

Artigo Técnico

Desenvolvimento e fabricação de dispositivos microfluídicos em PEEK e silício e vidro para a modificação genética de células por hidroporação

*Development and manufacturing of microfluidic
devices in PEEK and SoG for genetic
modification of cells by electroporation*

Kelly Farah Torres Vaver^{ab*}, Henrique Reis Wisinewski^c,
Henrique da Costa Oliveira^{ab}, Natália Neto Pereira Cerize^{ad},
Beatriz Nogueira Messias de Miranda^{ac}

^a Programa de Pós-Graduação
Interunidades em
Biotecnologia, Universidade de
São Paulo/Instituto Butantan/
Instituto de Pesquisas
Tecnológicas do Estado de São
Paulo S.A., São Paulo-SP, Brasil.

^b Laboratório de Biotecnologia
Industrial, Instituto de
Pesquisas Tecnológicas do
Estado de São Paulo S.A.,
São Paulo-SP, Brasil.

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

^d Unidade de Negócios em
Bionanomanufatura, Instituto
de Pesquisas Tecnológicas
do Estado de São Paulo
S.A., São Paulo-SP, Brasil.

*e-mail: kellyvaver@ipt.br

Palavras-chave: microfluídica;
microdispositivos; modificação
genética; bioprocessos.

Keywords: *microfluidics; microdevices;
genetic modification; bioprocesses.*

Resumo

A inserção de materiais genéticos exógenos em células, como plasmídeos, DNAs ou RNAs, é um procedimento comum e crítico para aplicações biotecnológicas, como modificação de linhagens produtoras utilizadas em bioprocessos, inserção de genes de interesse e o desenvolvimento de terapias gênicas. A internalização dessas moléculas para modificação genética é possível através de metodologias que permitem transpor a membrana da célula, que tradicionalmente envolvem o uso de carreadores virais, plasmídeos, eletroporação, ou métodos bioquímicos. São metodologias que, embora bem estabelecidas, podem apresentar limitações como altos custos de execução, toxicidade e baixa escalabilidade, podendo limitar ou impossibilitar a utilização dessas células em aplicações biomédicas. Dispositivos microfluídicos têm sido utilizados como alternativas interessantes aos métodos tradicionais de modificação genética, por oferecerem maior precisão de manipulação, utilização de menores quantidades de reagentes e amostras com alta resolução. Para internalização celular, possibilitam uma menor manipulação das amostras, diminuindo taxas de contaminação e otimizando o processo. Neste trabalho foram desenvolvidos dispositivos microfluídicos para serem utilizados como ferramentas para modificação genética em linhagens celulares. Os dispositivos foram fabricados em silício e vidro por fotolitografia com corrosão úmida utilizando KOH, e em PEEK pela técnica de microusinagem. Os dispositivos foram avaliados quanto a sua estanqueidade e pressões suportadas. Os resultados obtidos mostraram que ambos os dispositivos operam sem vazamentos e quebras em pressões de até 8 bar, e os dispositivos em PEEK suportam pressões de até 20 bar. Os dispositivos microfluídicos foram fabricados de maneira satisfatória, e apresentam potencial para serem utilizados futuramente em aplicações biotecnológicas e biomédicas.

Abstract

The insertion of exogenous genetic materials into cells, such as plasmids, DNAs, or RNAs, is a common and critical procedure for biotechnological applications, such as modification of production strains used in bioprocesses, insertion of genes of interest and the development of gene therapies. The internalization of these molecules for genetic modification is possible through methodologies that allow transposing of the cell membrane, which traditionally involves the use of viral carriers, plasmids, electroporation, or biochemical methods. These are methodologies that, although well established, may have limitations such as high execution costs, toxicity, and low scalability, which may limit or preclude the use of these cells in biomedical applications. Microfluidic devices

have been used as alternatives to traditional methods of genetic modification, as they offer better manipulation precision, the use of smaller amounts of reagents, and high-resolution samples. For cellular internalization, they allow less manipulation of samples, reducing contamination rates and optimizing the process. In this work, microfluidic devices were developed to be used as tools for genetic modification in cell lines. The devices were manufactured in silicon and glass by photolithography with wet etching using KOH, and in PEEK by the micro milling technique. The devices were evaluated for their tightness and supported pressures. The results showed that both devices operate without leaks and breaks at pressures of up to 8 bar, and the PEEK devices withstand up to 20 bar pressures. The microfluidic devices were manufactured satisfactorily and have the potential to be used in future biotechnological and biomedical applications.

