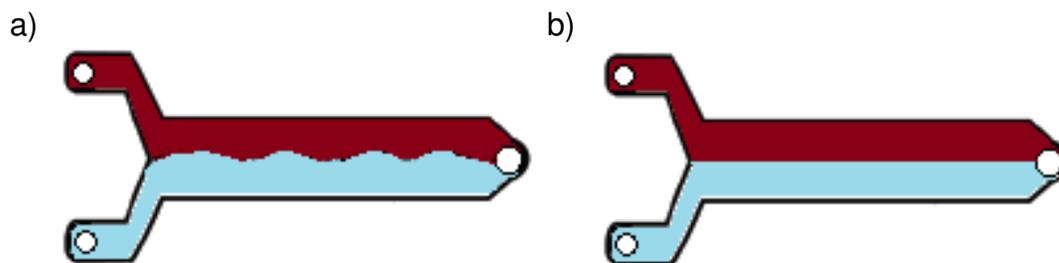
No entanto, os dispositivos microfluídicos propostos: Vidro-vidro; (ii) Vidro-PDMS e (iii) Vidro-mPDMS, foram montados e apresentaram funcionamento

adequado para os ensaios com formação de gradiente devido à ausência de vazamentos.

### 3.2 Determinação das condições operacionais de escoamento dos dispositivos microfluídicos

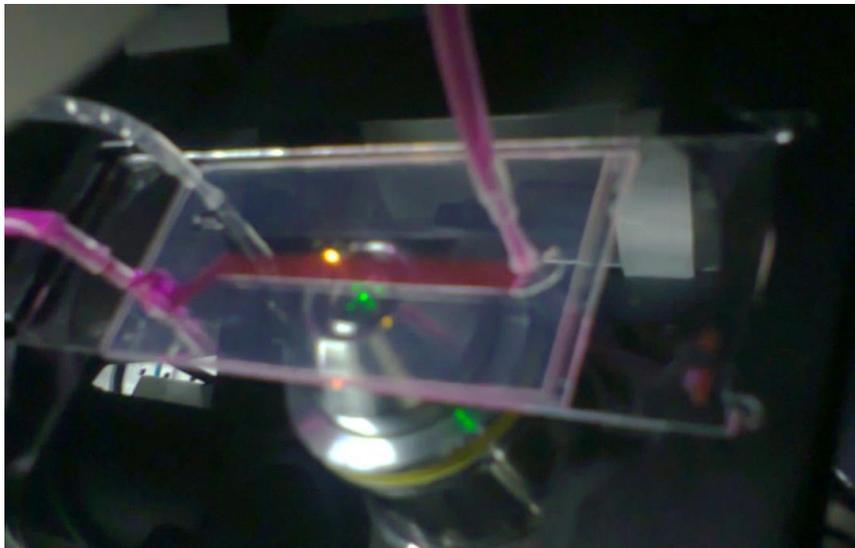
O fluxo de escoamento é constante no nível superior, porém as concentrações das duas correntes de entrada são distintas (Figura 18). Este procedimento é imposto no nível superior para garantir a formação do gradiente de concentração difusivo nas câmaras inferiores dos dispositivos microfluídicos apresentados. Desta forma, determinou-se experimentalmente os limites de vazão que geram um fluxo de escoamento laminar e estável, pois a oscilação das correntes (no canal superior) interfere na formação de gradiente de concentração linear (gerado na câmara inferior).

Assim, analisou-se o comportamento do fluxo em função das vazões das soluções, variando de 5 a 60  $\mu\text{L}/\text{min}$ , observando o perfil das correntes por 2 min, sendo oscilatório ou estável (Figura 24).



**Figura 24:** Esquema do perfil de escoamento das correntes do nível superior em função da vazão: a) característica oscilatória e instável; b) característica estável das correntes

Sendo que o fluxo se manteve estável (sem oscilações) numa vazão de 15 a 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Figura 25).

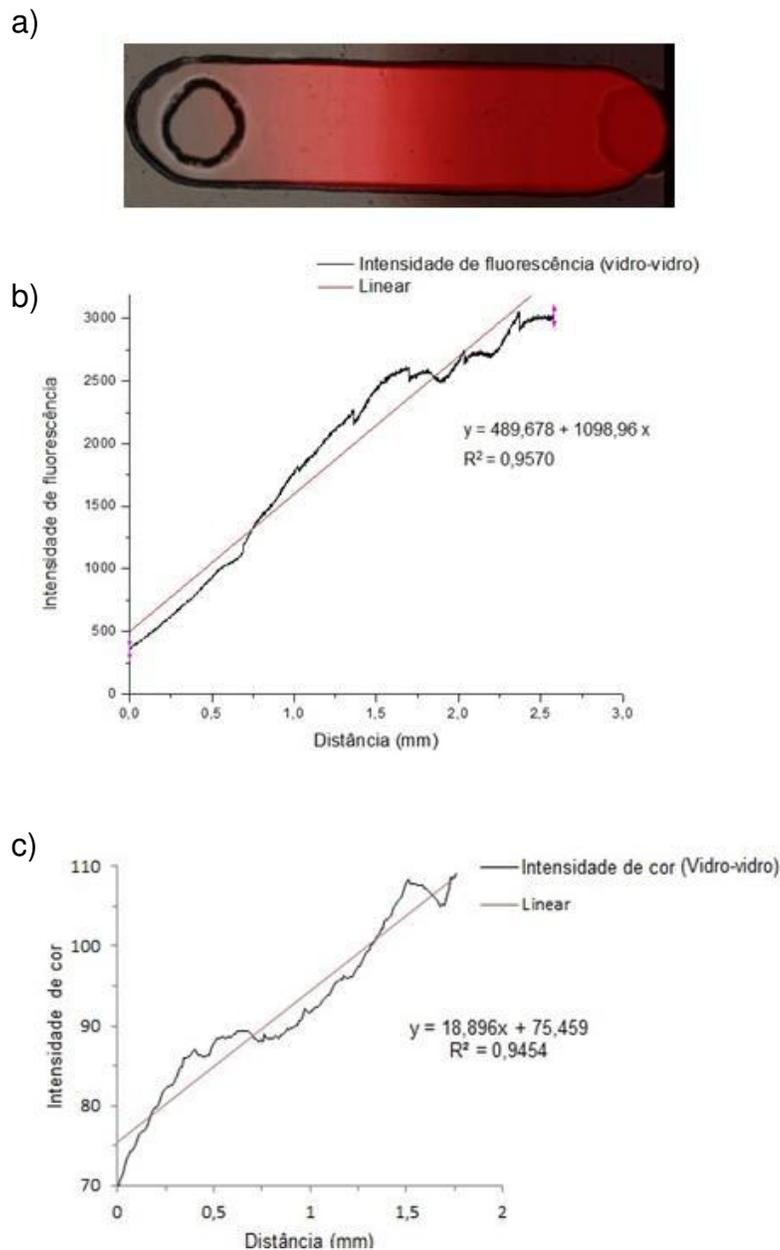


**Figura 25:** Escoamento das correntes no nível superior com vazão de 15  $\mu\text{l}/\text{min}$ , onde pode ser observado o comportamento estável das soluções, sendo usado água destilada em uma corrente e solução de Rodamina 0,1 mM na outra.

### 3.3 Validade de gradiente de concentração difusivo na câmara de cultivo de células

A partir das determinações dos parâmetros operacionais, analisou-se a capacidade de formação de gradiente de concentração difusivo nos três dispositivos microfluídicos propostos.

A fim de avaliar a capacidade de geração do gradiente de concentração difusivo no dispositivo Vidro-vidro, foi imposta um gradiente usando solução de rodamina B (0,1 mM), sendo a câmara de cultivo de células preenchida com água destilada (Figura 26.a). Neste ensaio medindo a intensidade de fluorescência de rodamina, observou-se a formação de gradiente linear e estável após  $\sim 30$  min (Figura 26.b). Ainda, a formação do gradiente foi observada também utilizando corante no microcanal inferior (microcâmara) e impondo diferentes concentrações de glicose nas correntes (0 e 40 g/L), onde foi observado que o perfil de gradiente nos microcanais foi linear tanto pela avaliação da intensidade de fluorescência quanto pelo utilização de corante (Figura 26.c).



**Figura 26:** Perfil linear do gradiente ao longo do microcanal microfluídico (Vidro-vidro): a) formação do gradiente linear com rodamina B (0,1 mM) e imagem em mosaico capturada após 30 min, aumento de 20x; b) perfil linear pela intensidade de fluorescência, analisado pelo *software* ZEN Blue 2012 (Carl Zeiss AG, Germany); c) perfil de gradiente praticamente linear pela intensidade de cor no dispositivo Vidro-vidro, analisado pelo *software* ImageJ. Sendo que as oscilações se devem à sensibilidade do *software* ImageJ que detecta qualquer ponto de cinza, uma vez que a intensidade é medida na escala de cinza.

