

Artigo Técnico

Aplicabilidade da Impressão 3D por Estereolitografia em Biotecnologia usando Dispositivos Mili- e Microfluídicos

*Application of Stereolithography
3D Printing in Biotechnology Using
Milli- and Microfluidic Devices*

Gabriel Griep^{abc*}, Edgar Andres Patiño-Nariño^a,
Isabela Aparecida de Araujo Andreotti^a, Mario
Ricardo Gongora-Rubio^a.

^a Laboratório de
Micromanufatura, Instituto
de Pesquisas Tecnológicas
do Estado de São Paulo
S.A., São Paulo-SP, Brasil.

^b Universidade de São Paulo -
Departamento de Engenharia
de Sistemas Eletrônicos - LME

^c Fundação de Apoio ao IPT,
São Paulo-SP, Brasil

*e-mail: gabrielgriep@ipt.br

Palavras-chave: manufatura aditiva;
micromisturador; *Lab-on-a-Chip*.

Keywords: *additive manufacturing*;
micromixer; *Lab-on-a-Chip*.

Resumo

O desenvolvimento das técnicas de microfabricação, especialmente a impressão 3D e a microusinagem, têm expandido as aplicações de MEMS (do inglês, *Microelectromechanical Systems*) para dispositivos *Lab-on-a-Chip* (LOC), sendo a microfluídica uma das áreas de aplicação que mais progride. Suas aplicações podem se estender a diversos ramos da biotecnologia ao fundir conhecimentos de química, física e engenharias, introduzindo diversas melhorias em processos como redução do uso de reagentes e aumento da eficiência e controle de reações. Deste modo, destacamos o estudo dos fenômenos de escoamento em microfluídica devido as suas particularidades quando comparada à mecânica dos fluidos clássica, especialmente pelo predomínio do escoamento altamente laminar e capilar entre fluidos e processos lentos de difusão e de dispersão nas interfaces. Neste planejamento, propomos o desenho, simulação e manufatura de um micromisturador por impressão 3D por estereolitografia, que é uma das técnicas que desponta na área dado seu baixo custo relativo e facilidade de prototipação. O trabalho apresenta as etapas do projeto, análises numéricas, funcionamento, testes de citotoxicidade e possíveis aplicações dentro de biotecnologia.

Abstract

The advance in new microfabrication techniques, such as 3D printing and micromachining, has expanded the applications of MEMS (Microelectromechanical Systems) in Lab-on-a-Chip devices while microfluidics field shows great progress. Its applications include diverse fields of biotechnology by merging chemistry, physics and engineering concepts and by introducing process improvements like increase in efficiency and reduction of biological reactants. Therefore, we highlight the study of fluid mechanics in microscale dimensions due to its particularities compared to the classical theory regarding fluid physical phenomena. There is a predominance of highly laminar and capillary flow and slow diffusion and dispersion processes on the interfaces. In this project we propose a design, simulations and a fabrication protocol of a micromixer for reactants using 3D printing by stereolithography, which is a technique that stands out for its relative low cost and ease for prototyping. This article presents the workflow, numerical analysis, functionality, biocompatibility tests and possible applications in biotechnology.

1 Introdução

Observou-se nas últimas décadas o surgimento e a consolidação de uma nova tendência mundial: a miniaturização. Esta tendência tem se manifestado em diferentes ramificações da ciência e propiciou o surgimento de grande quantidade de microdispositivos (QIN *et al.*, 1998). Da mesma forma que os microchips eletrônicos revolucionaram o universo dos computadores e da eletrônica, a microfluídica tem revolucionado a química analítica permitindo a obtenção de dados que antes só eram obtidos em laboratórios especializados (MAIRHOFER; ROPPERT; ERTL, 2009; VAN DEN BERG *et al.*, 1998). A principal razão para a miniaturização tem sido aumentar o desempenho analítico, entretanto também se tornaram relevantes a redução do volume de reagentes e de amostras (da ordem de pL-nL), baixos custos de fabricação e a diminuição do tempo de análise (EHRFELD, 2003).

A ascensão dos microdispositivos analíticos começou no início da década de 90, com a apresentação de um microsistema para cromatografia em fase líquida (SQUIRES; QUAKE, 2005). Simultaneamente à apresentação desse microdispositivo, Manz *et al.* (MANZ, a.; GRABER; WIDMER, 1990) propuseram o conceito de microsistemas para análises totais, ou, simplesmente, μ TAS. Com o desenvolvimento dos μ TAS, tornou-se possível integrar várias etapas analíticas como injeção, mistura, pré-tratamento (seleção), reações químicas, separação e detecção em um único dispositivo (BRUUS, 2008; NGUYEN; WU, 2005). Este conceito que permite inserir várias etapas conjuntamente em um μ TAS são também denominados por “*Lab-on-a-Chip*” (LOC) (GIANNITSIS, 2011).

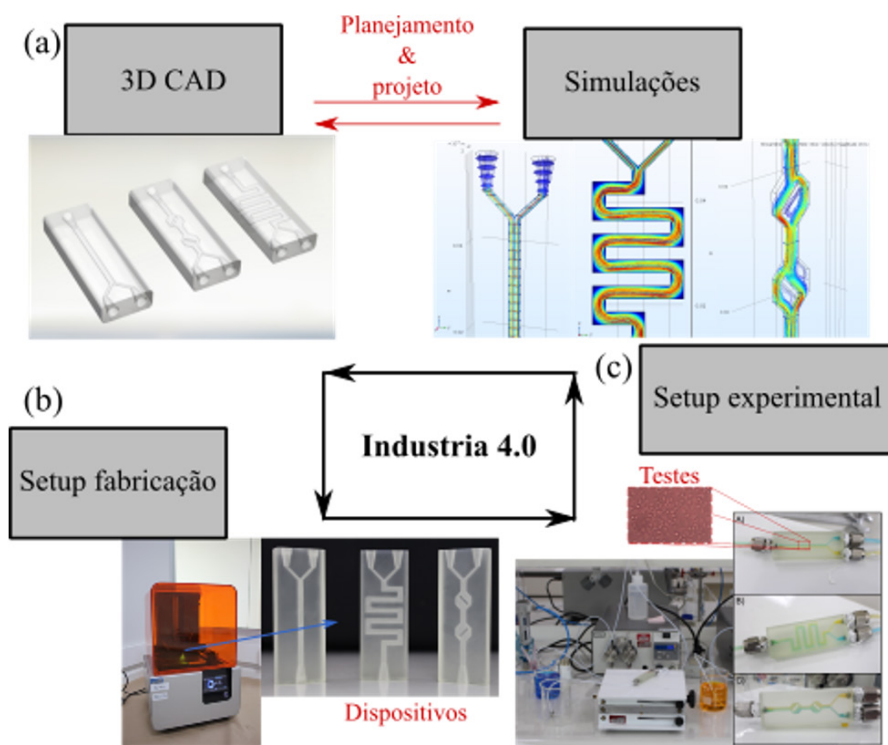
Os microdispositivos que operam com fluidos (microfluídica) apresentam muitas vezes interações fluido-estrutura, multifluidos, reações químicas, difusão térmica, escoamento multifásico e sólidos em suspensão (BRUUS, 2008). Assim, a miniaturização e o fluxo laminar nos *Lab-on-a-Chip* permitem um melhor controle do processo, reduzindo o consumo de reagentes e o tempo de análise. Portanto, estes possuem uma destacada aplicação em dispositivos de análise química e biológica. Uma importante etapa dos sistemas LOC é o controle de processos como manipulação de células, emulsões e reações químicas em microdispositivos (PATTANAYAK *et al.*, 2021; SQUIRES; QUAKE, 2005).