1 Introdução

Modificações genéticas em células são procedimentos amplamente utilizados para aplicações biotecnológicas, como modificação de linhagens produtoras utilizadas em bioprocessos, inserção de genes de interesse e desenvolvimento de terapias gênicas (LUO; SALTZMAN, 2000). Uma etapa fundamental e limitante para o desenvolvimento de linhagens recombinantes é a entrega dessas moléculas no interior das células, por isso metodologias que causam a permeabilização da membrana celular são utilizadas. Essa abertura temporária pode ser realizada por processos físicos (eletroporação e choque térmico) ou mecânicos (constricção celular e cisalhamento de fluxo), ou com o auxílio de carreadores (vírus e lipídios catiônicos), que transportam a molécula através da membrana celular, garantindo que o material seja entregue. São metodologias que, embora bem estabelecidas, podem apresentar limitações como altos custos de execução, toxicidade e baixa escalabilidade, o que pode limitar ou impossibilitar a aplicação dessas células (STEWART; LANGER; JENSEN, 2018; BROOKS *et al.*, 2020).

Para superar os desafios destes métodos tradicionais, dispositivos microfluídicos têm sido utilizados como alternativas. O ambiente microfluídico oferece uma maior precisão e controle de moléculas no espaço e tempo, além de permitir a manipulação da membrana celular de maneira mais precisa, facilitando a entrega das moléculas para modificação genética (MARQUES; FERNANDES, 2011; SUN; DUAN, 2020; HUR; CHUNG, 2021). Sistemas com essas características possibilitam a modificação de milhares de células em um curto espaço de tempo, possibilitando aplicações industriais que demandam um grande número de linhagens recombinantes; já o maior controle fornece uma maior uniformidade na entrega, possibilitando maiores taxas de viabilidade celular (BROOKS *et al.*, 2020).

Diversas metodologias para essa inserção em células vêm sendo estudadas em dispositivos microfluídicos, e geralmente são inspirados nos métodos tradicionais. Os mais utilizados são dispositivos que causam a permeabilização da membrana celular de maneira física, criando poros transientes através da aplicação de forças mecânicas, que podem ocorrer por eletroporação (GARCIA *et al*, 2016; LISSANDRELLO *et al*, 2020), por constrições celulares (*cell squeezing*) (SHAREI *et al*, 2013; JOO *et al*, 2021) ou por pressões causadas por um fluxo turbulento (hidroporação) (JARRELL *et al*, 2019; HUR *et al.*, 2020).

Os dispositivos baseados em hidroporação se utilizam da microescala e da geometria para criar um fluxo turbulento (também chamado de pressões de cisalhamento de fluxo) e, com isso, permeabilizar a membrana celular. Essa técnica é relativamente nova, mas apresenta taxas de eficiência e viabilidade celular satisfatórias (HUR; CHUNG, 2021; CHAKRABARTY *et al.*, 2022). Hur e colaboradores (2020) desenvolveram um dispositivo com a geometria onde as células, introduzidas em uma alta velocidade, se chocam na parede do microcanal, gerando as deformações na membrana celular, utilizado para a transfecção de linhagens celulares com diversas moléculas. Jarrell e colaboradores (2019) apresentaram um dispositivo microfluídico em vidro com a transfecção de linfócitos T usando RNA mensageiro (mRNA). O dispositivo utiliza o fenômeno denominado *vortex shedding* microfluídico (μ VS), que ocorre com a passagem de fluídos por barreiras, criando poros nas membranas das células através das condições hidrodinâmicas. Quando comparado às metodologias tradicionais, apresentou uma taxa de viabilidade celular menor, porém se mostrou mais eficaz na transfecção, com taxa de eficiência maior. Semelhante a essa abordagem com a utilização de vórtices, Kang e colaboradores (2020) desenvolveram um dispositivo em dimetil polissiloxano (PDMS) para a transfecção de células epiteliais e linfoblastos com mRNA, FITC-dextran e nanopartículas de ouro. A geometria apresentada tem um cruzamento de canais, gerando vórtices no ponto de sobreposição causando a permeabilização da membrana.

Neste trabalho foram desenvolvidos e fabricados dispositivos microfluídicos para, futuramente, serem utilizados para modificações genéticas em células. Foram desenvolvidos dispositivos com duas abordagens diferentes: a primeira, em silício e vidro, fabricado pela técnica de fotolitografia com corrosão úmida, e a segunda com dispositivos em poli(éter-éter-cetona) (PEEK) fabricado por microusinagem. Os dispositivos em silício e vidro permitem uma maior precisão de fabricação, portanto foram fabricados microcanais em menor escala e com pilares internos. Os dispositivos em PEEK, um polímero biocompatível, e a técnica de microfabricação permitem a fabricação de mais dispositivos com maior facilidade, mas com menor precisão, e para estes foram elaboradas geometrias em formato T. Os dispositivos fabricados foram avaliados quanto a sua fabricação e estanqueidade. As aplicações futuras se estendem para áreas