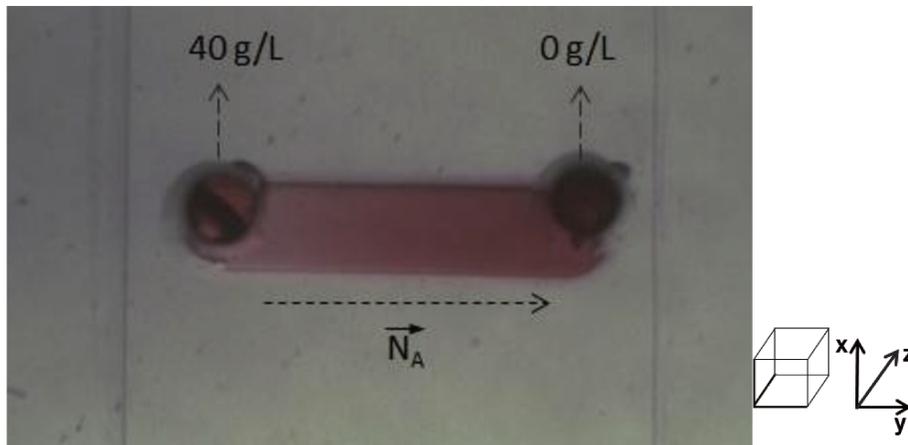
### CAPÍTULO 3

O perfil linear do gradiente indicou a ausência de convecção dentro dos microcanais, confirmando o gradiente de concentração difusivo. Além disso, o tempo de estabilidade do gradiente linear no microcanal depende da vazão do fluxo, como ilustrado no trabalho de Saadi *et al.* (2007) onde avaliou o tempo de geração e estabilidade de gradiente difusivo em microcanais através da intensidade de fluorescência. Neste caso, em microcanais com volume de  $\sim 200 \mu\text{L}$  e vazão de  $1 \mu\text{L}/\text{min}$  (tendo a geometria semelhante ao dispositivo que é objeto de estudo) o perfil mostrou-se linear a partir de 45 min. Enquanto que no dispositivo Vidro-vidro, com microcanais com volume de  $\sim 1,5 \mu\text{L}$  e vazão de  $15 \mu\text{L}/\text{min}$ , o perfil manteve-se linear e estável após 30 min de observação.

O perfil de gradiente por meio da intensidade de fluorescência foi observado também por Atencia *et al.* (2012), onde notou que o gradiente linear se formou completamente depois de  $\sim 30$  min e, uma vez formado, o gradiente se mantinha estável enquanto era imposto a diferença de concentração. Assim como observado no dispositivo Vidro-vidro, onde o gradiente de concentração, indicado pela intensidade de fluorescência, se manteve estável após a geração do gradiente linear.

Para os modelos de dispositivos Vidro-PDMS e Vidro-mPDMS a capacidade de formação de gradiente foi avaliada usando um corante na câmara de cultivo de células (inferior) e correntes de soluções desgaseificadas com concentrações distintas de glicose (40 e 0 g/L), uma vez que o método de avaliação do gradiente por corante apresentou um perfil semelhante à intensidade de fluorescência.

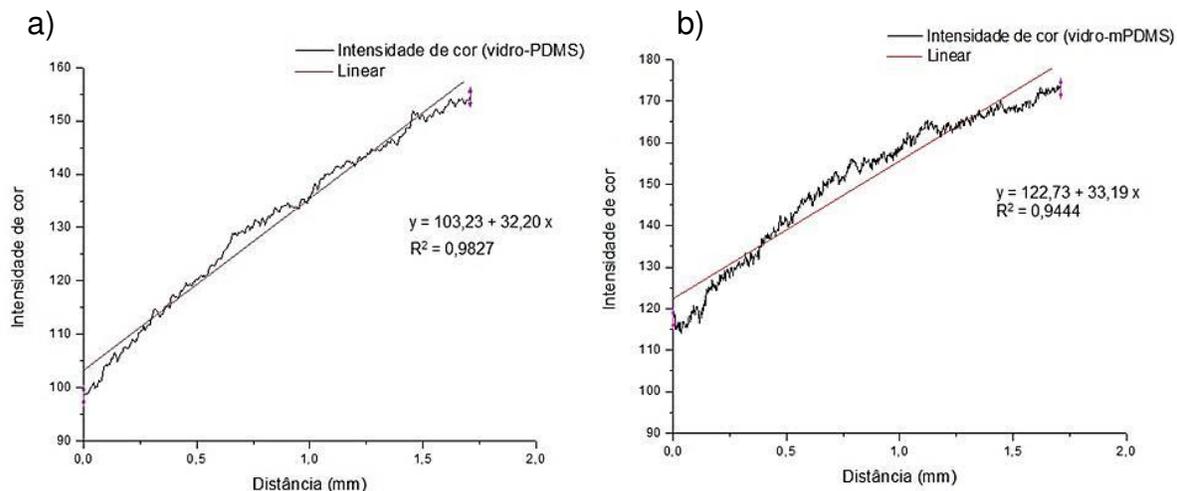
Como na câmara inferior não há variação de pressão (pela simetria no escoamento), não houve o deslocamento ou movimento líquido do fluido nesta câmara. Após determinado tempo de operação, observou-se a formação de gradiente de concentração do corante em função da variação da coloração na câmara inferior (Figura 27). Este gradiente de cor é resultado do fluxo de matéria de glicose e corante na câmara inferior, uma vez que houve um fluxo mássico de glicose da região de maior concentração para a região de menor concentração.



**Figura 27:** Apresentação da formação de gradiente de corante através do sentido do fluxo mássico de corante ( $N_A$ ), em dispositivo Vidro-PDMS, em função do contato com as correntes do nível superior, compostas por duas soluções desgaseificadas com concentrações de 40 e 0 g/L de glicose e escoam no sentido do eixo z.

A região de menor coloração de corante é a região onde há o escoamento da concentração de glicose em 40 g/L. Neste caso, uma análise qualitativa indica que a difusividade do corante nesta região será menor, pois uma maior resistência a transferência de massa é imposta pela presença da glicose. No outro extremo da câmara, onde a coloração é mais intensa, indicando maior concentração do corante, é a região onde não há glicose. Neste caso, a difusividade do corante no meio será maior (menor resistência à transferência de massa, pela ausência de glicose), criando um fluxo líquido do corante ao longo da câmara ( $N_A$ , Figura 27).

Desta forma, a resultante do fluxo total de corante ( $N_A$ ) ocorre no sentido da maior para a menor concentração de glicose das correntes (de escoamento na câmara superior), já que a resistência ao transporte de matéria é menor na menor concentração imposta (Figura 27). O gradiente de cor começou a se formar após 5 min, ficando estável e linear em ~35 min (Figura 28)



**Figura 28:** Perfil de gradiente de intensidade de cor ao longo do microcanal: a) dispositivo Vidro-PDMS; b) dispositivo Vidro-mPDMS, mostrando tendência linear do gradiente nos microcanais inferiores.

#### 4 CONCLUSÃO

Diante dos estudos realizados com os dispositivos microfluídicos, notou-se a capacidade destes modelos em gerar um gradiente com perfil linear e estável.

A geometria e as composições dos modelos de dispositivos microfluídicos propostos, Vidro-vidro; Vidro-PDMS e Vidro-mPDMS, apresentaram selagem eficiente, permitindo um escoamento estável das correntes do nível superior e capacidade de geração de gradiente no nível inferior.

Os três modelos de dispositivos propostos apresentaram formação de gradiente de concentração linear e puramente difusivos nas câmaras (microcanais inferiores), mostrando-se aplicáveis para estudos com células.

No entanto, o dispositivo Vidro-vidro, por apresentar superfícies hidrofílicas e ausentes de trocas gasosas, foi escolhido para estudos com células livres em condições anaeróbias. Assim, o dispositivo Vidro-vidro apresentou-se promissor para determinar os perfis ideais de crescimento celular microbiano e viabilizar os estudos para a otimização de bioprocessos.

## REFERÊNCIAS

ATENCIA, J.; COOKSEY, G. A.; LOCASCIO, L. E. A robust diffusion-based gradient generator for dynamic cell assays. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 2, p. 309-316, 2012.

CAMPOS, R. P. S. **Modificação de poli (dimetilsiloxano) para aplicações em micro sistemas de análise total** 2012. 121 (Mestrado). Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DUFFY, D. C. et al. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). **Analytical chemistry**, v. 70, n. 23, p. 4974-4984, 1998. ISSN 0003-2700.

KIM, S.; KIM, H. J.; JEON, N. L. Biological applications of microfluidic gradient devices. **Integrative Biology**, v. 2, n. 11-12, p. 584-603, 2010.

LIN, Y.-H.; PAN, T.-M.; WU, M.-T. Microfluidic Technology and Its Biological Applications. In: (Ed.). **Enabling Technologies**: Elsevier, 2011. cap. 5, p.141 - 157.

SAADI, W. et al. Generation of stable concentration gradients in 2D and 3D environments using a microfluidic ladder chamber. **Biomedical microdevices**, v. 9, n. 5, p. 627-635, 2007. ISSN 1387-2176.