As técnicas de fabricação de sistemas LOC tradicionalmente envolveram processos de microfabricação em sala limpa, como fotolitografia e corrosão em substratos de vidro e silício, que são etapas características pela alta complexidade e custo. A partir

do avanço das tecnologias de impressão 3D ou manufatura aditiva, expandiram-se as possibilidades de fabricação de dispositivos microfluídicos com vantagens como rapidez em prototipagem, facilidade na modelagem de estruturas 3D internas e custos reduzidos (AMIN *et al.*, 2016). Desta forma, a criação de protocolos para melhoria na resolução de estruturas microfluídicas, a estratégia de manufatura e o estudo de materiais de impressão para aplicações em química analítica e biológicas têm sido tópicos de ampla investigação nos últimos dez anos (HART *et al.*, 2020; KREJCOVA *et al.*, 2014). Assim, dentre as diversas aplicações, destacamos seu uso em medicina para o prognóstico, diagnóstico e terapêutica, abordando a construção do dispositivo em estudo e demonstrando como o atual desafio é multidisciplinar, permitindo que profissionais de diversas áreas possam se especializar em impressão 3D.

Este trabalho apresenta a exploração da implementação do processo de fabricação através de impressão 3D por estereolitografia para implementação de mili- e microfluídica na faixa de escoamento volumétrico entre 0,5 ml/min até 4 ml/min. Dentro da metodologia proposta, usa-se a integração de softwares comercial e *open-source* para desenho CAD e simulação nas condições dos dispositivos fabricados por impressão 3D. Desse modo, é definido o projeto sobre a fabricação e experimentação para reprodutibilidade e aplicabilidade nos dispositivos e montagens como por exemplo: detalhes sobre a orientação da impressão (tamanho de camada e resolução), predição numérica dos regimes no escoamento dos fluidos e ângulo de contato com água (molhabilidade) das superfícies geradas pela impressão com resina. Finalmente, uma abordagem experimental sobre os dispositivos fabricados para casos simples de micromisturadores e testagem de biocompatibilidade são realizadas. Assim, se define uma metodologia de planejamento, predição, projeto, fabricação, testagem e prototipagem, dentro do esquema da indústria 4.0 (**FIGURA 1**) (JANDYAL *et al.*, 2022), que é derivada e inspirada em tecnologias para microfluídica empregadas no Laboratório de Micromanufatura do IPT, tais como LTCC e litografia (COBAS GOMEZ *et al.*, 2018).

Figura 1 - Metodológico de desenvolvimento e fabricação de microdispositivos usando impressão 3D e procedimento de indústria 4.0. Planejamento e projeto com (a) desenho em CAD e simulação em CFD. (b) Equipamento de impressão de estereolitografia e pelas impressas. (c) Bancada de testes de escoamento e biológicos.



Fonte: elaborado pelos autores.

Portanto, para estas análises se empregam três casos de microcanais para estudo inicial de funcionalidade. Entretanto para a implementação em biotecnologia (manipulação de materiais orgânicos) usando dispositivos em base a resina curada, são realizadas testagem sobre os dispositivos como análise de citotoxicologia para biocompatibilidade com resultados qualitativos.

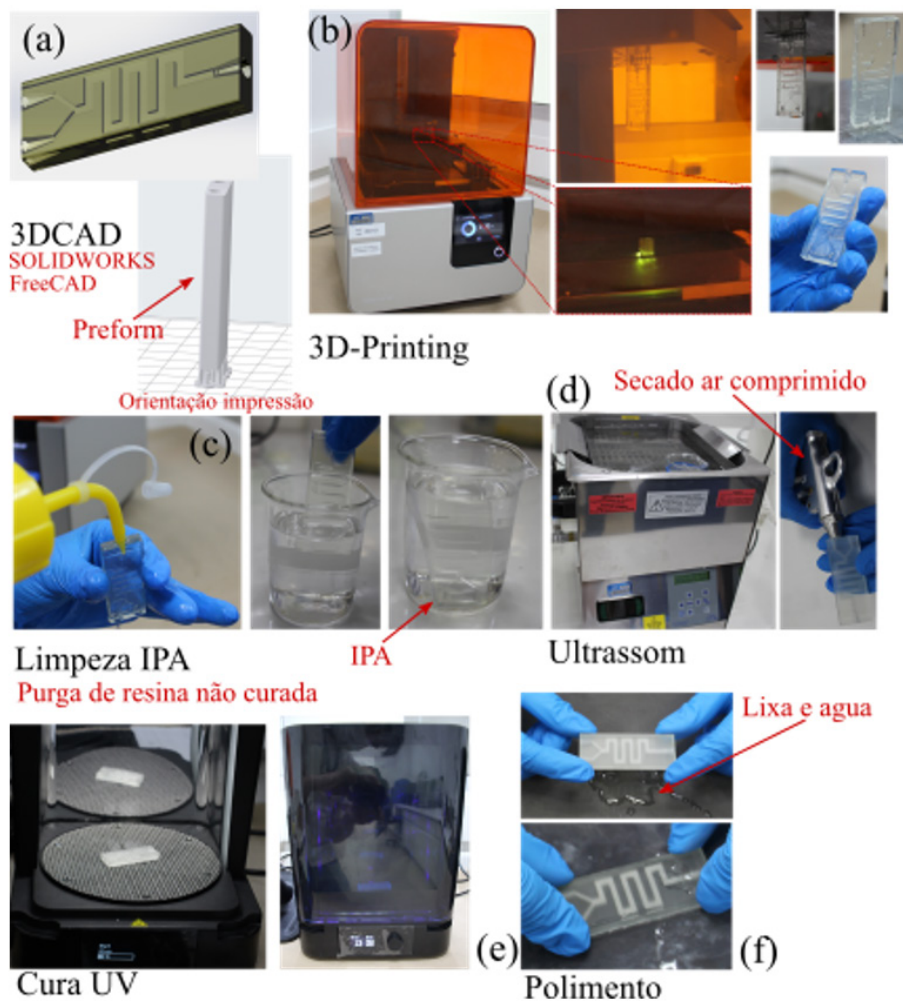
2 Procedimento metodológico

2.1 Geometrias de micromisturador e simulação do escoamento

Os dispositivos microfluídicos foram projetados usando *SolidWorks* (Dassault Systèmes SolidWorks Corp., Waltham, MA). Assim, os sólidos gerados no estágio de desenho CAD foram empregados nos processos de simulação (**FIGURA 1(a)**) e fabricação com impressão 3D (**FIGURA 2(a)**). Portanto, as cavidades e canais internos dos três dispositivos fluídicos para os casos de estudo são definidos em detalhe na **FIGURA 3**.

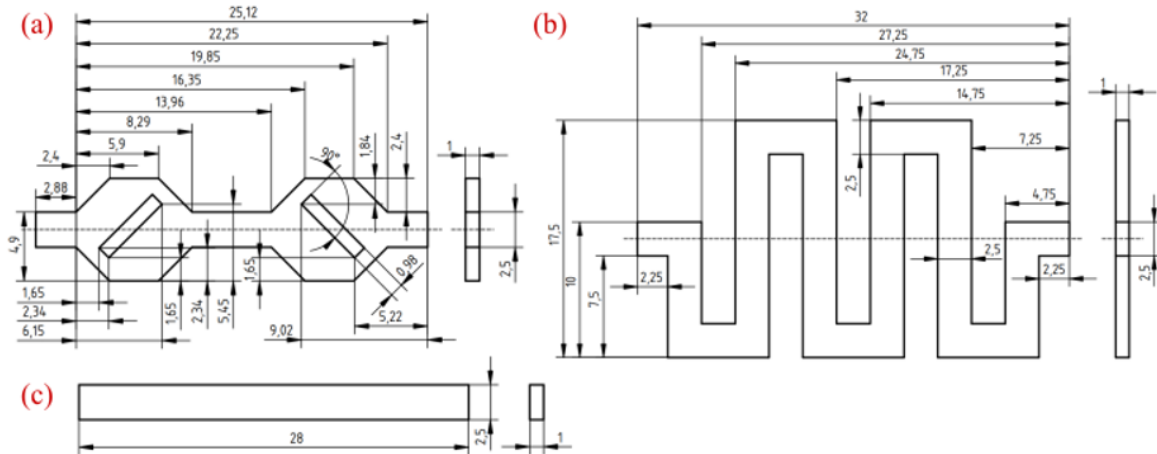
Desse modo, examinam-se os dispositivos projetados com análise CFD em termos de propriedades do fluxo nos microcanais com um escoamento volumétrico padrão de 3 mL/min para todos os casos (número de Reynolds ao redor de 350 para um regime laminar) (BRUUS, 2011). Conseqüentemente, foram simulados para os domínios fluídicos, as características paramétricas de densidade e viscosidade de água líquida a 25 °C usando o módulo de fluxo laminar monofásico e estacionário. O COMSOL *Multiphysics* 5.3 (Burlington, MA) foi usado nessas análises. As malhas geradas para discretizar o domínio fluídico foram de varredura tetraédrica 3D para os canais e o domínio computacional nas entradas e saída. O número total dos elementos de malha variou nos diferentes exemplos de 173.738 – 594.685.