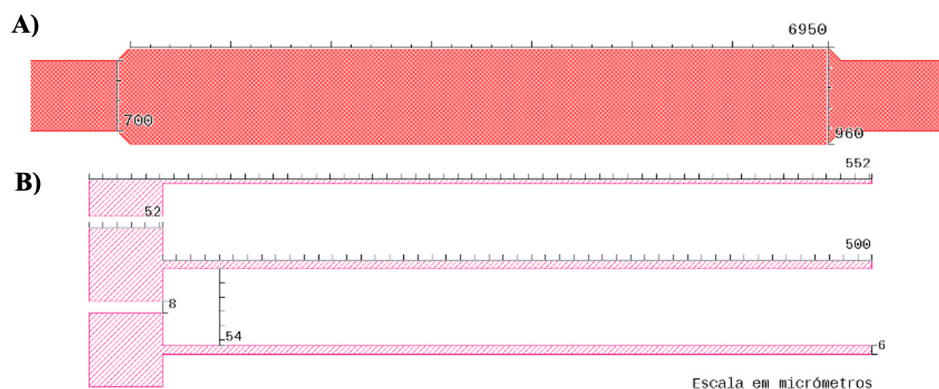
que demandem e utilizem linhagens celulares recombinantes, como a biotecnologia industrial e, em especial, biomédica, que geralmente utilizam linhagens sensíveis e de difícil modificação, podendo se beneficiar destes dispositivos para o desenvolvimento de terapias gênicas ou celulares.

2 Procedimento metodológico

2.1 Fabricação do dispositivo microfluídico em silício e vidro

Os dispositivos foram desenvolvidos em lâminas de silício tipo P polida Si<1,0,0>, e espessura de 675 μm (MEMC Eletronic Materials), e uma lâmina de vidro modelo V015.-040003/B (Plan Optik AG). Os desenhos técnicos dos canais foram feitos em software ADS (Keysight Technologies), com largura de 960 μm e comprimento de 6950 μm , com um furo de acesso para o canal com diâmetro de 700 μm . As estruturas em formato de pilar apresentam 52 μm de largura, com distância de 8 μm entre os pilares. A **FIGURA 1** mostra as medidas e desenhos técnicos dos microcanais descritos.

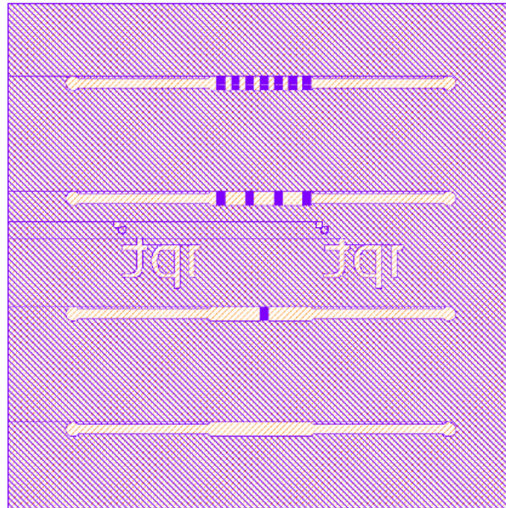
Figura 1 - Desenho técnico e medidas dos microcanais propostos para o dispositivo microfluídico em silício e vidro. Em (A) temos a estrutura do canal vazio e em (B) as estruturas dos pilares de maneira detalhada, mostrando a barreira que será atravessada pelas células.



Fonte: elaborado pelos autores.

A **FIGURA 2** mostra os 4 microcanais propostos: sem barreiras, com 1 conjunto de barreiras, com 4 conjuntos de barreiras e com 7 conjuntos de barreiras.

Figura 2 - Desenho proposto para o dispositivo microfluídico em silício e vidro. Esse desenho foi utilizado para fabricar a máscara, o primeiro passo para a fabricação dos dispositivos. No desenho, as partes que não estão destacadas na cor roxa foram corroídas durante o processo.



Fonte: elaborado pelos autores.

A fabricação foi feita pela metodologia de fotolitografia com corrosão úmida por hidróxido de potássio (KOH). As lâminas de silício foram totalmente recobertas com o promotor de adesão TI-PRIME (MicroChemicals GmbH) e em seguida o fotorresiste AZ 1518 (Merck Performance Materials GmbH), ambos utilizando o spin coater 200X (Brewer Science Inc.) e hot plate 1300X (Brewer Science Inc.) a 100 °C por 90 segundos. Para marcação dos microcanais, as lâminas foram colocadas na alinhadora EVG®620 (EVG), onde foram expostas à máscara com os microcanais por um tempo de exposição de 3,8 segundos. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em uma solução do fotorrevelador AZ351B developer (1 AZ351 : 5 água) (Merck Performance Materials GmbH) por 1 minuto em um agitador magnético sob agitação de 240 rpm.

