UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ESCOLA POLITÉCNICA

SERGIO LOPERA ARISTIZÁBAL

Desenvolvimento de sistemas Lab-on-a-Chip para análises em biofísica celular

São Paulo

SERGIO LOPERA ARISTIZÁBAL

# Desenvolvimento de sistemas Lab-on-Chip para análises em biofísica celular

Tese apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para obtenção do titulo de Doutor em Engenharia.

São Paulo

SERGIO LOPERA ARISTIZÁBAL

# Desenvolvimento de sistemas Lab-on-Chip para análises em biofísica celular

Tese apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para obtenção do titulo de Doutor em Engenharia.

Área de Concentração: Engenharia Elétrica Orientador: Prof. Dr. Ronaldo D. Mansano

São Paulo

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com anuência de seu orientador.

São Paulo, 16 de março de 2012

Assinatura do autor

Assinatura do orientador

### FICHA CATALOGRÁFICA

Lopera Aristizábal, Sergio Desenvolvimento de sistemas Lab-on-Chip para análises em biofísica celular / S. Lopera Aristizábal. -- ed.rev. -- São Paulo, 2012. 150p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos.

1. Lab-on-Chip 2. PDMS 3. Microfluídica 4. Biofísica 5. Prototipagem rápida 6. Microeletrônica I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos II. t. Dedico este trabalho a *Neda*, minha esposa, minha amada, minha companheira nesta aventura chamada vida, a quem o tempo saberá compensar com mil vitórias e sonhos realizados por seu apoio incondicional e sacrifício para que eu possa superar esta etapa no meu caminho pelo conhecimento.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Ronaldo Domingues Mansano pela confiança, incentivo e pela incansável dedicação na orientação deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Douglas Weibel do departamento de Bioquímica da Universidade de Wisconsin por me brindar a oportunidade de explorar novas áreas de pesquisa e aprender do seu grupo.

Agradeço às professoras Teresinha e Satiko do Laboratório de controle biológico da Faculdade de farmácia da USP pela boa vontade para realizarmos trabalhos conjuntos.

Aos meus colegas e amigos do laboratório, Gustavo Marcati, Zaíra Mendez, Fernando de Almeida, Massaki Igarashi, Vannesa del Cacho, Larissa Damiani e todos aqueles involuntariamente omitidos nesta lista, pelos momentos de descontração, de reflexão e cooperação científica.

Agradeço aos meus pais por acreditar sempre em mim e confiar nas minhas decisões e metas e ter contribuído para que eu esteja aqui.

Agradeço ao Adir e a mariana por sua valiosa contribuição as imagens de microscopia eletrônica deste trabalho.

Agradeço em geral a todos os técnicos do LSI, Julio, Rubinho, Alexandre por seu suporte para que as coisas funcionem, mais cedo ou mais tarde, e especialmente ao seu Elísio pela sua paciência e seu apoio para construir protótipos de todas minhas idéias.

Agradeço ao CNPQ por financiar este projeto de doutorado.

#### RESUMO

SERGIO, L. A. Desenvolvimento de sistemas lab-on-a-chip para análises em biofísica celular. 2012. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Este estudo tem por objetivo o desenvolvimento de uma metodologia de fabricação de sistemas Lab On Chip, úteis no estudo de processos celulares, a partir da adaptação de tecnologias próprias da microeletrônica. Foram exploradas todas as etapas envolvidas na fabricação de sistemas Lab On Chip em Poli-Di-Metil-Siloxano e desenvolvidos protocolos de fabricação de moldes, técnicas de moldagem e processos de ativação de PDMS com plasma de oxigênio para sua solda química sobre diferentes materiais, obtendo uniões irreversíveis que permitem a integração com outras tecnologias como a microeletrônica em silício e o encapsulamento com cerâmica verde, completando uma metodologia que permite a prototipagem de dispositivos micro-fluídicos de multicamadas com um nível de sofisticação comparável ao estado da arte. Foi desenvolvido o protótipo de um equipamento ótico para litografia por projeção que permite a fabricação de máscaras óticas com resolução de 5 µm e oferece a possibilidade de litografia em escala de cinzas para gerar canais e estruturas com relevos arbitrários. Foram adicionalmente abordados três problemas de biofísica celular, para os quais foram propostos novos dispositivos para separação de células móveis de acordo às suas velocidades lineares, dispositivos para crescimento confinado de bactérias e dispositivos para manipulação da curvatura de membranas celulares.