SOMMER, G. J. et al. Introduction to microfluidics. In: TIAN, W.-C. & FINEHOUT, E. (Ed.). **Microfluidics for biological applications**. New York: Springer Science, 2008. cap. 1, p.1-34.

## CAPÍTULO 4 – COMPORTAMENTO CELULAR MICROBIANO EM GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DIFUSIVO

---

### 1 INTRODUÇÃO

A manipulação de moléculas no espaço e no tempo, por meio da geração de gradientes através da microfluidica, possibilita a utilização desta técnica para triagem de bioprocessos. Tais características permitem investigar a concentração ideal de moléculas de interesse (YE *et al.*, 2007), avaliar o comportamento de células em diferentes situações, mecanismo celular e bioquímica, principalmente células animais (WEIBEL & WHITESIDES, 2006; TAVANA *et al.*, 2008).

A microfluídica possibilita também a realização de vários ensaios concomitantemente, gerando informações que estão sendo investigadas de forma rápida. Além disso, a semelhança com o ambiente celular permite comparar os resultados obtidos em sistemas microfluídicos com as técnicas convencionais (HEGAB *et al.*, 2013).

Assim, geração de um gradiente de concentração de substratos em sistemas microfluídicos tem o potencial para determinar as condições ideais para o crescimento microbiano, no entanto, esta área ainda é pouco explorada na biotecnologia industrial. O campo de bioprocessos é uma das áreas que pode se beneficiar com o emprego da microfluidica geradora de gradiente de concentração difusivo, uma vez que o desenvolvimento de bioprocessos demanda altos custos e tempo operacional para a seleção das condições ótimas de reação.

Diante disso, este trabalho visa a utilização do dispositivo microfluídico vidro-vidro com geração de gradiente difusivo, tendo microcanais em triplicata, para investigação do cultivo microbiano e determinação de parâmetros cinéticos e compará-los com o cultivo convencional em batelada.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754, gentilmente doada pelo Professor Doutor Ranulfo Monte Alegre da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, foi cultivada em meios de cultura YPDA (*Yeast-Peptone-Dextrose Agar*) e YPD (*Yeast-Peptone-Dextrose*), respectivamente para o crescimento em meio sólido e líquido e, solução tampão PBS (fosfato-salino) pH 6,0 para efetuar as diluições seriadas.

#### 2.1.2 *Saccharomyces cerevisiae* em sistema microfluídico

Devido à escala micrométrica do sistema microfluídico, utilizou-se uma concentração de *S. cerevisiae* ATCC 7754 de  $\sim 0,5 \times 10^2$  cel/ $\mu$ L.

De forma a comprovar a presença das células no dispositivo microfluídico utilizou-se, em um dos ensaios, o reagente fluorescente FUN 1 numa concentração de 20  $\mu$ M do kit Live/Dead® Yeast Viability (Molecular Probes, Invitrogen).

#### 2.1.3 Dispositivo Vidro-vidro

Foi utilizado o dispositivo Vidro-vidro, montado e esterilizado conforme descrito no capítulo 3, item 2.2.1.

### 2.2 Metodologia

#### 2.2.1 Cultivo de *Sacchomyces cerevisiae* ATCC 7754

## CAPÍTULO 4

Com o objetivo de verificar a viabilidade e pureza da *S. cerevisiae*, inoculou-se a cepa em meio YPDA (*Yeast-Peptide-Dextrose Agar*) contendo: extrato de levedura 10 g/L; peptona 20 g/L; dextrose 20 g/L e Ágar 20 g/L; pH 5,0; em tubos de meio Ágar inclinado e cultivada a 30 °C por 72 h.

A cepa foi mantida em refrigerador a 4 °C em tubos de ensaio com ágar inclinado, sendo realizados os repiques a cada 90 dias para manutenção do inóculo.

Para os ensaios, as cepas foram pré-adaptadas em meio líquido YPD, pH 5,0, em agitação recíproca (~100 rpm) a 30 °C por 24 h e feito a diluição seriada em solução tampão PBS.

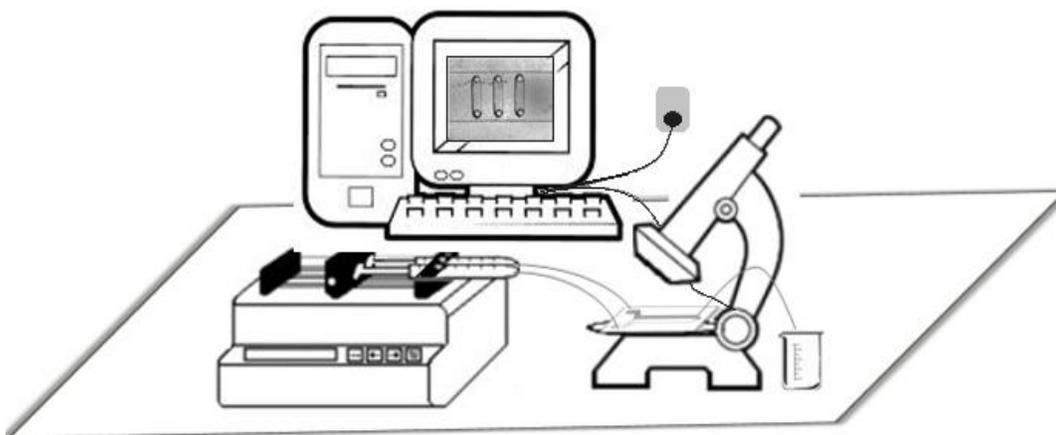
### 2.2.2 Operação do sistema microfluídico com *S. cerevisiae*

A operação do sistema microfluídico contendo *S. cerevisiae* foi realizada em dispositivo vidro-vidro, produzido da forma descrita no item 2.2.1, do capítulo 3. Os componentes dos dispositivos microfluídicos e os acessórios foram lavados com detergente neutro e álcool 70% e esterilizados em radiação por luz UV por 1 h.

O sistema microfluídico foi montado em fluxo laminar, como descrito no item 2.2.1 do capítulo 3, e inserido a suspensão celular, de concentração conhecida, nas câmaras de cultivo. Esta adição foi realizada com auxílio de micropipeta com volume de 2 µL e o dispositivo foi fechado.

Para impor a diferença de concentração de glicose utilizou-se duas soluções desgaseificadas de meio YPD variando apenas a concentração de glicose, sendo um meio contendo determinada concentração de glicose e outro ausente de glicose. A vazão das soluções foi de 15 µL/min usando seringas Hamilton de 10 mL, operado em bomba tipo seringa.

O crescimento microbiano nos microcanais foi observado usando microscópio confocal (Zeiss LSM780-NLO; Carl Zeiss AG, Germany) com sistema de controle de temperatura (Pecon GmbH, Germany) a 30 °C. As imagens dos três microcanais foram capturadas a cada 1 h, num período de 10 h e em condição anaeróbia (Figura 29).



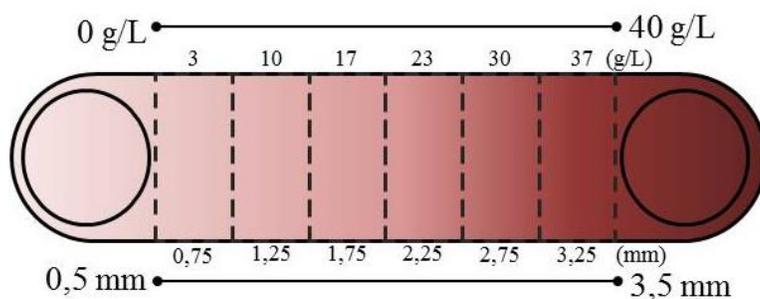
**Figura 29:** Esquema de operação do sistema microfluídico com injeção dos fluídos por bomba seringa, microscópio com câmera e computador com *software* para observação das imagens.

Os ensaios foram realizados no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicado à Biologia Celular (INFABIC), localizado no Instituto de Física Gleb Wataghin (IFGW-Unicamp).

### 2.2.3 Avaliação das células de *S. cerevisiae* nos dispositivos microfluídicos

A partir das imagens adquiridas do sistema microfluídico ao longo do tempo, realizou-se a contagem direta das células. Para as imagens contendo fluorescência utilizou-se o *software* ImageJ (National Institutes of Health, USA) usando a ferramenta *Analyze Particles*. Enquanto que as células com luz transmitida, realizou-se as contagens manualmente a partir das imagens visualizadas no *software* ZEN 2012 (Carl Zeiss AG, Germany).

Para as contagens diretas determinou-se intervalos de 0,5 mm (para o gradiente de 0 a 40 g/L de glicose) e 0,25 mm (gradiente de 0 a 3 g/L), denominados de microcâmaras (Figura 30). Foram excluídos os pontos extremos dos microcanais porque não há geração de gradiente nestas regiões, uma vez que são as portas de acesso das correntes das soluções de concentrações diferentes de glicose ao microcanal (Figura 30).