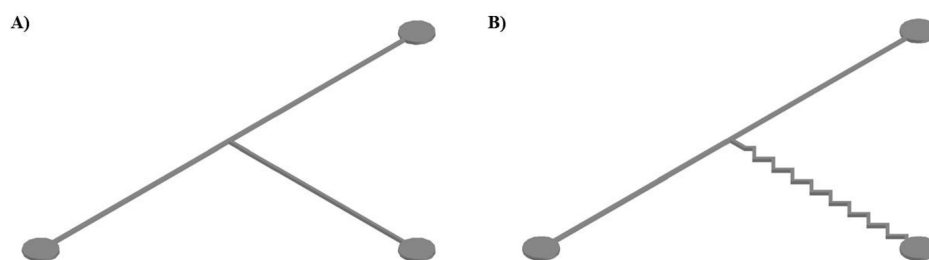
Para a corrosão, as lâminas de silício foram mergulhadas em uma solução de *Buffered Oxide Etch* (BOE) (J.T.Baker) (1:6) comercial por 6 minutos. Posteriormente, as lâminas de silício foram mergulhadas em uma solução de 45% de KOH, e colocadas em um agitador magnético sob agitação de 120 rpm e temperatura de 70 °C durante 45 minutos, tempo calculado para uma corrosão de 30 µm dos microcanais. Depois foi feita uma limpeza na lâmina com o buffer de ácido fluorídrico (HF) por 20 segundos. A selagem da lâmina de silício com a lâmina de vidro foi feita utilizando o equipamento Wafer Bonder AWB-08 (Applied Microengineering Ltd), seguindo o protocolo informado pelo fornecedor com os seguintes parâmetros: 370 °C, 800 V e 0,62 mA.

Para a operação do dispositivo, foi fabricado um suporte para a conexão das mangueiras ao dispositivo, além de auxiliar na estanqueidade do sistema pressurizado. O suporte foi fabricado em aço 1020, por usinagem em máquina CNC com microfresa.

2.2 Projeto e fabricação do dispositivo microfluídico em PEEK

Os dispositivos fabricados são compostos pelo polímero PEEK, com a selagem feita por uma peça, fabricada com o mesmo material, que também contém as aberturas para as conexões das mangueiras. Os desenhos foram feitos em software ADS, com os microcanais com largura de 100 μm , comprimento do canal maior de 300 μm , comprimento do canal menor de 200 μm e profundidade de 100 μm , com um furo de acesso para o canal com diâmetro de 0,3 mm. Como mostra a **FIGURA 3**, foram propostas 2 geometrias diferentes: a geometria A, com o microcanal em formato de T, e a geometria B, com modificações no T. A velocidade média dos veículos do sistema de transporte público urbano, em todos os corredores e nas faixas exclusivas, é monitorada e divulgada mensalmente, por meio dos relatórios informativos. Em agosto/2022 a velocidade média foi de 21,0 km/h e 22,0 km/h nas direções bairro/centro e centro/bairro respectivamente (SPTrans, 2022). As velocidades desenvolvidas pelos ônibus nos corredores são baixas, o que indica que as utilizações de ônibus elétricos e híbridos podem ser viáveis como solução para transporte público menos poluente.

Figura 3 - Desenho técnico e medidas dos microcanais propostos para o dispositivo em PEEK.



Fonte: elaborado pelos autores.

A fabricação dos dispositivos foi feita pela usinagem direta dos blocos de PEEK, utilizando o centro de usinagem de alta precisão de 5 eixos para corte de alta velocidade HSC MP7/5 (Exeron GmbH). A fresa utilizada foi a microfresa de topo de carboneto de tungstênio com diâmetro de ferramenta $D = 0,07$ mm (NS Tools Co.,LTD).

2.3 Análise topológica dos dispositivos microfluídicos

A estrutura dos microcanais foi avaliada por microscopia óptica.

2.4 Testes de estanqueidade

Após a fabricação, os dispositivos foram testados para garantir a sua estanqueidade em vazões específicas para sua operação, além de verificar possíveis entupimentos e vazamentos nos microcanais.

Para os dispositivos em silício e vidro, foi utilizada uma bomba de duplo pistão CP-Class Pump (Teledyne) para circular água destilada e filtrada no dispositivo com mangueiras de teflon de 1/8 de diâmetro externo e 1/16 de diâmetro interno. O dispositivo foi colocado sobre o microscópio digital VHX-600 (Keyence) para monitorar o líquido e acompanhar possíveis entupimentos.