Figura 2 – Processo de modelagem e fabricação de dispositivo fluídico por impressão 3D. (a) Desenho CAD em *SolidWorks* e configuração de impressão em software acima e abaixo respectivamente. (b) Equipamento de impressão 3D *Form 2*, plataforma com peça parcial durante a impressão e com detalhe durante a etapa de cura por escrita direta do laser UV, peça final fixada na plataforma e removida da plataforma. (c) Primeira etapa de limpeza após a impressão por injeção de álcool isopropílico nas entradas e saídas do dispositivo e imersão no álcool isopropílico. (d) Segunda etapa de limpeza em ultrassom com peça imersa e secagem. (e) Pós-cura na *Form Cure*. (f) Polimento com peça antes e depois do processo.



Fonte: elaborado pelos autores.

Figura 3 – Dimensões dos canais e cavidades dos microdispositivos por impressão 3D: (a) Obstáculo. (b) Zig-Zag. (c) Canal reto. Dimensões das cotas em milímetros (mm).



Fonte: elaborado pelos autores.

2.2 Fabricação por tecnologia de estereolitografia

Os processos de impressão 3D se baseiam na formação de sucessivas camadas de material no topo de uma camada anterior do mesmo, que são depositadas em estado fundido e que, através de mecanismos térmicos ou ópticos por exemplo, são curados e se aderem à superfície para formar uma peça única. A tecnologia de impressão 3D empregada neste trabalho é a de manufatura por estereolitografia (SLA), que é baseada na cura da resina por fotopolimerização através da escrita direta à laser UV em camadas intermediárias que podem variar entre dezenas a centenas de micrômetros. A estereolitografia permite a obtenção de altas resoluções quando comparado à tradicional impressão por filamento, uma vez que a largura de feixe do laser é menor que a do sistema de injeção de filamento fundido (FINNES, 2015). Além disso, as impressoras SLA, em geral, possuem maior precisão de resolução entre cada camada, utilizando passos mínimos de dezenas de micrômetros, enquanto que a impressão por filamento possui resoluções de centenas de micrômetros (KAFLE *et al.*, 2021).

O modelo de impressora 3D utilizado neste trabalho é a *Form 2 μ SLA 3D Printer* (Formlabs, Somerville, MA, EUA) (FIGURA 2(b)), que permite a construção de camadas com resolução entre 25, 50 e 100 μ m para a resina *Clear* (FLGPCL04) também da Formlabs

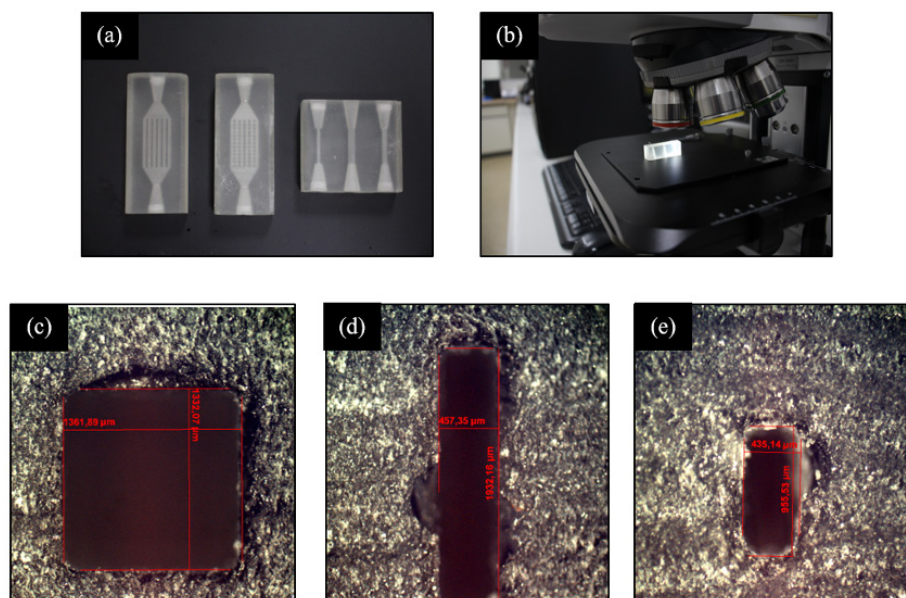
(Somerville, MA, EUA), material característico por sua translucidez e alta resistência mecânica (FORMLABS, 2017). Os principais componentes do sistema da impressão são: (1) uma plataforma que se movimenta no eixo vertical e em que fica aderida a peça ao longo da impressão, com a sua face voltada para baixo, (2) um tanque de acrílico em que está a resina não curada com um fundo transparente de material elástico, por onde deve passar o feixe de laser enquanto a peça está em contato com o tanque para construção de cada nova camada, (3) o sistema de emissão de laser UV de comprimento de onda de 405 nm, potência de 250 mW e com largura de feixe de 140 μm e (4) um cartucho de resina para reposição no tanque ao longo do processo. O sistema é coberto por uma tampa laranja, que evita a cura indesejada da resina por exposição à luz ambiente.

2.2.1 Modelagem 3D e orientação de impressão

O processo de manufatura se inicia pela modelagem da peça em software de desenho 3D. O design dos menores elementos da peça deve estar alinhado às características de resolução da impressora. Esta resolução foi obtida empiricamente no Bionano a partir de fabricação de canais milifluídicos de largura abaixo de 1,5 mm e é discutida na literatura técnica como em Nielsen *et al.* (NIELSEN *et al.*, 2020), em que a solução para obtenção de canais de tamanho abaixo de 100 μm passa pela utilização de resinas customizadas de baixa viscosidade.

O estudo de resolução dentro do Bionano foi feito com a análise por microscopia ótica de canais simples, de estruturas multicanal e de malha de pilares como apresentado nas **Figuras 4(a) e 4(b)**. Os dispositivos de canal simples tinham dimensões na modelagem 3D de $1,36 \times 1,36 \text{ mm}^2$, $2,0 \times 0,5 \text{ mm}^2$ e $1,0 \times 0,5 \text{ mm}^2$ (**Figuras 4(c)-(e)** respectivamente). É observada uma contração em relação ao projeto de CAD de aproximadamente 5,4%, que ocorre principalmente após o processo de pós-cura devido a maior força de ligação na estrutura do material. O segundo dispositivo com estruturas multicanal é composto de uma rede de 6 canais com $1,0 \times 0,5 \text{ mm}^2$ espaçadas de 0,5 mm e não apresentou falhas de fabricação ou escoamento em setup experimental. Por fim, a estrutura mais complexa de malha de pilares foi desenhada com espaçamento de 0,5 mm entre as colunas, mas apresentou problemas de manufatura como junção entre pilares e pontos de entupimento com bolhas de ar. Assim, com a utilização da resina *Clear*, que possui alta viscosidade, 500 μm é tido como a menor dimensão de largura de canal para estruturas simples no atual setup.