**Figura 30:** Esquema ilustrativo da câmara onde o gradiente de concentração difusivo foi gerado em dispositivo microfluídico. Nesta câmara, as células foram inoculadas e observadas o seu crescimento ao longo do tempo. Para efetuar esta contagem, a câmara foi subdividida em compartimentos de 0,5 mm de comprimento, para concentração de glicose variando entre 0 e 40 g/L, compondo 6 microcâmaras. Enquanto que para o gradiente variando entre 0 e 3 g/L de glicose, 11 microcâmaras de 0,25 mm foram geradas (pequeno deslocamento de encaixe na composição do microcanal).

A partir da caracterização realizada no capítulo 3, item 4.3, o qual confirma o gradiente de concentração imposto é linear, para cada microcâmara estabeleceu-se o valor da concentração média daquele determinado intervalo. Para indicar a concentração média de cada microcâmara, correlacionou-se o ponto médio de distância do microcanal com o as concentrações médias de cada experimento (Tabela 5 e Tabela 6).

**Tabela 5:** Distância do microcanal (mm) e seus respectivos perfis de gradiente de glicose (g/L) no intervalo de 0 a 40 g/L de glicose.

Perfis de glicose nas microcâmaras (0 a 40 g/L de glicose)			
Distância do microcanal (mm)	Ponto médio (mm)	Intervalo de concentração de glicose (g/L)	Concentração média de glicose (g/L)
0 – 0,5	Não há gradiente	0	0
0,5 – 1,0	0,75	0 – 6	3
1,0 – 1,5	1,25	6 – 13	10
1,5 – 2,0	1,75	13 – 20	17
2,0 – 2,5	2,25	20 – 27	23
2,5 – 3,0	2,75	27 – 33	30
3,0 – 3,5	3,25	33 – 40	37
3,5 – 4,0	Não há gradiente	40	40

Além disso, determinou-se subdivisões em dimensões de 0,25 mm para avaliar o efeito do gradiente de glicose nestas microcâmaras (Tabela 6).

**Tabela 6:** Distância do microcanal (mm) e as subdivisões em microcâmaras de 0,25 mm para o gradiente de 0 a 3 g/L de glicose.

<b>Perfis de glicose nas microcâmaras (0 a 3 g/L de glicose)</b>			
Distância do microcanal (mm)	Ponto médio (mm)	Intervalo de concentração de glicose (g/L)	Concentração média de glicose (g/L)
0 – 0,50	Não há gradiente	0	0
0,50 – 0,75	0,62	0 – 0,25	0,12
0,75 – 1,00	0,88	0,25 – 0,50	0,38
1,00 – 1,25	1,12	0,50 – 0,75	0,62
1,25 – 1,50	1,38	0,75 – 1,00	0,88
1,50 – 1,75	1,62	1,00 – 1,25	1,12
1,75 – 2,00	1,88	1,25 – 1,50	1,38
2,00 – 2,25	2,12	1,50 – 1,75	1,62
2,25 – 2,50	2,38	1,75 – 2,00	1,88
2,50 – 2,75	2,62	2,00 – 2,25	2,12
2,75 – 3,00	2,88	2,25 – 2,50	2,38
3,00 – 3,25	3,12	2,50 – 2,75	2,62
3,25 – 3,50	3,38*	2,75 – 3,00	2,88
3,50 – 4,00	Não há gradiente	3	3

\*Microcâmara desconsiderada devido ao descolamento no encaixe do orifício com o microcanal inferior no ato da montagem do dispositivo, como descrito do item 2.2.1, capítulo 3.

#### 2.2.4 Cultivo em batelada

Para o cultivo em batelada realizou-se os ensaios usando meio YPD, pH 4,5, variando apenas a concentração de glicose: 0 (controle), 10, 20, 30 e 40 g/L de glicose, sendo usado 100 mL de meio e concentração inicial de  $\sim 0,5 \times 10^2$  cel/ $\mu$ L. A fermentação foi conduzida a 30° C, por 10 h e agitação orbital constante de 100 rpm.

Determinou-se a concentração celular através da leitura de absorbância (600 nm) a cada 1 h com o auxílio de curva de calibração obtida por contagem em câmara de Neubauer (Anexo 1).

#### 2.2.5 Determinação dos parâmetros cinéticos

## CAPÍTULO 4

Para determinar a velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) da *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 foi considerada a inclinação da região linear da curva de crescimento semi-logaritma através da Equação 1:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dx}{dt} \quad (\text{Equação 1})$$

Considerando cinética de crescimento conforme Equação de Monod, a velocidade específica de crescimento máxima ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) e a constante de saturação ( $k_s$ ), a qual indica afinidade do micro-organismo pelo substrato (S) (MONOD, 1949), podem ser determinadas de acordo com a Equação 2:

$$\text{—————} \quad (\text{Equação 2})$$

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Comportamento da *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 em ambiente de gradiente de concentração difusivo

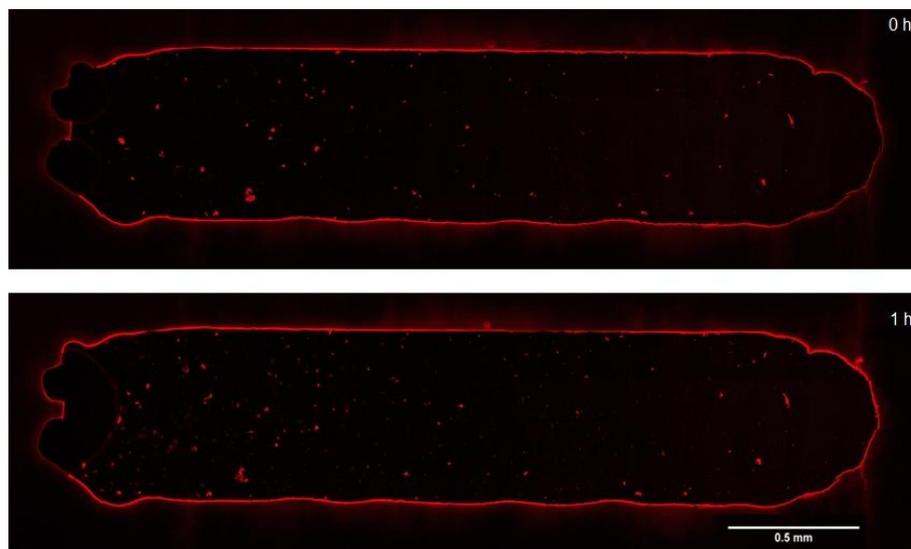
O dispositivo microfluídico Vidro-vidro mostrou-se adequado para o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754, uma vez que observou um aumento no número de células durante o tempo, permitindo a investigação dos parâmetros cinéticos e comparação com ensaios convencionais de cultivo em batelada e dados da literatura.

Além disso, avaliou-se o funcionamento do dispositivo Vidro-vidro para distintos intervalos de concentração, bem como a utilização de subdivisões do microcanal com dimensões diferentes para contagens de células.

### 3.1.1 Perfil de crescimento celular em dispositivo microfluídico com gradiente de concentração difusivo

O dispositivo Vidro-vidro foi capaz de gerar gradiente de concentração linear e puramente difusivo e ambiente anaeróbio. Em seguida, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 foi inoculada no dispositivo microfluídico. Na câmara superior manteve-se o escoamento de meio YPD nas duas entradas, sendo que apresentava meio YPD sem glicose e outra o meio YPD com 40 g/L de glicose.

O comportamento celular foi monitorado por 10 h e observou-se o crescimento da levedura no gradiente de substrato imposto (Figura 31).

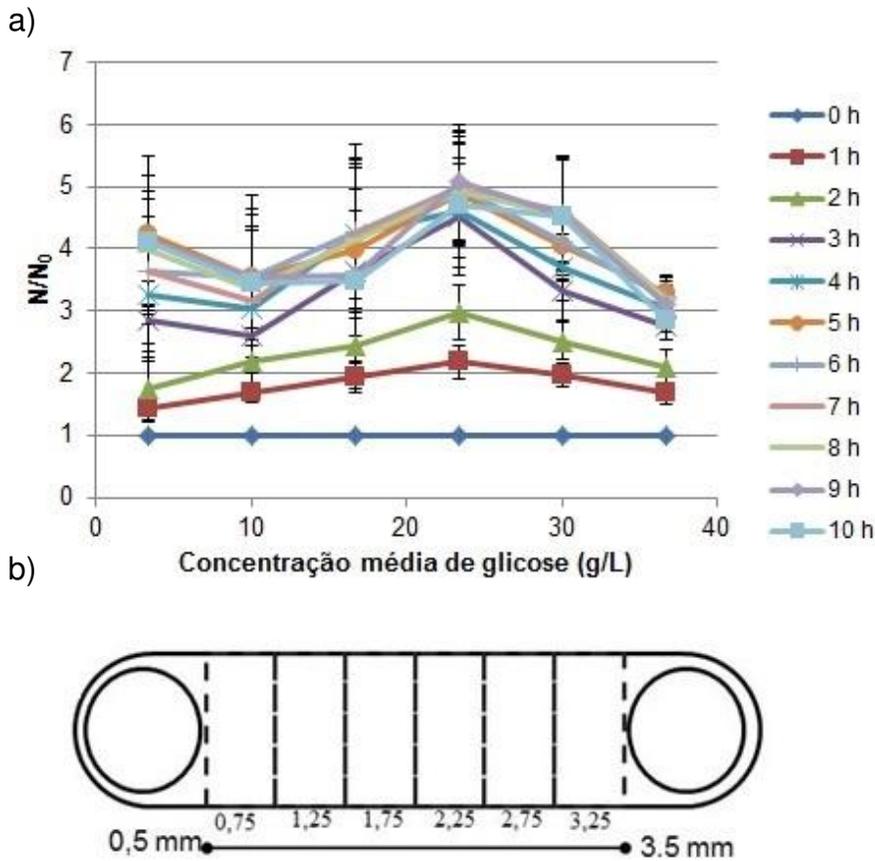


**Figura 31:** Imagem do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 ao longo do microcanal e do tempo: células com fluorescência FUN 1 a 20  $\mu\text{M}$ , experimento teste com gradiente de 40 a 0 g/L de glicose, nos tempos 0 e 1 h, com concentração inicial de  $1,02 \times 10^3$  cel/ $\mu\text{L}$ .