**Palavras-chaves:** Lab-on-a-Chip, PDMS, Micro-fluídica, Microeletrônica, Biofísica, Prototipagem rápida.

#### ABSTRACT

SERGIO, L. A. **Development of Lab-On-Chip systems for biophysical analysis.** 2012. PhD. Theses –Polytechnic School, University of São Paulo, São Paulo, 2012.

The objective of this study is the development of a methodology for the fabrication of Lab On Chip systems, useful for the analysis of cellular processes, through the adaptation of technologies from microelectronics. All the steps involved with the fabrication of Lab on Chip system in Poly-Di-Methil-Siloxane (PDMS) were explored, developing protocols for mold fabrication, molding techniques and processes for oxygen plasma activation of PDMS for its bonding to different materials, achieving irreversible bonds that enable the integration with other technologies such as silicon microelectronics and green tape packaging. All this techniques constitute a methodology that allows the prototyping of multilayer microfluidic devices comparable with state of the art devices. It was developed the prototype of optical equipment for projection lithography capable of mask fabrication with 5 µm resolution, and which offers also the capability of gray scale lithography for the generation of free form microchannels. Additionally three different problems in cellular biophysics where boarded, proposing new devices for the separation of motile cells according to their linear speeds in liquids, new devices for constrained bacterial growth and for curvature manipulation of cell membranes.

**Keywords**: Lab-on-Chip, PDMS, Microfluidics, Microelectronics, Biophysics, Rapid Prototyping.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MEMS	Micro Electro-Mechanical-Systems
PDMS	Poly Di-Methyl-Siloxane
HMDS	Hexa-Methyl-Di-Silazane
LOC	Lab On Chip
μΤΑS	Micro Total Analysis System
PCR	Polymerase Chain Reaction
IFC	Integrated Fluidic Circuit
CAC	Cell Affinity Chromatography
FC	Flow Cytometry
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
КОН	Potassium Hydroxide
ТМАН	Tetra Methyl Ammonium Hydroxide
COC	Cyclic Olefin Copolymer
СОР	Cyclic Olefin Polymer
WCAM	Wisconsin Center for Applied Microelectronics
CNC	Computer Numerical Control
LSI	Laboratório de Sistemas Integráveis
BOE	Buffered Oxide Etch
PVP	Poly Vinyl Pyrrolidone
LTCC	Low Temperature Co-fired Ceramics
AFM	Atomic Force Microscopy
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
ССD	Charge Coupling Device
DMD	Digital Micromirror Display

# LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ALGUNS CHIPS COMERCIAIS: EMPRESAS DOLOMITE (ESQ), NSG (CENT) E
NANOPOINI (DIR)
FIGURA 2. <i>DIGITAL ARRAY CHIP</i> (ESQ) E <i>TOPAZ</i> (DIR) DA <i>FLUIDIGM</i>
FIGURA 3 PRIMITIVOS: MISTURADOR (ESQ), MEMÓRIA MULTIPLEXADA (CENT), TRINCO
(DIR)
FIGURA 4 DISPOSITIVOS DE MICROFLUÍDICA DIGITAL POR ELECTROWETTING:
MISTURADOR (ESQ), SEQÜENCIADOR DE DNA (CENT) E DETECTOR METAL-
SEMICONDUTOR-METAL EM UM DISPOSITIVO DE ELECTROWETTING (DIR)
FIGURA 5 DISPOSITIVOS PARA PRODUÇÃO E SEPARAÇÃO DE MICROGOTAS (ESO).
INIEÇÃO DE REAGENTES (CENT) E MICROEMUL SÕES COMPOSTAS DE MICROGOTAS
(DIP)
ΕΙΩΙΙΩΛ 6 ΑΦΩΑΝΙΟ ΜΙΩΩΟΕΙ ΙΙΊΠΙΩΟ ΠΕ ΑΙ ΤΑ ΠΕΝΩΙΝΑΠΕ ΡΑΩΛ ΩΑΦΤΗΡΑ Ε ΕΣΤΗΠΟ ΠΕ
CÉLULAS IMACENS TOMADAS DE WANG ET AL (2007)
ELEULAS, IMAGENS TOMADAS DE WANG ET AL. (2007)
FIGURA / QUIMIOSTATO FARA CULTURA CELULAR, TOMADA DA DALAGADDE (2007)12
FIGURA & MICRO-CANAIS FABRICADOS EM SILICIO, TOMADA DE
HI IP://WWW.IMM.CNK.II/EN/IMM_EN/RESEARCH/MICROSYSTEMS/FABR_MICROSYS
FIGURA 9. MICKO-CANAIS FABRICADOS EM VIDRO, TOMADA DE LIN ET AL. (2003)
FIGURA 10. MICKO-CANAIS FABRICADOS EM SU8 E PMMA, TOMADAS DE HUANG, 2006 E
TSAO, 2009
FIGURA 11 ESTIMATIVA DO NUMERO ANUAL DE PUBLICAÇÕES REFERENCIANDO CADA
MATERIAL PARA MICRO-FLUIDICA, TOMADA DE TSAO ET AL. (2009)
FIGURA 12 SEQUENCIA DE FABRICAÇAO DE UM DISPOSITIVO MICRO-FLUIDICO COM
PDMS
FIGURA 13 DIAGRAMA ILUSTRANDO A REAÇÃO DE DESIDRATAÇÃO21
FIGURA 14 COMPARAÇÃO DE 5 TÉCNICAS DE SOLDA PDMS/PDMS, TOMADA DE EDDINGS
ET AL.(2008)
FIGURA 15 MICROCANAL EM PDMS ANTES E DEPOIS DE RECOBRIR COM SOL-GEL,