Figura 4 – Dispositivos para estudo de resolução na fabricação. (a) Estrutura multicanal, de malha de pilares e de canais simples de diferentes dimensões, (b) setup de microscopia ótica com peça de canais simples após corte, (c) canal de $1,36 \times 1,36 \text{ mm}^2$, (d) canal de $2,0 \times 0,5 \text{ mm}^2$ e (e) canal de $1,0 \times 0,5 \text{ mm}^2$.



Fonte: elaborado pelos autores.

Os canais desenhados para micromisturadores (**FIGURA 1(a)**) e testes de biocompatibilidade neste trabalho apresentam dimensões de $1,0 \text{ mm} \times 2,5 \text{ mm}$, de forma a garantir um dispositivo com resolução precisa para observação adequada dos fenômenos de mistura. O passo de fabricação entre camadas para estes dispositivos escolhido foi de $50 \mu\text{m}$, totalizando em média $15,96 \text{ mL}$ de volume, 390 minutos de processo e 1.366 camadas para cada dispositivo fabricado individualmente.

Outro ponto crítico em dispositivos microfluídicos é a estratégia e desenho das conexões de entrada e saída de modo a garantir a estanqueidade, que é uma barreira comum na implementação experimental. O tipo de conexão utilizada em nosso dispositivo é o encaixe por roscas acopladas às mangueiras que se conectam à bomba. O acoplamento do conector ao dispositivo é simples – o polímero é desgastado pelo encaixe do conector no rosqueamento e é obtido o formato da rosca no material. Os testes de estanqueidade mostram que a vedação é adequada para as aplicações de vazão até 5 mL/min em setup com bomba de pistão.

Além das restrições de resolução, a orientação em que a peça é fabricada ao longo do eixo vertical é importante para a garantia da integridade do canal e prevenção de entupimentos. A fabricação deve ocorrer de modo que favoreça o escoamento do excesso de resina que permanece na superfície da peça a cada vez que esta entra em contato com o tanque para a fotopolimerização de uma nova camada. Assim, as entradas e saídas devem permanecer orientadas de forma quase paralela ao eixo vertical, mas ao mesmo tempo, com a mudança de direção do canal ao longo do dispositivo, pequenas inclinações entre 3° e 10° a partir da posição na vertical contribuem para o escoamento de resina que poderia se depositar em cantos formados ao longo do processo (**FIGURA 2(a)**).

2.2.2 Limpeza, pós-cura e polimento

Após a impressão da peça, os pequenos suportes que a sustentam e estão aderidos à plataforma são quebrados com alicate e os fragmentos remanescentes são posteriormente polidos. A etapa mais crucial de limpeza no tratamento de dispositivos 3D é a desobstrução de canais que ainda tenham resina não-curada. Assim, o solvente álcool isopropílico deve ser injetado imediatamente pelas entradas dos canais como na **FIGURA 2(c)**, de modo a evitar qualquer cura gradual e a eliminar todo excesso de resina no interior da peça. Pela nossa experiência, é indicada uma segunda limpeza em banho ultrassônico em álcool isopropílico por 10 minutos para remoção de residuais (**FIGURA 2(d)**).

Apesar da peça ter a sua geometria final após a impressão, ela ainda não terá obtido a sua máxima rigidez mecânica. Um procedimento de pós-cura então é realizado, que consiste em mais uma exposição do dispositivo à luz UV, mas uniforme e em alta temperatura - no caso da resina *Clear* a exposição é de 15 minutos a 60 °C no aparelho *Form Cure* (Formlabs, Somerville, MA, EUA), mostrado na **FIGURA 2(e)**. A pós-cura visa a fotopolimerização completa do material.

A última etapa de fabricação é o polimento, no qual utiliza-se lixa d'água de gramatura 1000 e 2000, para aumentar a translucidez do material como observado na **FIGURA 2(f)**, em que a peça apresenta superfície de aparência fosca logo após o processo de pós-cura e uma superfície mais translúcida ao final do polimento. Inicialmente, o polimento é feito com a lixa 1000 e água DI, movimentando o dispositivo sobre a lixa em forma de um número oito na horizontal – ou deitado, por 20 minutos. Deve-se prestar atenção quanto à pressão exercida sobre a peça em contato com a lixa. Deste modo, o processo é realizado segurando as duas extremidades do dispositivo, aplicando pouca força para que a superfície fique uniforme e garanta o nivelamento do mesmo. Em seguida, com

a mesma lixa, são exercidos movimentos sucessivos para frente e para trás aplicando menos força quando comparado ao passo anterior.

Posteriormente ao polimento com a lixa 1000 deve-se observar as ranhuras presentes na superfície do dispositivo e se estas possuem um padrão, pode-se dar continuidade com a lixa 2000, repetindo os mesmos processos utilizados com a lixa 1000 para dar acabamento à superfície, suavizando ranhuras e aumentando a translucidez da peça. Caso estejam sem nenhum padrão é necessário repetir o processo com a lixa 1000, tomando cuidado com a pressão exercida sobre a peça, para obter-se uma superfície uniforme e translúcida e garantir a qualidade da visualização do fluxo dentro dos canais, especialmente naqueles que envolvem células, como apresentado neste trabalho.

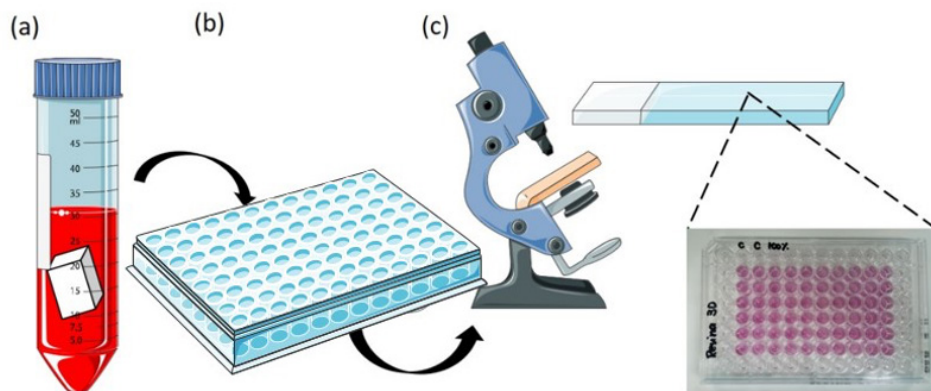
2.2.3 Teste de citotoxicidade

O teste in vitro para a análise da citotoxicidade foi realizado de acordo com a norma ISO 10993-5 (ISO 2009). A amostra, previamente curada e esterilizada, foi adicionada em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) na proporção de 1 cm²/mL e incubada por 24h a 37 °C (**FIGURA 5(a)**). A suspensão celular foi cultivada em garrafa de cultura celular (75 cm²), em meio de cultura DMEM com adição de 10% de soro fetal bovino (BSA, do inglês *bovine fetal serum*). Após confluência, as células foram destacadas pela adição de tripsina 0,2% (EDTA 0,02%) e, avaliadas pelo *Countess Automated Cell Counters* (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) para o ajuste da densidade da suspensão celular para cerca de 1 × 10⁵ cel./mL. Utilizamos a suspensão celular de NCTC – clone L929 da ATCC-CCL1 para o preparo das placas, distribuindo 100 µL da suspensão em 1 × 10⁵ cel./mL em cada poço (1 × 10⁴ cel./poço) (**FIGURA 5(b)**). Para atingir a confluência desejada, a placa foi incubada em estufa úmida a 37 °C e atmosfera com 5% CO₂ por cerca de 24h. As diluições seriadas foram realizadas através da adição de 100 µL de cada diluição do extrato em contato com as células aderidas em cada poço nas seguintes concentrações: 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25% de extrato. A análise foi feita em triplicata.