Adotou-se inicialmente um gradiente de concentração de glicose variando de 0 a 40 g/L, usando o meio de cultura YPD com pH inicial de 4,5 para fermentação. Em seguida, observou-se o comportamento da *S. cerevisiae* ao longo dos microcanais por 10 h, sendo que no ensaio teste (Figura 31) a alta

concentração de células para o microcanal fez com que as células se distribuíssem, praticamente, de forma homogênea no microcanal. Por isso, observamos a importância de utilizar uma baixa concentração de células nas câmaras microfluídicas.

Em ensaio usando menor concentração celular, a cada hora, foi possível obter em microscópio automatizado as imagens das células ao longo da câmara de gradiente de concentração. A partir destas imagens, realizou-se a contagem direta das células nas microcâmaras de gradiente (Figura 32.a), correlacionando com a posição no microcanal e conseqüentemente com a concentração de glicose (Figura 32.b).



**Figura 32:** Cultivo em microcanal microfluídico: a) perfis de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 ao longo do microcanal (posição) e do tempo ( $N_0 \sim 0,5 \times 10^2$  cel/  $\mu\text{L}$ ), as barras de erros representam o erro padrão das triplicatas e b) diagrama esquemático da microcanal e as subdivisões de contagem de células (microcâmaras de 0,5 mm).

Pode-se observar na Figura 32.a que após 3 h de acompanhamento do crescimento celular houve maior número de células nas microcâmaras com 23 e 30 g/L de glicose e este comportamento se manteve até 10 h, o período avaliado (Figura 32.a). Nesta faixa de concentração o resultado observado foi correspondente ao esperado, uma vez que a concentração ótima de glicose para o crescimento celular não deve ser maior do que 25% (w/v), pois na fase inicial de crescimento a levedura utiliza a glicose para o seu metabolismo e um elevado teor deste açúcar eleva a pressão osmótica do meio (SONNLEITNER & KÄPPELI, 1986; BAI *et al.*, 2008).

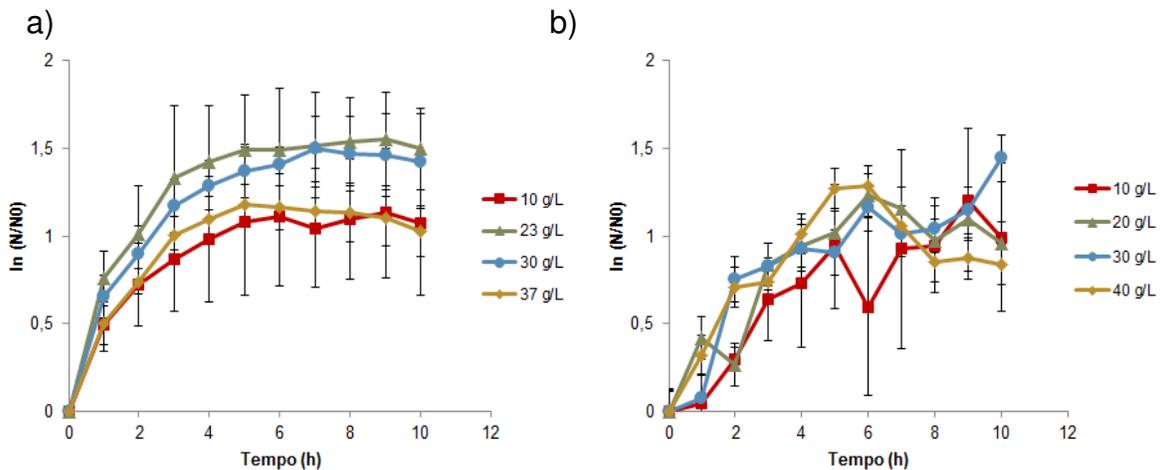
Desta forma, pode-se notar que as células da levedura apresentaram o mesmo comportamento esperado em um sistema de fermentação convencional, comprovando-se a viabilidade da avaliação do crescimento microbiano nesta faixa de concentração de glicose e conseqüente determinação dos parâmetros cinéticos em sistema microfluídico.

### 3.1.2 Cinética de crescimento e comparação com cultivo convencional em batelada

Uma vez observado o crescimento celular no dispositivo microfluídico e tendo o número de células para cada microcâmara de gradiente ao longo de 10 h, pode-se construir as curvas de crescimento microbiano para cada faixa de concentração de glicose obtidas do dispositivo microfluídico Vidro-vidro e determinado a velocidade específica de crescimento da levedura nestas condições (Figura 33.a).

Para comparar os resultados obtidos com o dispositivo microfluídico, realizou-se uma série de cultivos em sistema batelada usando as concentrações de 0 g/L de (controle), 10, 20, 30 e 40 g/L de glicose, em triplicata, tendo as mesmas condições usadas no dispositivo microfluídico e concentração celular de  $\sim 0,5 \times 10^2$  cel/ $\mu$ L. Desta forma, pode-se construir as curvas de crescimento microbiano ao longo de 10 h de ensaio em sistema batelada (Figura 33.b).

## CAPÍTULO 4



**Figura 33:** Curvas de crescimento da *S. cerevisiae* ATCC 7754 em: a) dispositivo microfluídico, sendo observado o perfil de crescimento em câmara com gradiente linear de concentração de glicose, variando de 40 a 0 g/L e b) cultivo convencional em batelada: sendo observado o crescimento em meio YPD com concentrações de 10, 20, 30 e 40 g/L e meio YPD sem glicose, apenas como controle, cujo LN ( $N/N_0$ ) manteve-se próximo a 0,5. Em ambos os sistemas,  $N_0 \sim 0,5 \times 10^2$  cel/ $\mu$ L e as barras de erros representam o erro padrão de triplicatas independentes.

No sistema microfluídico foi observado um perfil de crescimento com maior número de células nas condições de 23 a 30 g/L de glicose, tendo comportamento similar ao cultivo em batelada. No entanto, a concentração de glicose é constante na microfluídica e por isso foi utilizado um volume de 100 mL meio YPD para o cultivo em batelada, com a mesma concentração inicial de células empregada na microfluídica ( $0,5 \times 10^2$  cel/ $\mu$ L), a fim de tentar reproduzir a mesma condição. Sendo assim, no cultivo em batelada foi observado um menor número de células com maiores oscilações ao longo do tempo.

Ainda assim, após obter as curvas de crescimento microbiano em ambos os sistemas, foram determinadas as velocidades específicas de crescimento máximas da levedura em sistema microfluídico ( $\mu_{x(M)}$ ) e cultivo em batelada convencional ( $\mu_{x(B)}$ ), conforme observado Tabela 7.

**Tabela 7:** Comparação entre a velocidade específica de crescimento da *S. cerevisiae* ATCC 7754 em sistema microfluídico com gradiente de concentração e fermentação batelada.

CULTIVO EM SISTEMA MICROFLUIDICO		CULTIVO CONVENCIONAL EM BATELADA	
Concentração média de glicose (g/L)	$\mu_{x(M)}$ ( $h^{-1}$ ) ( $\mu_x \pm DP$ )	Glicose (g/L)	$\mu_{x(B)}$ ( $h^{-1}$ ) ( $\mu_x \pm DP$ )
3	0,17 $\pm$ 0,12	10	0,21 $\pm$ 0,23
10	0,20 $\pm$ 0,17		
16	0,24 $\pm$ 0,19	20	0,24 $\pm$ 0,16
23	0,24 $\pm$ 0,14		
30	0,24 $\pm$ 0,02	30	0,21 $\pm$ 0,01
36	0,20 $\pm$ 0,07	40	0,19 $\pm$ 0,05

$p > 0, 01$ : não há diferença estatisticamente significativa entre as médias das velocidades específicas de crescimento obtidas entre sistemas microfluídica e cultivo em batelada. DP: Desvio padrão de triplicatas.