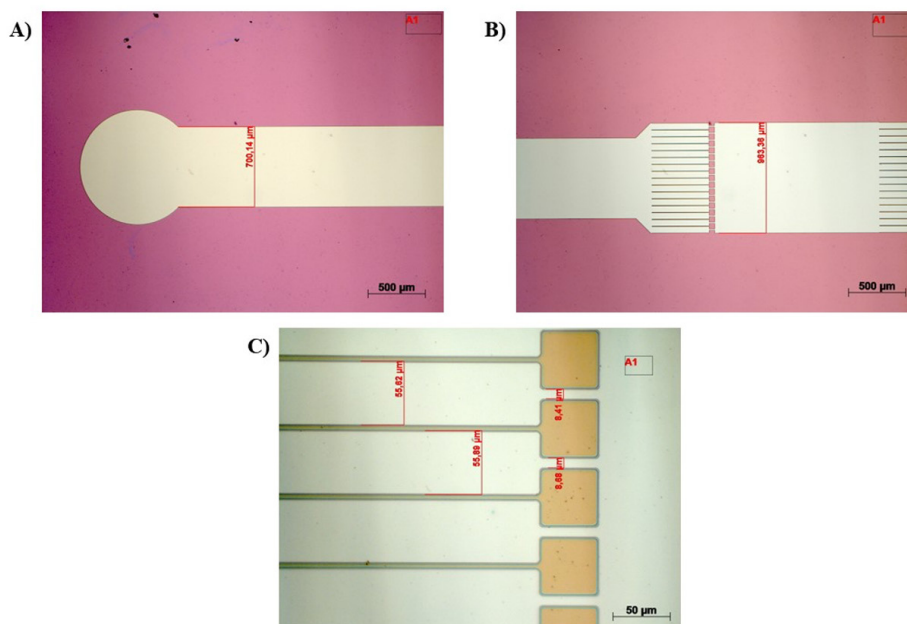
Para os dispositivos em PEEK, foi utilizada uma bomba de seringa BASE 120 NEM-B100-02 A, acoplada com o módulo para alta pressão NEMESYS® (CETONI GmbH), com seringa de aço inoxidável de 50 mL (CETONI GmbH) para circulação de água destilada e filtrada pelo dispositivo, com mangueiras 1/16 de PEEK (IDEX 1538 – Cole-Parmer®). Foram utilizados conectores em PEEK para mangueiras de 1/16 (IDEX XP-286X – Cole-Parmer®) e um conector em Y (IDEX P-512 – SciPro®). Para controle e operação da bomba, foi utilizado o *software* Qmix Elements v20190108 (CETONI GmbH).

3 Resultados e discussão

3.1 Dispositivos em silício e vidro

Os microcanais fabricados foram avaliados por microscopia óptica, verificando a largura dos microcanais e a distância entre os pilares construídos, como mostra a FIGURA 4. Na entrada do microcanal, a largura medida foi de 700,14 μm , entre os conjuntos de barreiras a largura foi de 963,36 μm , entre as estruturas das barreiras de 55,62 μm e entre os pilares de 8,41 μm . As medições feitas correspondem com as medidas do desenho proposto, garantindo que o processo de corrosão manteve as medidas planejadas do desenho da fotomáscara.

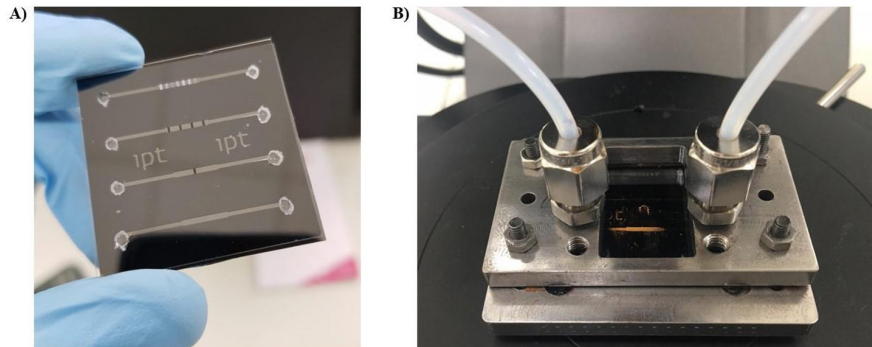
Figura 4 - Medições dos microcanais fabricados em silício. Em (A) é mostrada a entrada do microcanal. Em (B) o espaço entre os conjuntos de barreiras. Em (C) temos as estruturas de barreiras e seus pilares em destaque, com suas respectivas medidas.



Fonte: elaborado pelos autores.

A FIGURA 5 mostra o dispositivo microfluídico final, que é composto pelas lâminas processadas e o suporte desenvolvido para encaixe das mangueiras e conexões.

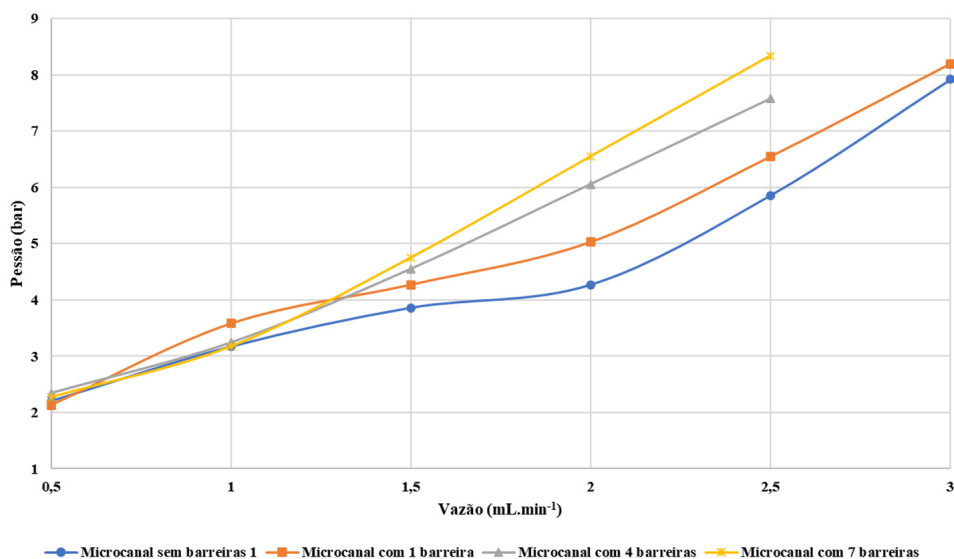
Figura 5 - Dispositivo microfluídico em silício e vidro. Em (A) as lâminas após a selagem anódica, com os microcanais propostos e suas entradas e saídas. Em (B) a montagem do dispositivo, com o suporte para o encaixe das mangueiras de entrada (esquerda) e saída (direita), permitindo a operação do dispositivo.