Controles positivo e negativo receberam o mesmo procedimento da amostra, sendo luva cirúrgica de látex sintético e o próprio meio DMEM com adição de 10% de soro fetal bovino, respectivamente. Esse último, correspondendo a 100% de sobrevivência celular. A placa foi mantida em estufa úmida a 37 °C e atmosfera com 5% CO₂ por 24h. Após essa etapa, trocou-se o meio antigo por um meio fresco contendo 50 µg do corante vermelho neutro/mL e a placa foi incubada por 3h para a incorporação do corante. Em

seguida, visualizamos os poços em microscópio óptico invertido (Axiovert 135, Zeiss, Alemanha) (**FIGURA 5(c)**). Em publicações posteriores será apresentado os resultados do teste de citotoxicidade finalizado de acordo com a norma ISO 10993-5 (ISO 2009). Todos os reagentes utilizados são da *Sigma-Aldrich* (Missouri, EUA).

Figura 5 - Análise de citotoxicidade. (a) Amostra da resina utilizada para impressão do dispositivo em 3D submersa em meio de cultivo DMEM (10% BSA) por 24 horas para a obtenção do extrato. **(b)** Exposição das células ao extrato por 24 horas. **(c)** Análise qualitativa das células submetidas a diversas concentrações do extrato.

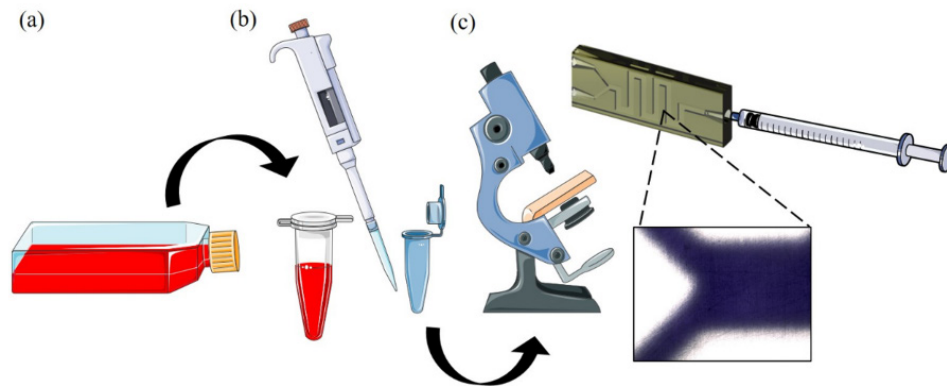


Fonte: elaborado pelos autores.

2.2.4 Translucidez dos canais

Para verificar a transparência do dispositivo quanto a passagem de células no interior de seu canal, uma alíquota de 3 mL da suspensão celular a 4×10^5 cel./mL (**FIGURA 6(a)**) foi separada e diluída em 1 mL de solução azul de tripan 0,4% (**FIGURA 6(b)**). O canal, contendo a solução de meio e azul de tripan, foi posicionado sobre a mesa do microscópio óptico invertido (Axiovert 135, Zeiss, Alemanha). Com o auxílio de uma seringa plástica descartável, a solução resultante era deslocada tanto para dentro quanto para fora do canal (**FIGURA 6(c)**).

Figura 6 – (a) Crescimento e ajuste das células para a densidade celular desejada. (b) Mistura de uma alíquota da suspensão celular com azul trypan, na proporção 3:1 respectivamente. (c) Visualização das células dentro do canal do dispositivo com o auxílio de microscópio óptico invertido.



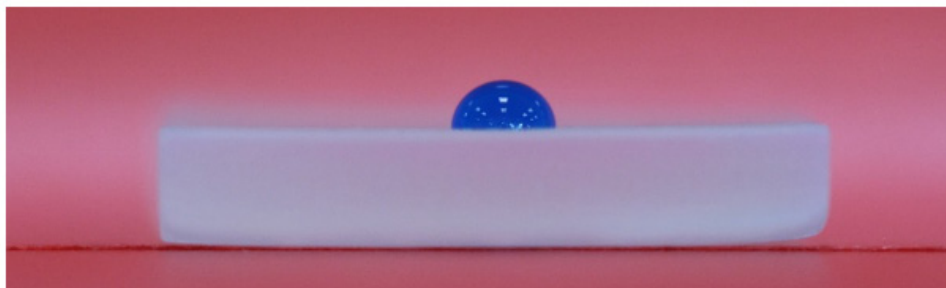
Fonte: elaborado pelos autores.

3 Resultados e discussão

3.1 Molhabilidade

A caracterização por medida de ângulo de contato da água em contato com a resina é feita para determinar a molhabilidade dos canais do dispositivo. Por se tratar de estruturas internas, o teste foi feito com uma superfície impressa sem passar pelo processo de pós-cura. O comportamento da gota de água na superfície mostrado na FIGURA 7 indica que a resina é levemente hidrofóbica, apresentando um ângulo de contato de 95° .

Figura 7 – Teste de ângulo de contato com superfície impressa e água.



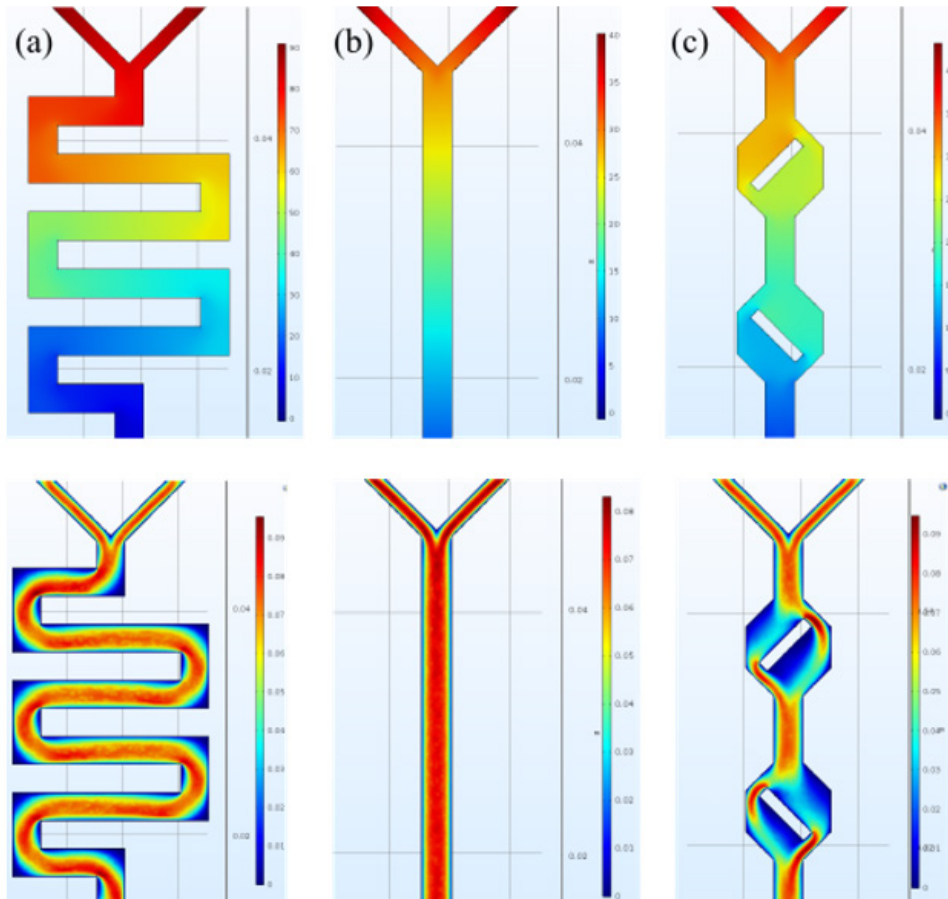
Fonte: elaborado pelos autores.