TOMADA DE ABATE ET AL (2008)
FIGURA 16. ESQUEMA DE MOLDES ABERTOS E FECHADOS
FIGURA 17. SEQÜÊNCIA DE FABRICAÇÃO DOS MOLDES28
FIGURA 18. IMAGEM EM ESCALA DE CINZA PARA UM CANAL DE SEÇÃO TRIANGULAR
(ESQ) E PERFIL 3D (DIR)
FIGURA 19. SEQÜÊNCIA PARA FABRICAÇÃO DE NANOMOLDES: A) LITOGRAFIA DE
MICROESTRUTURAS, B) MOLDAGEM DA MÁSCARA DE FASE, C) EXPOSIÇÃO COM
MÁSCARA DE FASE, D) NANOESTRUTURAS
FIGURA 20. ESOUEMAS DOS ARRANJOS PARA MOLDAGEM FECHADA
FIGURA 21 FOTOGRAFIA DOS REATORES DE PLASMA RF (ESO) E REMOTO (DIR)
FIGURA 22. REATORES DE PLASMA INDUTIVO: DESENVOLVIDO NO LSI (ESO) E HARRICK
(DIR)
FIGURA 23 FOTOGRAFIA DAS AMOSTRAS UTILIZADAS PARA ESTUDAR OS DIFERENTES
PROCESSOS DE MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DO PDMS
FIGURA 24 SECCÃO TRANSVERSAL DA CONFIGURAÇÃO PROPOSTA (ESO) E ESOUEMA 3D
(DIR)
EICUDA 25 DESENIUO DOS DISDOSITIVOS DEOIETADOS (ESO) E DETALUE DE UM
DISDOSITIVO MOSTDANDO SEUS ELEMENTOS (DID)
DISPOSITIVO MOSTRANDO SEOS ELEMENTOS (DIR)45 ELEMENTOS (DIR)
FIGURA 20. FOTOGRAFIA DE DISPOSITIVOS A FIBRA OTICA NO LABORATORIO
FIGURA 27 LA YOUT DO MISTURADOR (ESQ), COMPOSIÇÃO DE CAMADAS (DIR)
FIGURA 28. MOLDE PARA CHIPS (ESQ), CHIPS EM PDMS AO LADO DE MINI CONECTORES
(DIK)
FIGURA 29. FUTUGRAFIA DE UM MULDE EM AZI318
FIGURA 30. MICKOGRAFIA OPTICAS (ESQ) E ELETRONICAS (CENT E DIR) DAS
ESTRUTURAS DE DOIS NIVEIS FABRICADAS
FIGURA 31. PRE-MOLDE USINADO EM ACRILICO (ESQ), MOLDE EM PDMS (CENTRO), PEÇA
FINAL EM PDMS (DIR)
FIGURA 32. NEGATIVO EM PDMS DO MOLDE (ESQ) E COPIA POSITIVA EM PDMS (DIR)52