Fonte: elaborado pelos autores.

A partir da fabricação, foram feitos testes de estanqueidade e resistência do dispositivo, avaliando o fluxo do fluido no interior em seu interior e a pressão resultante no sistema. Todos os 4 microcanais propostos foram testados. No trabalho de Jarrell e colaboradores (2019), os testes biológicos foram realizados em pressões de 8 a 10 bar, portanto os microcanais elaborados foram testados até atingir pressões próximas de 8 bar, como mostrado na FIGURA 6.

Figura 6 - Testes de pressão em função da vazão no dispositivo microfluídico em silício e vidro em todos os microcanais fabricados.



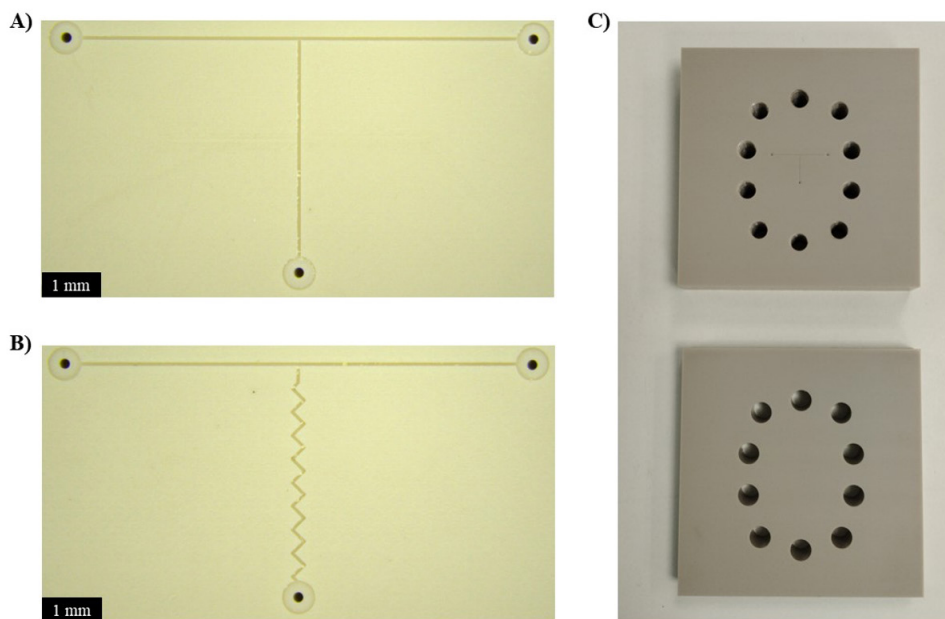
Fonte: elaborado pelos autores.

Os testes de estanqueidade mostraram que o dispositivo microfluídico é funcional, com entrada e saída de líquidos sem ocorrer vazamentos durante o processo. A FIGURA 6 mostrou que os microcanais com mais barreiras atingem pressões mais altas com as mesmas vazões, sugerindo que essas estruturas podem interferir no fluxo dos líquidos nos interiores dos microcanais.

3.2 Dispositivos em PEEK

Os microcanais fabricados foram avaliados por microscopia óptica, como mostra a FIGURA 7A e 7B. Na FIGURA 7C temos a montagem do sistema, contendo o suporte fabricado para o acoplamento das mangueiras e conexões.

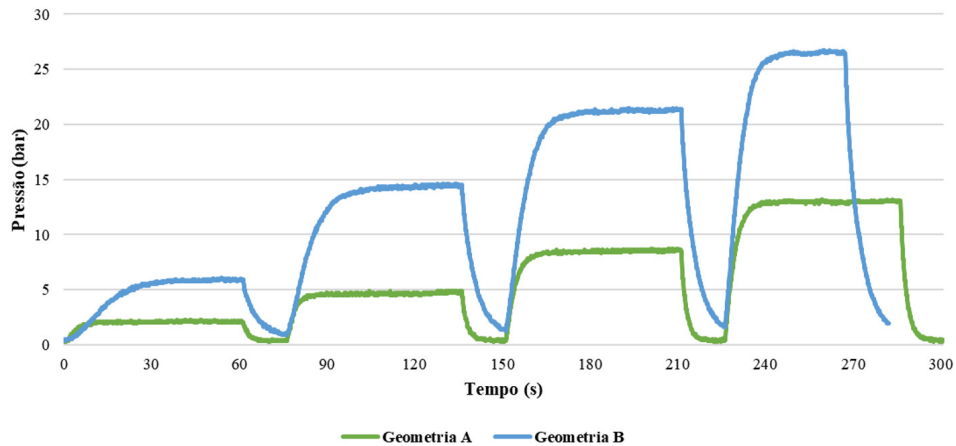
Figura 7 - Microscopia óptica das geometrias fabricadas em PEEK. Em (A) e (B) temos as diferentes geometrias propostas para estes dispositivos. Em (C) temos o dispositivo e o suporte para operação e conexões das mangueiras.