Ao modificar a superfície do dispositivo com o anticorpo anti-EpCAM para a captura de células tumorais circulantes (CTCs), Chen *et al.* (CHEN *et al.*, 2020) fizeram medidas do ângulo de contato em conjunto com microscopia de varredura eletrônica para demonstrar a modificação em cada etapa até a sua finalização, obtendo a mudança do ângulo de contato de $99,12^\circ \pm 0,55$ para $91,47^\circ \pm 2,79$, antes e após a modificação com o anti-EpCAM respectivamente. No presente estudo, o comportamento da resina Clear foi próximo ao encontrado após o revestimento com estreptavitina ($97,15^\circ \pm 1,29$). Demonstrado por Li *et al.* (LI *et al.*, 2015), a molhabilidade de uma superfície interna de canais impressos afetaria a eficácia de captura de células devido a hidrofobicidade do mesmo, promove a retenção de água e interação célula-estrutura interna resultando na redução da adesão celular.

3.2 Resultados de simulação de escoamento em dispositivos 3D-Printing

Distribuição de pressão e perfis de velocidade para os diferentes domínios fluídicos para os canais foram avaliados e apresentados nas **FIGURA 8** para o plano médio do dispositivo. Os resultados computacionais revelaram uma distribuição altamente uniforme de pressão (**FIGURA 8** na parte superior) dentro dos dispositivos projetados entre todos os canais. Entretanto, os campos de velocidade resultantes na parte inferior da **FIGURA 8**, descrevem uma distribuição uniforme no percurso do canal em Zig-Zag (**FIGURA 8(a)**) e reto (**FIGURA 8(b)**). Contudo, o caso com obstáculo apresentou uma distribuição do campo de velocidades não-uniforme, com picos de velocidade ao redor do escoamento do fluido interagindo com as barreiras inclinadas e as paredes nas cavidades na **FIGURA 4 (c)** parte inferior.

Figura 8 – Simulação pressão e campo de velocidades nos microdispositivos: (a) Zig-Zag. (b) Canal reto. (c) Obstáculo. Escala entre vermelho e azul mostram os valores máximos e mínimos respectivamente.



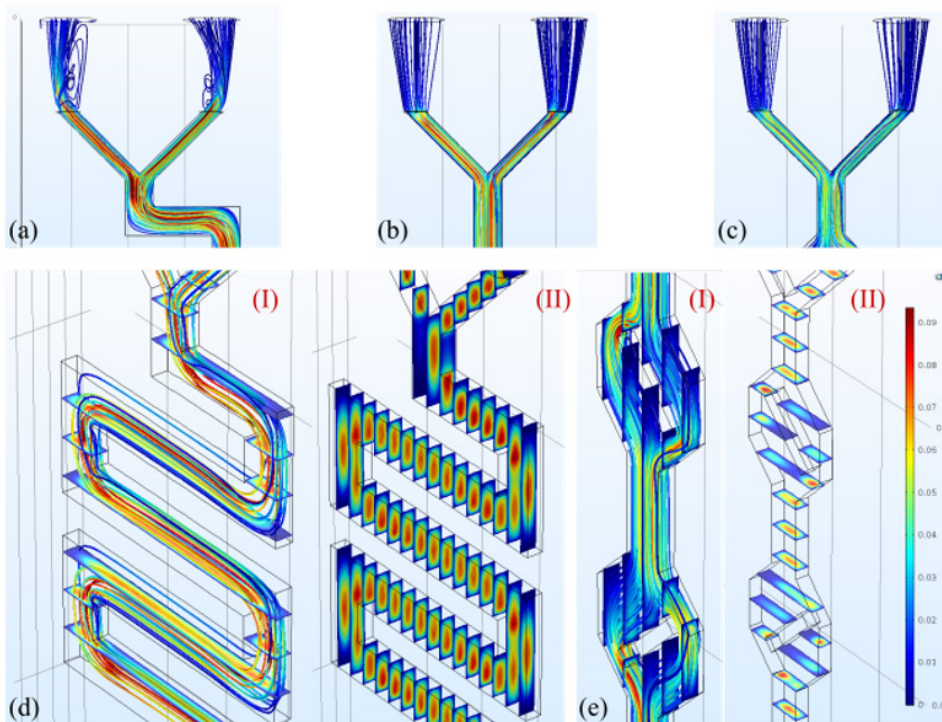
Fonte: elaborado pelos autores.

A flutuação de velocidade dentro das entradas foi avaliada por meio da plotagem das linhas de fluxo na **FIGURA 9**. As **Figuras 9(b) e 9(c)** delimitam um comportamento uniforme na disposição das linhas de entrada nos canais principais; porém, a **FIGURA 9(a)** na configuração em Zig-Zag gera a formação de perturbações no escoamento de natureza convectiva. Entretanto, nas **Figuras 9(c) e 9(d)** o perfil de velocidade em múltiplas camadas nas proximidades da porta de entrada depois da junção dos canais mostrou que as flutuações de velocidade de fluxo tornam-se paulatinamente laminar (**FIGURA 9(d)(II)**) após passar a entrada e entrar no primeiro canal curvo.

Nas **Figuras 9(d) e 9(e)**, as análises por CFD revelaram que os campos de velocidade para uma distribuição de planos transversais e normais ao longo do comprimento do canal e cavidade para as configurações Zig-Zag e obstáculo, formam um perfil de fluxo característico dentro de cada configuração. A **FIGURA 9(d)(II)** apresenta o comportamento uniforme transversal e normal aos canais com um máximo de velocidade no centro e se espalhando até os valores mínimos na interação fluido e bordas do dispositivo.

Os resultados mostraram para a **FIGURA 9(e)(II)** que a flutuação de velocidade nas diferentes seções dos planos nas cavidades das barreiras inclinadas teve uma maior irregularidade em comparação com as seções nos canais médios, de entrada e saída. Observando-se que essas perturbações na velocidade prevalecem nas duas cavidades nas saídas de forma semelhante, onde o fluxo sai não-uniforme da cavidade e posteriormente no microcanal estabiliza-se para, então, entrar novamente na cavidade com obstáculo e sair novamente modificado.

Figura 9 – Simulações de linhas de fluxo para as entradas dos dispositivos: (a) Obstáculo. (b) Zig-zag. (c) Canal reto. Grade entre vermelho e azul mostram os valores máximos e mínimos, respectivamente.

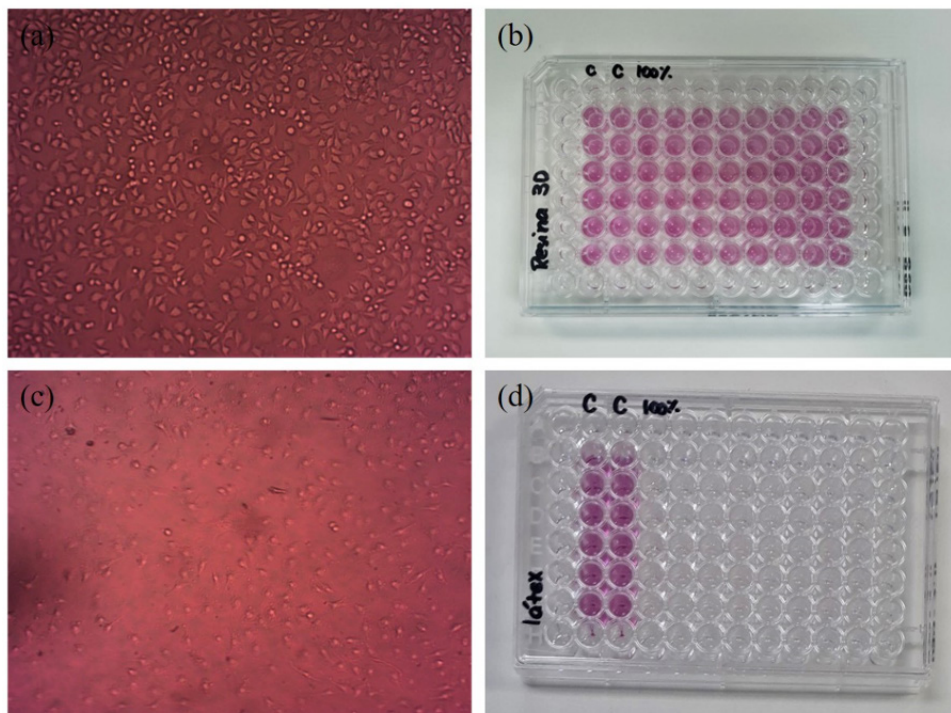


Fonte: elaborado pelos autores.