FIGURA 33. MOLDE POR LITOGRAFIA EM ESCALA DE CINZAS (ESQ), PERFIS MEDIDOS NO
PERFILÓMETRO DEKTAK 6M (DIR)53
FIGURA 34. MICROGRAFIAS EM MEV DE LINHAS SUBMICROMETRICAS54
FIGURA 35 CAMADAS DE PDMS OBTIDAS POR SPINNING EM MOLDES DE DOIS NÍVEIS55
FIGURA 36. DISPOSITIVO DE DUAS CAMADAS FABRICADO EM MOLDE FECHADO
FIGURA 37. TESTES DE COLAGEM PDMS/PDMS (ESQ), PDMS/SILÍCIO (CENT.) E
PDMS/VIDRO (DIR)
FIGURA 38. DISPOSITIVO DE DOIS NÍVEIS SOLDADO POR ATIVAÇÃO COM PLASMA DE O2.
FIGURA 39. DISPOSITIVO DE TRÊS CAMADAS SOLDADAS POR DIFUSÃO DE
CATALISADOR. COM CORANTE VERMELHO E AZUL AS CAMADAS DE VÁLVULAS DE
CONTROLE SOBRE CANAIS CIRCULARES
FIGURA 40. FOTOGRAFIA DE UMA GOTA DE ÁGUA DI SOBRE O PDMS ANTES E DEPÓS DO
RECOBRIMENTO COM PVP
FIGURA 41. MICROGRAFIA AFM DE UMA AMOSTRA DE PDMS ANTES E DEPÓS DO
RECOBRIMENTO COM PVP 61
FIGURA 42 ÂNGULO DE CONTATO DE AMOSTRAS DE PDMS PROCESSADAS COM PLASMA
DE CE/Ha
FIGURA 43 MEDIDAS DE ÂNGULO DE CONTATO DE MOSTRAS DE PDMS E VIDRO
PROCESSADAS COM PLASMAS DE CE4/H2 A 300MTORR 30W 63
FIGURA 44. CURVAS DE ESPECTROSCOPIA DE FORCA ATÔMICA (ESO) E SALTO DE PULL-
OFF (DIR)
FIGURA 45 MICROGRAFIAS AFM DAS AMOSTRAS DE PDMS' NÃO TRATADAS (FSO)
PROCESSADAS COM CE4+20% H2 POR LIM MINUTO (CENTRO) E 10 MINUTOS (DIR) 66
FIGURA 46 MICROGRAFIA AFM DA AMOSTRA DE PDMS: REFERÊNCIA (ESO) E TRATADA
COM HMDS (DIR) 67
FIGURA 47 DISPOSITIVO FM PDMS LINIDO A LIM SENSOR DE PRESSÃO 68
FIGURA 48 DISPOSITIVOS COM CANAIS E FIBRAS ÓPTICAS (A) CANAIS EL UÍDICOS (B) E
(C) FIBRAS ÓTICAS
FIGURA 49 CHIPS DE SILÍCIO COM SUL COS PARA FIBRA (A) E AL INHAMENTO (B) (ESO) E
CHIPS APÓS SOL DAR O PDMS (DIR)
FIGURA 50 FOTOGRAFIAS DE LIM CHIP CONFCTADO ÀS TUBULACÕES E FIBRAS (ESO) E
DETAL HE DO CHIP SENDO II LIMINADO COM LIM LED DE 455NM (DIR) 70
FIGURA 51 ELETRODOS EM TITÂNIO DEPOSITADOS POR SPUTTERING SOBRE VIDRO
(ESO) DETALHE DE MICROCANAL EM PDMS (MARCADO COM CORANTE) SOLDADO
SOBRE ELETRODOS (DIR) 70
FIGURA 52 LEVEDURAS SENDO CAPTURADAS PELO CAMPO EL ÉTRICO NOS EL ETRODOS
FIGURA 53. DISPOSITIVO EM LTCC (MISTURADOR) COM JANELA DE VIDRO COLADO COM
PDMS
FIGURA 54. ESOUEMA DE CIRCUITO COM TRÊS GERADORES DE MICRO-EMULSÕES (ESO).
DISPOSITIVO FABRICADO (DIR).
FIGURA 55. DESENHO ESOUEMÁTICO DO SISTEMA LITOGRÁFICO
FIGURA 56. DISTRIBUIÇÃO DE IRRADIÂNCIA NO PLANO DO SUBSTRATO: GRÁFICO 3D
(ESO) IMAGEM 2D (CENT) E PERFIL DE INTENSIDADE DA DIAGONAL (DIR) 77
FIGURA 57 MICROGRAFIAS DE LIMA GRAVAÇÃO SEM (ESO) E COM (DIR) COMPENSAÇÃO
DE IRRADIÂNCIA
FIGURA 58 MÁSCARA ORIGINAL (ESO) E COMPENSAÇÃO POR PROXIMIDADE COM $\mathbf{K} = 2$
(DIR).
FIGURA 59 RESULTADOS DE GRAVAR OS PADRÕES DA FIGURA 58 EM FOTORRESISTE 80
FIGURA 60 PADRÃO DE RESOLUÇÃO UTILIZADO PARA TESTES (ESO) E RESULTADO NO
FOTORESISTE AZI518(DIR)
FIGURA 62 DETALHE DOS RESULTADOS OBTIDOS: LINHAS (ESO) CÍRCULOS E
OUADRADOS (DIR)
FIGURA 63, MICROGRAFIAS AFM DE UMA GRAVAÇÃO PARA TRÊS PLANOS DE ENFOQUE
DIFERENTES
FIGURA 64. GRÁFICO DOS INCREMENTOS MEDIDOS (ESO) E IMAGEM COMPOSTA DO
DESLOCAMENTO DA MARCA PROJETADA (DIR).
FIGURA 65. IMAGEM COMPOSTA DE LINHAS PARALELAS DESLOCADAS