Fonte: elaborado pelos autores.

Os dispositivos foram avaliados quanto a estanqueidade do sistema, verificando a pressão máxima suportada e tempo para a estabilização da pressão requerida. A pressão do sistema foi monitorada pelo próprio *software* ao longo do tempo, gerando os resultados apresentados na FIGURA 8.

Figura 8 - Testes de estanqueidade dos dispositivos microfluídicos em PEEK, comparando os resultados obtidos com as geometrias A e B. Ambas as curvas mostram as pressões resultantes em diferentes vazões ao longo do tempo. Como esperado, em ambos os dispositivos as pressões resultantes são maiores conforme o aumento da vazão.



Fonte: elaborado pelos autores.

Os gráficos gerados mostram que, na geometria A podemos observar que o tempo de estabilização da pressão é entre 0 e 8 segundos. Na geometria B, temos pressões mais elevadas nas mesmas vazões utilizadas na geometria A e, diferente da outra geometria, o tempo de estabilização da pressão foi entre 0 e 20 segundos. Durante o experimento, na vazão de 10 mL.min⁻¹, o ensaio foi interrompido antes do minuto acabar, pois o limite de operação da seringa (27 bar) foi atingido. A TABELA 1 mostra a junção dos resultados obtidos com ambas as geometrias, com a média das vazões obtidas em cada intervalo de vazão.

Tabela 1 - Média dos valores de pressão obtidos nos testes de estanqueidade dos dispositivos microfluídicos em PEEK.

Vazão (mL/min-1)	Pressão resultante (bar)	
	Geometria A	Geometria B
2,5	1,95	4,59
5	4,43	12,28
7,5	8,01	18,74
10	12,22	19,12

Fonte: elaborado pelos autores.

Com isso, foi constatado que ambos os dispositivos em PEEK, com geometrias diferentes, operam sem vazamentos e sem quebras. A geometria B apresenta pressões mais elevadas nas mesmas vazões quando comparada com a geometria A. Esse aumento era esperado, visto que a modificação feita no T gera mais obstáculos para a passagem do líquido, interferindo diretamente na pressão resultante. As informações obtidas sobre o tempo de estabilização da pressão no interior do dispositivo serão utilizadas para a elaboração do protocolo de experimentos biológicos futuramente.

A partir dos resultados de ambos os dispositivos, em silício e vidro e em PEEK, foi possível compará-los quanto à sua operação. Foram estudados dois conjuntos de geometrias diferentes, adaptadas para os materiais e metodologias de fabricação utilizados.

Geralmente, os dispositivos microfluídicos que utilizam a metodologia de hidroporação apresentam microcanais com medidas entre 20 a 80 μm (DENG *et al*, 2018; JARRELL *et al*, 2019; HUR *et al*, 2020). Materiais como o silício e vidro apresentam metodologias de fabricação com uma maior precisão, permitindo a fabricação de microcanais com dimensões menores e com estruturas internas mais complexas. Para a aplicação desejada, as dimensões podem interferir, pois microcanais menores podem favorecer a interação das células com as moléculas para modificação genética, permitindo assim a intensificação do processo (MARQUES; FERNANDES, 2011). Considerando este aspecto, os dispositivos em silício e vidro podem ser uma alternativa interessante, justamente para a fabricação de geometrias em escala menor. Porém, quando comparados, principalmente em termos de escalonamento e reprodutibilidade, os dispositivos fabricados por microusinagem permitem a fabricação de diversas cópias da mesma geometria em um baixo tempo (GUCKENBERGER *et al*, 2015). Considerando que uma das características desejáveis para novas metodologias de modificação genética é um custo reduzido e escalonamento do processo, essas vantagens são interessantes principalmente para a comercialização destes dispositivos (SUN; DUAN, 2020).

Os testes de estanqueidade mostram que os dispositivos em PEEK apresentam uma maior resistência em pressões mais elevadas. Pela diferença de escala dos microcanais entre os dispositivos, entende-se que para a operação deste dispositivo será necessária uma pressão mais elevada do que o mostrado na literatura (JARRELL *et al*, 2019). O polímero PEEK, quando comparado com o silício e vidro, apresenta uma menor propensão a quebras e entupimentos; esses atributos podem ser úteis considerando a possibilidade de escalonamento do processo.