3.3 Ensaios biológicos

Inicialmente, é necessário analisar o grau de toxicidade que o material pode apresentar às células animais. Através do ensaio foi observado a integridade da cultura celular (FIGURA 10(a) e (c)), a qual manteve-se íntegra com 100% do extrato da resina *Clear*, sem alterações em sua morfologia, conforme resultados anteriores (HART *et al.*, 2020), permitindo a continuidade do experimento. O controle positivo, realizado com luva cirúrgica de látex sintético e com mesmo tratamento da amostra, apresentou alta toxicidade às células devido as suas propriedades já conhecidas que reduzem a atividade metabólica, viabilidade e proliferação celular (FIGURA 10(b) e (d)). A apresentação das contagens, resultado complementar do teste de citotoxicidade, serão publicadas nos próximos trabalhos.

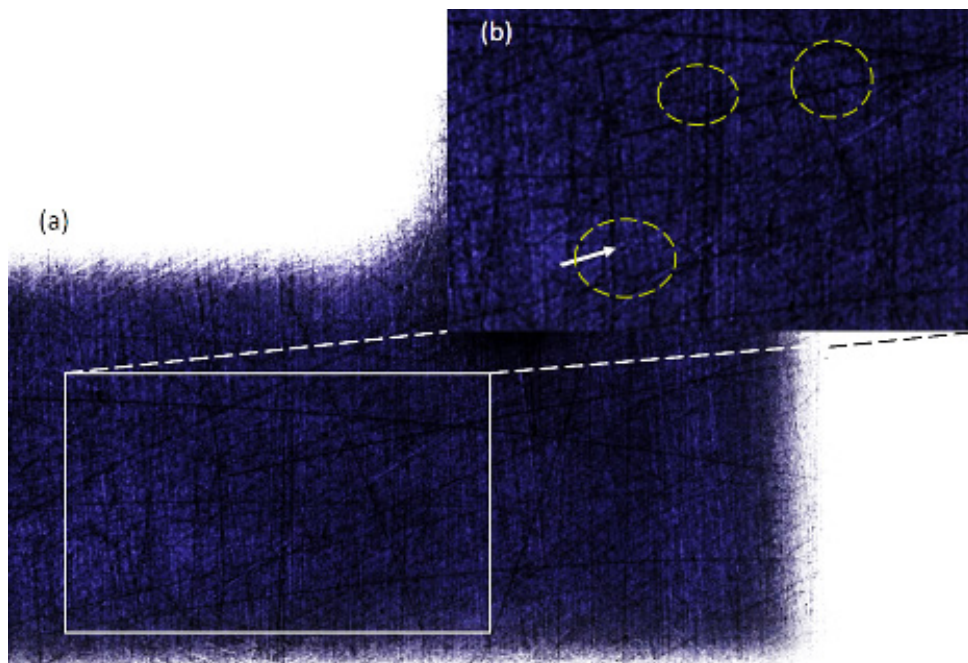
Figura 10 – Teste de citotoxicidade. (a) e (c), imagens de microscopia óptica das amostras submetidas à 100% do extrato e extrato de luva látex descartável, respectivamente. (b) e (d), fotos das placas utilizadas para a amostra do material de resina e de luva látex descartável, respectivamente validando o teste de citotoxicidade.



Fonte: elaborado pelos autores.

A translucidez e a resistência que a resina apresenta são características importantes e têm demasiada importância quando comparadas a outros materiais como LTCC (do inglês, *Low Temperature Co-fired Ceramic*) e PDMS (do inglês, *Polydimethylsiloxane*) respectivamente. Diante disso, Oh *et al.* (OH *et al.*, 2018) desenvolveu um circuito capilar impresso em 3D (3D-CC) com o objetivo de avaliar a viscosidade do sangue (VS), importante parâmetro hemorreológico que afeta o fluxo sanguíneo e a circulação a olho nu, permitindo a determinação rápida e direta. A partir da VS é possível ter um diagnóstico e prognóstico de alterações hemorreológicas que podem ser associadas a várias doenças como anemia falciforme e Diabetes mellitus. Assim como apresentado neste trabalho, o dispositivo impresso em 3D possui translucidez para a visualização de células L929 na concentração de 1×10^4 cel./mL em seu interior (**FIGURA 11(a)**). Entretanto, ainda é necessário a realização de uma metodologia para alcançar o máximo de translucidez possível dentro do canal (**FIGURA 11(b)**) que, aparentemente, possui uma superfície porosa, dificultando a visualização de soluções com baixas concentrações celulares.

Figura 11 – Visualização das células L929 através do canal por microscopia óptica. (a) Magnitude de 5x. (b) Seleção de uma área do canal para a observação das células com a lente de magnitude de 20x. Áreas circuladas em amarelo representam pontos de identificação de células.



Fonte: elaborado pelos autores.

Das inúmeras vantagens que a estereolitografia apresenta quando consideramos seu uso em bioengenharia, destacamos a possibilidade da obtenção de superfícies com textura de até micrômetros, nas quais células adaptadas a esse ambiente podem se alojar (HART *et al.*, 2020). À vista disso, canais de dispositivos microfluídicos impressos em 3D foram funcionalizados com anticorpos para a captura de células tumorais circulantes (CTCs) (CHEN *et al.*, 2020). Dado a baixa concentração de CTCs, que dificulta no prognóstico e na terapêutica, este foi fabricado com alta área de superfície através de funcionalização, resultando em uma eficiência de captura de 90%. A retenção das células L929, ao passar a suspensão celular pelo canal do dispositivo, deve-se a rugosidade da superfície das paredes devido ao não-tratamento ou polimento do canal após a cura da resina (dados não publicados). Deste modo, superfícies com maior porosidade podem vir a auxiliar em processos como a funcionalização de materiais e/ou moléculas de interesse e necessita de mais testes.

Em 2014, a taxa global de prematuridade foi de 10,6 por 100 nascidos vivos onde temos o Brasil ocupando o nono lugar no ranking dos 10 países com as maiores taxas de prematuridade (11,2 por 100 nascidos vivos) (DIAS *et al.*, 2022). Atualmente, o único tratamento é a aplicação de várias injeções de progesterona para tentar prevenir ou retardar o parto, entretanto o conhecimento do risco do nascimento prematuro (PTB, do inglês *Preterm Birth*) só é visto a partir do trabalho de parto. Os bebês sobreviventes ainda podem sofrer com diversos problemas de saúde e desenvolvimento, incluindo paralisia cerebral, doença pulmonar crônica, perda de visão ou audição e deficiência intelectual. Apesar da inexistência de testes clínicos que indiquem a possibilidade de ocorrência do nascimento prematuro, Parker *et al.* (PARKER *et al.*, 2018) contou com um painel de biomarcadores encontrados no soro sanguíneo materno que podem prever um PTB para a construção de um dispositivo impresso em 3D ao funcionalizar monólitos, polímeros porosos contínuos usados como fases estacionárias em cromatografia líquida, com anti ferritina. Com uma impressora 3D estereolitográfica personalizada, foi adicionada uma janela de polimerização na qual o monólito aproveita as propriedades inerentes de absorção UV da resina para uma polimerização reprodutível e espacialmente seletiva. Utilizando soro sanguíneo humano, os pesquisadores demonstraram a primeira extração qualitativa de ferritina, biomarcador PTB, por imunoafinidade em dispositivos microfluídicos impressos em 3D.

É possível fabricar canais milifluídicos por impressão 3D com resolução de até 500 µm, podendo ser utilizado para a construção de micromisturadores para aplicações em diversas áreas, especialmente em citologia, biotecnologia e medicina devido à sua biocompatibilidade.