FIGURA 66. GRADIENTES DE DOSE DESENHADOS (ESQ), TRANSFERIDOS AO
FOTORRESISTE (CENT) E PERFIL MEDIDO NO PERFILOMETRO (DIR)
FIGURA 67. CURVA DE EXPOSIÇÃO VS PROFUNDIDADE NO RESISTE AZ322
FIGURA 68. PERFIS DE DOSE LINEAR E EXPONENCIAL (ESQ), RELEVOS RESULTANTES NO
RESISTE (DIR)
FIGURA 69. MICROMISTURADOR DE SEÇÃO TRANSVERSAL TRIANGULAR VARIAVEL88
FIGURA 70. MICROLENTES ESFERICAS (ESQ) E CONICAS (DIR) FABRICADAS COM O
SISTEMA LITOGRAFICO DESENVOLVIDO
FIGURA 71. DESENHO ESQUEMATICO DO DISPOSITIVO PROPOSTO
FIGURA 72. EXPLICAÇÃO DO EFEITO DE ORIENTAÇÃO (ADAPTADA DE HULME ET AL.
92
FIGURA 73. DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL SIMULADA NO DISPOSITIVO DE
SEPARAÇAO (ESQUERDA), E NUMERO DE CELULAS NA SAIDA DO DISPOSITIVO EM
FUNÇAO DO TEMPO (DIREITA)
FIGURA /4. COMPORTAMENTO SIMULADO DA RESOLUÇÃO COM O COMPRIMENTO DO
DISPOSITIVO E A DISPERSAO DE VELOCIDADES
FIGURA 75. EFEITO DA TAXA DE ENTRADA DE CELULAS SOBRE A RESOLUÇÃO
FOI OBSERVADO TAMBEM QUE SE A VELOCIDADE DE TODAS AS CELULAS E DIMINUIDA
POR UM FATOR O EFEITO SOBRE A RESOLUÇÃO E EQUIVALENTE A TER UM
AUMENTO DO COMPRIMENTO DO DISPOSITIVO, O QUE PODERIA SER CONSEGUIDO
AJUSTANDO A VISCOSIDADE DO BUFFER DE MOBILIDADE UTILIZADO NOS
EXPERIMENTOS
FIGURA 70. CURVAS DE SEPARAÇÃO PARA DIFERENTES LARGURAS DE PULSO
FIGURA //. PRIMEIRA VERSAU DU DISPUSITI VU FABRICADU
FIGURA 78. MICROGRAFIA DE CAMPO CLARO (ESQ), ELIMINAÇÃO DE FUNDO ESTATICO
(CENT), KASTREAMENTO DAS TRAJETORIAS (DIR)
FIGURA 79. HISTOGRAMAS DE VELOCIDADE PARA DIFERENTES TEMPOS NA ENTRADA (ESO) E NA SAÍDA DO DISDOSITIVO (DID) $102$
(ESQ) E NA SAIDA DU DISPUSITIVU (DIR)102 EICUDA 20. TRÊS RRIMEIRAS VERSÕES DO DISPOSITIVO.
FIGURA 80. IRES PRIVIEIRAS VERSOES DO DISPOSITIVO
VEDMELIO
ΥΕΛΝΙΕΣΠΟ
CONTROLE
EIGURA 83 I AVOUT DO CONTINITO COMPLETO (ESO). VISTA DETAL HADA DO PADRÃO
PEDETIDO (CENTRO) E DADDÃO TRANSFERIDO RADA A CAROSE 400 PADRAO COM
IIMA I AMÍNIII A E AI CUMAS BACTÉDIAS DADA ILLISTDAD O CONFINAMENTO (DID)
UMA LAMINULA E ALGUMAS DACTERIAS FARA ILUSTRAR O CONTINAMENTO (DIR). 107
FIGURA 86 DISPOSITIVO EM AGAROSE COM LARGURAS DE 1.5 (ESO) E 2 MM (DIR)
$M \acute{A} STEP COM ALTURA DE 4.7 MM$
FIGURA 87 ESPOROS DE STREPTOMVOES ORESCENDO EM TSR A O HORAS 3H E SH DE
CRESCIMENTO 100
FIGURA 88 MICRO I ABIRINTOS DE TSR $\pm$ AGAR COM S. C. ANTES (ESO) E APÓS (DIR) A
GERMINAÇÃO
FIGURA 89 CUI TURA DE S C EM CHIPS DE AGAROSE MOSTRANDO LUGARES COM O
CONFINAMENTO ESPERADO E OUTROS CASOS ONDE SOBRE O CRESCIMENTO
ULTRAPASSOU AS BARREIRAS DAS PAREDES
FIGURA 90 MICROLABIRINTO EM PDMS EXIBINDO UM FORTE CONFINAMENTO DAS
CÉLUI AS
FIGURA 91 EXEMPLOS DE CRESCIMENTO BEM CONFINADO DE SC EM MICROCANAIS 112
FIGURA 92 DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO PARA DEFORMAÇÃO DE ESFEROPI ASTOS
CONCEITO (ESO) LAYOUT (CENT) DETAI HE DO LAYOUT (DIR) 114
FIGURA 93. MICROGRAFIAS DE CAMPO CLARO E DAPI DE ESFEROPI ASTOS NO
DISPOSITIVO (ESO) E MICROGRAFIAS CAMPO CLARO, DAPI E NAO DE
ESFEROPLASTOS PRESOS EM UM MICROCANAL (DIR)