A partir da Tabela 7 observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das velocidades específicas de crescimento, uma vez que os experimentos em microfluídica e na batelada convencional foram conduzidos a concentrações celulares baixas e qualquer valor dentro da faixa de concentração de glicose estudada correspondia a uma quantidade suficiente para sustentar o crescimento microbiano.

No trabalho de Taherzadeh *et al.* (1997), a velocidade específica de crescimento da *Sacchormyces cerevisiae* em fermentação batelada a pH de 5,0 e concentração inicial de glicose 50 g/L foi de 0,45  $h^{-1}$ . Enquanto que na faixa estudada para cultivo de células, com baixa concentração inicial celular, a concentração de glicose foi de 10 a 40 g/L obtendo um  $\mu_x$  foi de 0,24  $\pm$  0,16  $h^{-1}$ .

No entanto, para uma concentração inicial de 20 g/L de glicose, conduzido em batelada alimentada, a velocidade específica de crescimento da *S. cerevisiae* foi de  $\mu_x = 0,24 h^{-1}$  (AIBA *et al.*, 1976), mostrando a diferença entre os dois sistemas de fermentação em função do consumo do substrato, sendo que na batelada alimentada não há variação de substrato pelo consumo, e tal característica é semelhante à condição da microfluídica, porém na batelada alimentada não há variação de células devido a diluição.

Tais considerações mostram que a microfluídica possui uma modelagem diferente tanto do sistema de fermentação batelada quanto batelada alimentada,

pois na microfluídica a concentração de substrato é constante, no entanto há variação de células. Isso aponta a possibilidade do emprego do dispositivo microfluídico para avaliar quantitativamente o crescimento microbiano sem variação de substrato, como a glicose, e ser utilizado como um método de seleção rápida dos parâmetros cinéticos.

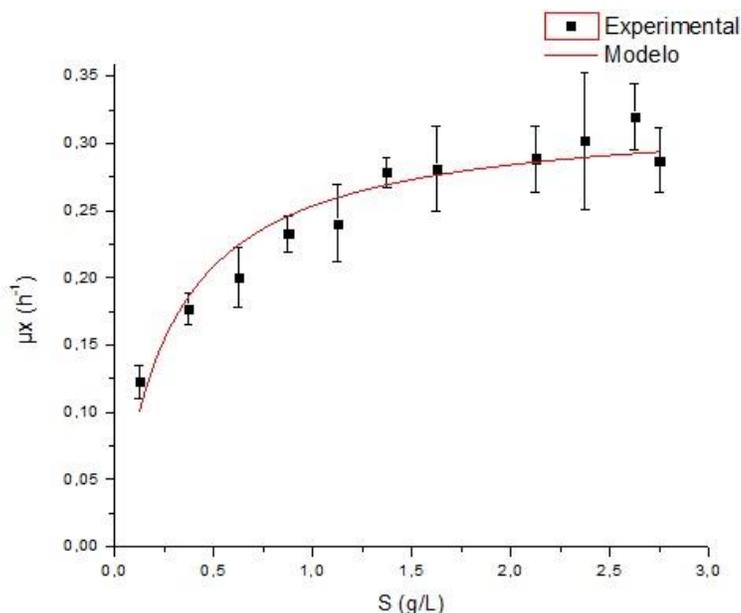
### 3.1.3 Cinética de Monod na microfluídica

As condições da microfluídica e a obtenção das velocidades específicas de crescimento celular neste sistema permitem ampliar as investigações de cinética de crescimento, com isso pode-se investigar os parâmetros da cinética de crescimento celular descrita pela equação de Monod. Ainda, é possível a avaliação do funcionamento do dispositivo em menores concentrações do substrato limitante e com intervalos menores de microcâmaras para contagens a fim de comparar o efeito do próprio gradiente dentro da microcâmara.

Sabendo que a concentração de glicose é constante no microcanal, isso possibilita a determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento de Monod, não apenas nos tempos iniciais, como são feitos nos sistemas convencionais, uma vez que a variação do substrato influencia nos resultados.

Desta forma, em um gradiente de 0 a 3 g/L de glicose e com microcâmaras de contagem com intervalos menores, determinou-se o perfil do crescimento microbiano em função do substrato limitante (S) (glicose) (Figura 34). A partir da obtenção dos dados experimentais, a constante de saturação ( $k_s$ ), e a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), descritos pela Equação de Monod (Equação 2), podem ser estimados.

Através do ajuste não linear por mínimos quadrados, usando o *software* Origin® 8.0 (OriginLab Corporation, Massachusetts, USA), obteve-se os valores de  $0,32 \pm 0,014 \text{ h}^{-1}$  e  $0,27 \pm 0,045 \text{ g/L}$ , respectivamente, para  $\mu_{\text{máx}}$  e  $k_s$  (Figura 34).



**Figura 34:** Dados experimentais (■) e modelo (linha contínua), obtida a partir de ajuste dos mínimos quadrados). Parâmetros cinéticos estimados para a cinética de crescimento celular para *S. cerevisiae*, descrito por Monod. Através deste gráfico obteve-se os valores para  $\mu_{\text{máx}} = 0,32 \pm 0,014 \text{ h}^{-1}$  e  $K_s = 0,27 \pm 0,045 \text{ g/L}$ . As barras de erro para os dados experimentais indicam o erro padrão das triplicatas ( $N_0 = 64 \text{ cel}/\mu\text{L}$ ).

Através desta curva de crescimento e os resultados para os parâmetros cinéticos, descritos pela equação de Monod (Equação 2), nota-se que os dados cinéticos obtidos na microfluídica estão coerentes com os dados da literatura, os quais foram determinados pela fermentação convencional (Tabela 8).

**Tabela 8:** Valores de  $k_s$  e  $\mu_{\text{máx}}$  em sistemas de fermentação convencional e sistema microfluídico.

Tipo de fermentação	$k_s$ (g/L)	$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Referência
Sistema microfluídico	0,27	0,32	Gradiente de 0 a 40 g/L de glicose
Batelada	0,5	0,17	(SONNLEITNER & KÄPPELI, 1986)
Batelada	4,56	0,24	(KOREN & DUVNJAK, 1993)
Batelada alimentada	0,5	0,42	(AMILLASTRE <i>et al.</i> , 2012)
Batelada alimentada	3,6	0,49	(POSTMA <i>et al.</i> , 1989)

## CAPÍTULO 4

Diante do exposto, nota-se que os dados cinéticos obtidos pela equação de Monod no sistema microfluídico são aceitáveis, em que o valor obtido para  $k_s$  confirma a alta afinidade da levedura pela glicose como substrato, uma característica deste tipo de micro-organismos. Por outro lado, o  $\mu_{m\acute{a}x}$  é um fator que pode ser alterado conforme as condições de cultivo, como pH e temperatura (SONNLEITNER & KÄPPELI, 1986), por isso pode apresentar valores variáveis para cada tipo de ensaio

No ensaio utilizando o dispositivo microfluídico os resultados foram obtidos de forma mais prática e num ambiente controlado para o cultivo microbiano. Enquanto que na fermentação convencional, a afinidade da *Saccharomyces cerevisiae* pela molécula de glicose é determinada por um método trabalhoso e que demanda de precisão nas análises, investigando este dado cinético sem variação do substrato limitante. Por isso exige um controle rigoroso no ambiente e que forneça condições ótimas para o desempenho do microrganismo, o que nem sempre é obtido em macroescala.

Em sistemas convencionais de fermentações em batelada, este processo é ainda mais complicado, uma vez que, devido à dinâmica do sistema, a concentração de substrato é variável, devendo ser definido um intervalo de tempo para obtenção destes parâmetros cinéticos, gerando variações entre os resultados (STARZAK *et al.*, 1994; SNOEP *et al.*, 2009). Por outro lado, no sistema microfluídico a concentração de substrato se mantém constante dentro do microcanal, pois há fornecimento contínuo e isso permite avaliar o comportamento celular por maior intervalo de tempo sem que haja variação do substrato pelo consumo.

Desta forma, nota-se a viabilidade deste dispositivo microfluídico com formação de gradiente difusivo para investigar os parâmetros cinéticos do microrganismo e com isso aumentar a produtividade de uma reação em bioprocessos.

### 3.2 Análise crítica do perfil de gradiente no dispositivo microfluídico

Para os ensaios microfluidicos com gradiente de glicose e células nos microcanais determinou-se uma baixa concentração de células, na ordem de  $0,5 \times 10^2$  cel/ $\mu$ L, para que não houvesse perturbação do gradiente linear e nem tanto a obstrução do microcanal pela quantidade de células.

Além disso, avaliou-se a interferência do gradiente dentro das microcâmaras de 0,5 mm e 0,25 mm de intervalo, bem como perfis diferentes de concentração no dispositivo.

No experimento conduzido com gradiente de glicose entre 0 e 40 g/L utilizou-se microcâmaras de 0,5 mm, conferindo numa variação de 6,67 g/L por microcâmaras, como mostrado na Tabela 5. Tal variação de gradiente dentro da própria microcâmara pode ter influenciado nos erros padrão das contagens.