4 Conclusão

Neste trabalho exploramos as capacidades de fabricação de dispositivos fluidicos na escala milimétrica através da técnica de impressão 3D por estereolitografia, que apresenta diversas vantagens em relação aos tradicionais processos em silício. Propusemos procedimentos e técnicas voltados para a construção de dispositivos milifluídicos com capacidade de canais com precisão de até 500 µm. Demonstramos que as etapas de prototipagem, planejamento e predição podem ser acopladas às demandas de desenvolvimento de produtos devido à integração de ferramentas de desenho CAD e simulação numérica com CFD. Os testes de citotoxicidade para seu uso em amostras contendo células animais, valida que a presente tecnologia é promissora para aplicações em biotecnologia e medicina.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasil) (Processo nº 382031/2022-9), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo nº 2021/05931-9) e seu projeto PDIp (Processo nº. 2017/50343-2) pelo apoio financeiro desta pesquisa. À Pesquisadora Dra. Patricia Léo pela possibilidade de realizar os ensaios no Laboratório de Biotecnologia Industrial (Unidade de Negócios Bionanomanufatura, IPT) e à Mayara Santos, ao Jonas Gomes dos Santos e ao Antônio Fernando Montemor pelo auxílio com os ensaios. Ao Pesquisador Bruno Marinaro Verona pela possibilidade de realizar os ensaios no Laboratório de Micromanufatura (Unidade de Negócios Bionanomanufatura, IPT). Parte das figuras foram parcialmente geradas usando o Servier Medical, sob a licença do Creative Commons Attribution 3.0. (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>, acessado dia 23 de janeiro, 2023).

6 Referências

AMIN, R.; KNOWLTON, S.; HART, A.; YENILMEZ, B.; GHADERINEZHAD, F.; KATEBIFAR, S.; MESSINA, M.; KHADEMHOSEINI, A.; TASOGLU, S. 3D-printed microfluidic devices. **Biofabrication**, v. 8, n. 2, p. 022001, 2016.

BRUUS, H. **Theoretical Microfluidics**. Denmark: Oxford University Press, 2008.

BRUUS, H. Acoustofluidics 1: Governing equations in microfluidics. **Lab on a Chip**, v. 11, n. 22, p. 3742, 2011.

CHEN, J.; LIU, C.-Y.; WANG, X.; SWEET, E.; LIU, N.; GONG, X.; LIN, L. 3D printed microfluidic devices for circulating tumor cells (CTCs) isolation. **Biosensors & bioelectronics**, v. 150, n. 111900, p. 111900, 2020.

COBAS GOMEZ, H.; MANSINI CARDOSO, R.; NOVAIS SCHIANTI, J. DE; MARIM DE OLIVEIRA, A.; GONGORA-RUBIO, M. R. Fab on a package: LTCC microfluidic devices applied to chemical process miniaturization. **Micromachines**, v. 9, n. 6, p. 285, 2018.

DIAS, B. A. S.; LEAL, M. DO C.; MARTINELLI, K. G.; NAKAMURA-PEREIRA, M.; ESTEVES-PEREIRA, A. P.; SANTOS NETO, E. T. D. Prematuridade recorrente: dados do estudo "Nascer no Brasil". **Revista de Saúde Pública**, v. 56, p. 7, 2022.

EHRFELD, W. Electrochemistry and microsystems. **Electrochimica Acta**, v. 48, n. 20, p. 2857–2868, 30 set. 2003.

FINNES, T. High Definition 3D Printing – Comparing SLA and FDM Printing Technologies. **The Journal of Undergraduate Research**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2015.

FORMLABS. **Material Data Sheet - Standard**, 2017. Disponível em: <<https://archive-media.formlabs.com/upload/Clear-DataSheet.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 2023.

GIANNITSIS, A. T. Microfabrication of biomedical lab-on-chip devices. A review. **Estonian Journal of Engineering**, v. 17, n. 2, p. 109, 2011.

HART, C.; DIDIER, C. M.; SOMMERHAGE, F.; RAJARAMAN, S. Biocompatibility of blank, post-processed and coated 3D printed resin structures with electrogenic cells. **Biosensors**, v. 10, n. 11, p. 152, 2020.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993- 5:** Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva: ISO, 2009. 34 p.

JANDYAL, A.; CHATURVEDI, I.; WAZIR, I.; RAINA, A.; UL HAQ, M. I. 3D printing – A review of processes, materials and applications in industry 4.0. **Sustainable Operations and Computers**, v. 3, p. 33–42, 2022.

KAFLE, A.; LUIS, E.; SILWAL, R.; PAN, H. M.; SHRESTHA, P. L.; BASTOLA, A. K. 3D/4D printing of polymers: Fused deposition modelling (FDM), selective laser sintering (SLS), and stereolithography (SLA). **Polymers**, v. 13, n. 18, p. 3101, 2021.

KREJCOVA, L.; NEJDL, L.; RODRIGO, M. A. M.; ZUREK, M.; MATOUSEK, M.; HYNEK, D.; ZITKA, O.; KOPEL, P.; ADAM, V.; KIZEK, R. 3D printed chip for electrochemical detection of influenza virus labeled with CdS quantum dots. **Biosensors & bioelectronics**, v. 54, p. 421–427, 2014.

LI, Y.; LU, Q.; LIU, H.; WANG, J.; ZHANG, P.; LIANG, H.; JIANG, L.; WANG, S. Antibody-modified reduced graphene oxide films with extreme sensitivity to circulating tumor cells. **Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)**, v. 27, n. 43, p. 6848–6854, 2015.

MAIRHOFER, J.; ROPPERT, K.; ERTL, P. Microfluidic systems for pathogen sensing: a review. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 6, p. 4804–4823, 2009.

MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. **Sensors and actuators. B, Chemical**, v. 1, n. 1–6, p. 244–248, 1990.

MANZ, A.; MIYAHARA, Y.; MIURA, J.; WATANABE, Y.; MIYAGI, H.; SATO, K. Design of an open-tubular column liquid chromatograph using silicon chip technology. **Sensors and actuators. B, Chemical**, v. 1, n. 1–6, p. 249–255, 1990.

NGUYEN, N.-T.; WU, Z. Micromixers—a review. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, 2005.

NIELSEN, A. V.; BEAUCHAMP, M. J.; NORDIN, G. P.; WOOLLEY, A. T. 3D printed microfluidics. **Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)**, v. 13, n. 1, p. 45–65, 2020.

OH, S.; KIM, B.; LEE, J. K.; CHOI, S. 3D-printed capillary circuits for rapid, low-cost, portable analysis of blood viscosity. **Sensors and actuators. B, Chemical**, v. 259, p. 106–113, 2018.

PARKER, E. K.; NIELSEN, A. V.; BEAUCHAMP, M. J.; ALMUGHAMSI, H. M.; NIELSEN, J. B.; SONKER, M.; GONG, H.; NORDIN, G. P.; WOOLLEY, A. T. 3D printed microfluidic devices with immunoaffinity monoliths for extraction of preterm birth biomarkers. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 411, n. 21, p. 5405–5413, 2019.

PATTANAYAK, P.; KUMAR, S.; MONICA, S.; SUKRITI, G.; BHUPINDER, V. Microfluidic chips: recent advances, critical strategies in design, applications and future perspectives. **Microfluidics and Nanofluidics**, p. 1–28, 2021.

QIN, D.; XIA, Y.; ROGERS, J. A.; JACKMAN, R. J.; ZHAO, X.-M.; WHITESIDES, G. M. Microfabrication, Microstructures and Microsystems. Em: **Topics in Current Chemistry**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998. p. 1–20.

SQUIRES, T. M.; QUAKE, S. R. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. **Reviews of modern physics**, v. 77, n. 3, p. 977–1026, 2005.

VAN DEN BERG, A; LAMMERINK, T. S. Micro total analysis systems: microfluidic aspects, integration concept and applications. **Microsystem Technology in Chemistry and Life Science**, vol. 194, 1998.

10.29327/2152495.8.23-3