O desenvolvimento de novas metodologias para internalização celular visa, principalmente, superar as limitações que as técnicas atuais apresentam, como altos custos de

execução, toxicidade e baixa escalabilidade, permitindo a ampliação das aplicações e aperfeiçoamento das atuais (STEWART; LANGER; JENSEN, 2018). Algumas características são desejáveis para o desenvolvimento de novas tecnologias, como possibilidade de escalonamento do processo, ser aplicável em diversas linhagens celulares (incluindo linhagens de difícil transfecção ou transformação), biocompatibilidade, controle do sistema e baixo custo (SUN; DUAN, 2020; HUR; CHUNG, 2021). A microfluídica pode contribuir com estes pontos, principalmente com o escalonamento e intensificação do processo.

4 Conclusões

Os dispositivos propostos foram fabricados de maneira satisfatória, apresentando bons resultados de operação em diversas pressões testadas. Os próximos passos vão envolver a elaboração de um protocolo para a utilização do dispositivo em testes biológicos, envolvendo a modificação genética de diversas linhagens celulares, comparando com as metodologias tradicionais.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) (Processo número 88887.497912/2020-00), a Fundação de Apoio ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas (FIPT) e ao Fraunhofer-Institut für Produktionsanlagen und Konstruktionstechnik.

6 Referências

BROOKS, J., Minnick, G., Mukherjee, P., Jaber, A., Chang, L., Espinosa, H. D., & Yang, R. High throughput and highly controllable methods for in vitro intracellular delivery. **Small**, v. 16, n. 51, p. 2004917, 2020.

CHAKRABARTY, P., Gupta, P., Illath, K., Kar, S., Nagai, M., Tseng, F. G., & Santra, T. S. Microfluidic mechanoporation for cellular delivery and analysis. **Materials Today Bio**, p. 100193, 2021.

DENG, Y., Kizer, M., Rada, M., Sage, J., Wang, X., Cheon, D. J., & Chung, A. J. Intracellular delivery of nanomaterials via an inertial microfluidic cell hydroporator. **Nano letters**, v. 18, n. 4, p. 2705-2710, 2018.

GARCIA, P. A., Ge, Z., Kelley, L. E., Holcomb, S. J., & Buie, C. R. High efficiency hydrodynamic bacterial electrotransformation. **Lab on a Chip**, v. 17, n. 3, p. 490-500, 2017.

GUCKENBERGER, D. J., De Groot, T. E., Wan, A. M., Beebe, D. J., & Young, E. W. Micromilling: a method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 15, n. 11, p. 2364-2378, 2015.

HUR, J., Park, I., Lim, K. M., Doh, J., Cho, S. G., & Chung, A. J. Microfluidic cell stretching for highly effective gene delivery into hard-to-transfect primary cells. **ACS nano**, v. 14, n. 11, p. 15094-15106, 2020.

HUR, Jeongsoo; CHUNG, Aram J. Microfluidic and nanofluidic intracellular delivery. **Advanced Science**, v. 8, n. 15, p. 2004595, 2021.

JARRELL, J. A., Twite, A. A., Lau, K. H., Kashani, M. N., Lievano, A. A., Acevedo, J., ... & Pawell, R. S. Intracellular delivery of mRNA to human primary T cells with microfluidic vortex shedding. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

JOO, B., Hur, J., Kim, G. B., Yun, S. G., & Chung, A. J. Highly efficient transfection of human primary T lymphocytes using droplet-enabled mechanoporation. **ACS nano**, v. 15, n. 8, p. 12888-12898, 2021.

LISSANDRELLO, C. A., Santos, J. A., Hsi, P., Welch, M., Mott, V. L., Kim, E. S., ... & Tandon, V. High-throughput continuous-flow microfluidic electroporation of mRNA into primary human T cells for applications in cellular therapy manufacturing. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2020.

LUO, Dan; SALTZMAN, W. Mark. Synthetic DNA delivery systems. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 33-37, 2000.

MARQUES, Marco PC; FERNANDES, Pedro. Microfluidic devices: useful tools for bio-process intensification. **Molecules**, v. 16, n. 10, p. 8368-8401, 2011.

SHAREI, A., Cho, N., Mao, S., Jackson, E., Poceviciute, R., Adamo, A., ... & Jensen, K. F. Cell squeezing as a robust, microfluidic intracellular delivery platform. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 81, p. e50980, 2013.

STEWART, Martin P.; LANGER, Robert; JENSEN, Klavs F. Intracellular delivery by membrane disruption: mechanisms, strategies, and concepts. **Chemical reviews**, v. 118, n. 16, p. 7409-7531, 2018.

SUN, Mengjie; DUAN, Xuexin. Recent advances in micro/nanoscale intracellular delivery. **Nanotechnology and Precision Engineering**, v. 3, n. 1, p. 18-31, 2020.

10.29327/2152495.8.23-1