Por outro lado, observou-se que num menor intervalo de gradiente, como visto no ensaio de 0 a 3 g/L, tendo definidos microcâmaras com 0,25 mm, conferindo numa variação de 0,27 g/L de glicose em cada microcâmara, pode-se notar uma menor perturbação de gradiente, minimizando os erros de contagens e variação de glicose na microcâmara. Devido a isso, os resultados obtidos por este ensaio podem apresentar menor influência pela gradiente.

No entanto, o gradiente em ambos os casos são lineares com mínima interferência das células, devido a baixa concentração celular, e mantendo constante o substrato ao longo do tempo. Sendo assim, para cada ensaio usando este dispositivo microfluídico deve-se considerar a necessidade de variação de gradiente e intervalos de contagem.

## 4 CONCLUSÃO

O dispositivo de microfluídico Vidro-vidro mostrou-se aplicável para o cultivo microbiano, tendo parâmetros cinéticos semelhantes ao cultivo convencional o que pode contribuir em bioprocessos.

## CAPÍTULO 4

Ainda, este sistema microfluídico com geração de gradiente de concentração difusivo permitiu a determinação da cinética de Monod com valores coerentes aos da literatura, sendo que os resultados foram obtidos de forma mais prática quando comparados às técnicas convencionais.

Diante disso, o dispositivo microfluídico proposto mostrou-se eficiente para determinação de parâmetros cinéticos e a viável para a otimização em bioprocessos.

### REFERÊNCIAS

AIBA, S.; NAGAI, S.; NISHIZAWA, Y. Fed batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*: A perspective of computer control to enhance the productivity in baker's yeast cultivation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 18, n. 7, p. 1001-1016, 1976. ISSN 1097-0290. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260180712> >.

AMILLASTRE, E. et al. Dynamic model of temperature impact on cell viability and major product formation during fed-batch and continuous ethanolic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 117, n. 0, p. 242-250, 2012. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412006153> >.

BAI, F.; ANDERSON, W.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology advances**, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008. ISSN 0734-9750.

HEGAB, H. M.; ELMKAWY, A.; STAKENBORG, T. Review of microfluidic microbioreactor technology for high-throughput submerged microbiological cultivation. **Biomicrofluidics**, v. 7, p. 021502, 2013.

KOREN, D. W.; DUVNJAK, Z. Kinetics of the selective fermentation of glucose from glucose/fructose mixtures using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36859. **Acta Biotechnologica**, v. 13, n. 4, p. 311-322, 1993. ISSN 1521-3846. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/abio.370130402> >.

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 371-394, 1949. ISSN 0066-4227.

POSTMA, E.; ALEXANDER SCHEFFERS, W.; VAN DIJKEN, J. P. Kinetics of growth and glucose transport in glucose-limited chemostat cultures of

*Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066. **Yeast**, v. 5, n. 3, p. 159-165, 1989. ISSN 1097-0061.

SNOEP, J. L. et al. Control of specific growth rate in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 155, n. 5, p. 1699-1707, 2009. ISSN 1350-0872.

SONNLEITNER, B.; KÄPPELI, O. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 6, p. 927-937, 1986. ISSN 1097-0290. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260280620> >.

STARZAK, M. et al. Macroapproach kinetics of ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: experimental studies and mathematical modelling. **The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal**, v. 54, n. 3, p. 221-240, 1994. ISSN 0923-0467.

TAHERZADEH, M. J.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Acetic acid—friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*? **Chemical Engineering Science**, v. 52, n. 15, p. 2653-2659, 1997. ISSN 0009-2509. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250997000808> >.

TAVANA, H. et al. Microfluidic Systems for Cellular Applications. In: WEI-CHENG TIAN, E. F. (Ed.). **Microfluidics for Biological Applications** New York: Springer, 2008. cap. 6, p.185 - 215.

WEIBEL, D. B.; WHITESIDES, G. M. Applications of microfluidics in chemical biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 6, p. 584-591, 2006. ISSN 1367-5931.

YE, N. et al. Cell-based high content screening using an integrated microfluidic device. **Lab on a Chip**, v. 7, n. 12, p. 1696-1704, 2007.

## CONCLUSÕES GERAIS

---

Diante dos resultados obtidos, do presente trabalho que visou à construção de dispositivos microfluídicos capazes de gerar gradiente de concentração difusivo e avaliar a aplicabilidade com células microbianas, concluiu-se que:

- A geometria e as composições dos modelos de dispositivos microfluídicos propostos, Vidro-vidro; Vidro-PDMS e Vidro-mPDMS, apresentaram selagem eficiente, permitindo um escoamento estável das correntes do nível superior e capacidade de geração de gradiente no nível inferior.
- Os três modelos de dispositivos propostos apresentaram formação de gradiente de concentração linear e puramente difusivos nas câmaras inferiores, mostrando-se aplicáveis para estudos com células.
- O dispositivo Vidro-vidro apresentou características importantes para estudos com células livres e anaeróbias.
- Diante dos estudos realizados com o dispositivo microfluídico do tipo vidro-vidro, notou-se a aplicabilidade para avaliação de cultivos com *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754, devido à possibilidade de determinação dos parâmetros cinéticos. Além disso, os resultados obtidos pelo sistema microfluídico e cultivo em bateladas foram estatisticamente iguais e coerentes com os dados da literatura, o que viabiliza aplicação da microfluídica para otimização de bioprocessos.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

---

Para dar continuidade de pesquisas envolvendo a utilização de dispositivos microfluidicos com capacidade de gerar gradiente de concentração difusivo, sugere-se:

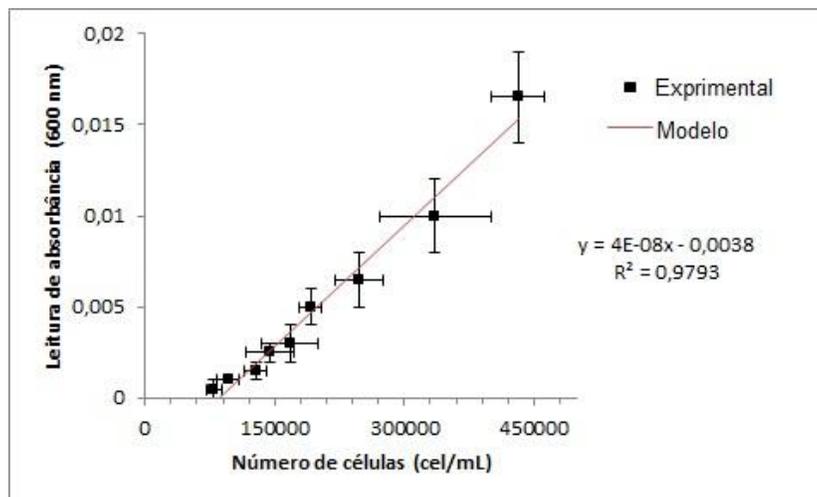
- Avaliar o comportamento de células nos dispositivos microfluídicos do tipo Vidro-PDMS e Vidro-mPDMS.
- Utilizar outros micro-organismos nos dispositivos propostos, inclusive patógenos anaeróbios.
- Observar a viabilidade celular dentro dos dispositivos microfluídicos por meio de marcadores de fluorescência e comparar os dados cinéticos com fermentações convencionais.
- Avaliar o potencial dos dispositivos microfluídicos para ensaios que envolvam quimiotaxia.
- Num panorama geral, esse sistema microfluídico ainda se aplica para outras áreas de bioprocessos como enzimologia, processo de transferência de massa e investigação de diferentes fontes de nutrientes para o cultivo microbiano.

## ANEXOS

**Anexo 1:** Curva de calibração do número de células, contagem por câmara de Neubauer, pela leitura de absorbância (600 nm)

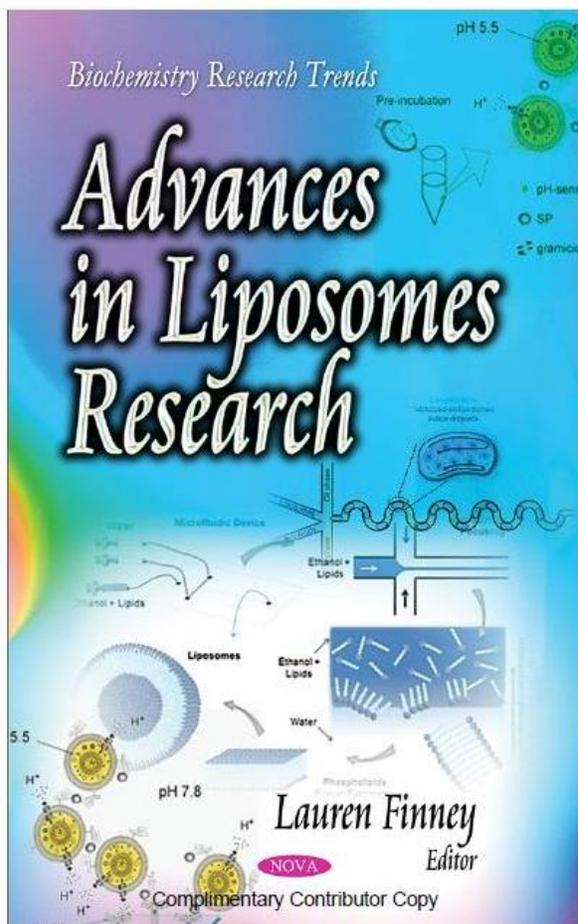
**Tabela 9:** Curva de calibração do número de células por leitura de absorbância (600 nm)

Número de células (cel/mL)	Absorbância (600 nm)
$4,32 \times 10^5$	0,0165
$3,36 \times 10^5$	0,01
$2,48 \times 10^5$	0,0065
$1,92 \times 10^5$	0,005
$1,68 \times 10^5$	0,003
$1,44 \times 10^5$	0,0025
$1,28 \times 10^5$	0,0015
$9,60 \times 10^4$	0,001
$8,00 \times 10^4$	0,0005



**Figura 35:** Curva de calibração da contagem de células (por câmara de Neubauer) por leitura de absorbância (600 nm) e os barras de erros representam o erro padrão das triplicatas, das contagens e das leituras de absorbância.

**Anexo 2:** Capítulo sobre os avanços da microfluídica para lipossomas, publicado no livro *Advances in Liposomes Researches*, editora NovaPublisher, onde contribui na descrição de técnicas de construção e materiais para sistemas microfluídicos.



In: *Advances in Liposomes Research*  
Editor: Lauren Finney

ISBN: 978-1-63117-074-4  
© 2014 Nova Science Publishers, Inc.

Chapter 3

**TRENDS ON MICROFLUIDIC LIPOSOME PRODUCTION THROUGH HYDRODYNAMIC FLOW-FOCUSING AND MICRODROPLET TECHNIQUES FOR GENE DELIVERY APPLICATIONS**

*Lucimara Gaziola de la Torre\*, Tiago Albertini Balbino, Caroline Casagrande Sipoli, Micaela Tamara Vitor and Aline Furtado Oliveira*  
School of Chemical Engineering,  
University of Campinas, Brazil

**ABSTRACT**

Recent studies on liposome production for gene delivery have aimed to obtain final formulations with physicochemical properties, like size and polydispersity in optimum ranges for biological applications without the need for post-processing steps. In this context, microfluidics emerges as a promising technology to overcome the major challenges of the pharmaceutical industry, especially for gene delivery purposes. In this field, microfluidic hydrodynamic focusing (MHF) technique and microfluidic based in droplets were used for liposomes production and to

\* E-mail address: latorre@feq.unicamp.br.

Complimentary Contributor Copy

**Anexo 3:** Trabalho aprovado para o Congresso Brasileiro de Engenharia Química, com parecer para apresentação oral do trabalho.



## Resumo aprovado



Prezado(a) Aline Oliveira,

\*Parabéns!

\*Temos o prazer em informar que seu resumo intitulado "Gradiente de concentração em dispositivo microfluidico para otimização de bioprocessos" foi aprovado para ser apresentado no COBEQ 2014.

Você pode visualizar comentários em sua área de usuário: .\*\*

**\*\*Por favor, envie seu trabalho completo.\*\***

**\*\*Atenciosamente,  
Comitê Científico | COBEQ 2014\*\***

## Anexo 4: Processo de solicitação de patente dos modelos de dispositivos microfluídicos e aplicação destes a bioprocessos junto à Inova-Unicamp



### COMUNICAÇÃO DE INVENÇÃO:

#### DESCRIÇÃO DO INVENTO E AVALIAÇÃO DA ANTERIORIDADE

Data: 11/03/2014 - 19:47:58

**1.1 Título proposto para a Invenção:** Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos baseado em gradiente difusivo com aplicação em bioprocessos

**1.2 Resumo (em inglês):** This work had objective to development microfluidic device easy assembly and able concentration gradient generator and propose the use of glass-glass device, patented, to select ideal conditions for microbial cell growth to optimize the research step of bioprocesses. The microfluidic is science that operates on less fluid amount, generating fast and confinable results in precisely control system and can mimic environment cellular. Microfluidic devices show a diversity of composition and geometry applies for several researches areas. Thus, they were shown alternative device, that different of existing glass-glass device, only in material for construction, being this based in glass-PDMS. For this alternative device shown was evaluated the capacity of generate diffusive concentration gradient, which presented linear profile on diffusive concentration gradient. The devices with geometry that inducos the concentration gradient formation diffusive purely can evaluate the conditions and the microbial cell performance. For this, cell of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 were use as model and submitted in the glucose concentration gradient at microfluidic device glass-glass, in anaerobic condition. Furthermore, we analyzed the behavior of *S. cerevisiae* ATCC 7754 at glass-glass device, subject to a difference of glucose concentration 0-40 g / L glucose, where it was observed the growing cellular inside microchannel with high number number of cells in the intermediate range. Therefore, the glass-glass device patented the possibility microfluidic device for studies of cell behavior against the concentration difference and contributes to the optimization of bioprocesses through the determination of kinetic parameters.

**1.3 Palavras-Chave:** microfluídica, microbioreator, bioprocessos, gradiente de concentração difusivo, seleção de micro-organismos microfluídico, microbioreactor, bioprocesses, diffusive concentration gradient, microorganisms screening

**1.4 Descrição DETALHADA do invento:** Estamos propondo uma tecnologia patenteável e uma aplicação da tecnologia (precisamos de ajuda para a análise crítica para sabermos se será uma ou duas patentes). Tecnologia: construção de dispositivo microfluídico para gerar gradiente de concentração difusivo, onde é proposta uma alternativa de materiais para a construção do dispositivo microfluídico, frente a uma já patenteada, tendo a mesma geometria. Aplicação: Utilização da tecnologia (proposta por nós e da já patenteada) para a seleção das condições que favorecem o crescimento de micro-organismos. A inovação está na aplicação deste tipo de dispositivo em células microbianas que não sofrem quimiotaxia. O dispositivo já patenteado foi utilizado para células animais e bactérias. No entanto, em nossa aplicação, podemos correlacionar resultados dos dispositivos microfluídicos com experimentos convencionais de bioprocessos (taxa de crescimento e curva de crescimento). **DESCRIÇÃO DA TECNOLOGIA** Tecnologia: O modelo de dispositivo microfluídico proposto é configurado em dois níveis: inferior e superior e difere do dispositivo patenteado (Atencia et al., 2012) apenas na composição dos materiais, apresentando fácil montagem e reutilização dos dispositivos. No dispositivo, o nível inferior possui microcanais para as células e onde ocorre o gradiente de concentração difusivo e um nível superior, onde ocorre um fluxo de duas soluções de concentrações diferentes, em regime laminar, com acesso ao nível inferior. O nível inferior do dispositivo é formado por lâmina de vidro contendo os microcanais (4 x 0,9 x 0,5 mm), os quais foram feitos por corrosão ácida, usando solução de Buffer HF (1000 rpm por 8 min) e depois, solução de HF 20% (1000 rpm por 8 min) para conferir numa profundidade de 0,5 mm nas lâminas, previamente fotogravadas. A geometria dos microcanais foram desenhados em programa de AUTOCAD 2002 e impressos em fotolito com resolução de 8.000 dpi, que a partir desta máscara é feito uma fotografação numa fotoalinhadora MJB-3 UV300 (KarlSuss, Garching, Germany), por exposição à luz UV. Para compor o nível superior, foi feito um PDMS configurando o canal em formato de Y, usando a técnica de litografia macia, e contendo furos (~0,45 mm de diâmetro), que foram feitos com o auxílio de uma agulha sem ponta, que se encaixam as extremidades dos microcanais inferiores para servirem de entrada para o nível inferior. Devido à hidrofobicidade do PDMS, que faz com que as células aderem ao polímero, o PDMS deve ser modificado quimicamente para torna-lo hidrofílico ou adicionar tensoativo à suspensão de células para impedir a adesão celular ao PDMS. Para fechar o dispositivo é usada uma lâmina de vidro, contendo as duas entradas e uma saída (1 mm de diâmetro, cada), sendo os furos feitos com Dremel® e colados nestes um material ocnico plástico para conexão das mangueiras (1,2 mm de diâmetro interno) que servem de entrada das soluções. O dispositivo foi vedado com pressão de presilhas de metal que conferiu numa selagem eficiente, permitindo um escoamento estável das correntes do nível superior e capacidade de geração de gradiente no nível inferior. Sendo assim, o dispositivo foi capaz de formar gradiente de concentração linear e puramente difusivos nas câmaras inferiores, mostrando-se aplicável para estudos com células. Aplicação: utilização de dispositivo vidro-vidro para selecionar as condições ideais para crescimento celular microbiano O dispositivo microfluídico já patenteado (Atencia et al., 2012), composto por vidro-vidro e configurado em dois níveis: inferior e superior, foi empregado para determinar as condições ideais para o crescimento celular microbiano em função do gradiente de concentração difusivo. Para isso foi analisado o comportamento de células