### **SUMARIO**

1	Intro	trodução1				
	1.1	Definição de Lab-On-Chip	1			
2	Obje	etivos				
3	Rev	Revisão da literatura				
	3.1	Estado da arte dos Lab on Chip	5			
	3.2	Materiais e Métodos utilizados na fabricação dos LOC	14			
	3.3	Prototipagem em PDMS	18			
4	Mat	eriais e Métodos	24			
	4.1	Listado de equipamentos utilizados	24			
	4.2	Listado de Materiais utilizados	25			
	4.3	Processo desenvolvidos para de fabricação de sistemas lab on a chip	26			
5	4.3.2 4.3.2 4.3.2 4.3.4 4.3.4 Rest 5.1 5.1.2	<ol> <li>Processos de microfabricação de Moldes</li></ol>	26 32 33 33 37 41 50 50 50 50 50 54			
	5.1.3 5.1.4 5.1.4 5.2	<ul> <li>Soldagem de PDMS</li> <li>Modificação superficial do PDMS</li> <li>Integração com outras Tecnologias</li> <li>Sistema para litografia sem máscara.</li> </ul>	56 60 67 73			
	5.2.1 5.2.1 5.2.1 5.2.1	<ol> <li>Introdução</li> <li>Caracterização do sistema litográfico</li> <li>Litografia em escalas de cinza</li> <li>Dispositivos e aplicações</li> </ol>	73 76 85 90			
6	5.3. Disc	1 Chips para estudos celulares	90 117			
7	Con	Conclusão				
A	NEXO	1. Publicações derivadas deste trabalho	122			
A	ANEXO 2. Compendio de receitas de Microfabricação 123					
ANEXO 3. Descrição técnica do equipamento litográfico desenvolvido 126						
А	NEXO	4. Protocolos e processos bioquímicos utilizados.	144			
8	8 Referencias					

# 1 INTRODUÇÃO

Com a integração de diferentes tecnologias como a microeletrônica, os sistemas micromecânicos e a ótica, é possível criar uma variedade de dispositivos que reúnem em um só chip diversas funções como dosagem, mistura, classificação, excitação e detecção de pequenas amostras, os quais com o avanço das micro e nano tecnologias chegam cada vez mais perto das dimensões do mundo biológico, conseguindo interações no nível celular ou mesmo molecular, facilitando o estudo de sistemas e processos biológicos complexos. Este fato explica o grande interesse mundial no estudo dos chamados sistemas *Lab-On-Chip* (LOC), laboratórios em chip, que incentivam este trabalho de tese.

### 1.1 DEFINIÇÃO DE LAB-ON-CHIP

As tecnologias de microfabricação em silício, que possibilitaram a integração de circuitos e a rápida evolução da microeletrônica, deram também origem ao desenvolvimento de novos sensores e sistemas miniaturizados de instrumentação com grande potencial de aplicação em diferentes áreas como a medicina, a biologia, análise química e as telecomunicações entre outras. Os primeiros sensores de pressão piezo-resistivos fabricados com tecnologias apropriadas da microeletrônica, motivaram o estudo do silício como material mecânico (PETERSEN et al.,1982) surgindo diferentes propostas de estruturas mecânicas, integradas com eletrônica, capazes de interagir com o meio externo, não só por sinais elétricos mas térmicos, ópticos, mecânicos e químicos. Estes sistemas Micro-Eletro-Mecânicos (MEMS) e micromáquinas, consideradas a segunda revolução do silício ocuparam mercados de alto volume de produção como a

área automotiva e a informática, sendo os principais produtos as cabeças de injeção para impressoras a jato de tinta, os acelerômetros para *airbags*, sensores de pressão para diversas aplicações e recentemente micro-espelhos para comutação e projeção de dados (BRYZEK et al., 1996; KO et al.,2007).

Simultaneamente a microeletrônica inspirou também a miniaturização de sistemas complexos e processos. Já na década de 70 foram publicados trabalhos de integração total de sistemas de análise, sistemas que foram denominados µTAS (*Micro Total Analysis Systems*) por Manz em 1990. Terry, Jerman e Angell apresentaram um cromatógrafo gasoso fabricado em uma lâmina de silício de duas polegadas incluindo microcanais de separação e válvulas para injeção de amostras (TERRY et al.,1979). Outras aplicações onde a miniaturização demonstrou seu sucesso foram a eletroforese capilar (LIU; CUI, 2005), a detecção de moléculas (KURITAA et al., 2002), o estudo de processos celulares (HUANG et al., 2007; VALERO et al., 2008; YAMAGUCHIA et al., 2009) a cristalização e síntese de proteínas (HANSEN et al., 2002), e a amplificação PCR (*Polimerase Chain Reaction*) (ZHANG et al., 2007 e BHAT et al., 2009)

Com a conseqüente miniaturização e integração de sistemas cada vez mais complexos, para produzir plataformas não só de análise, mas de síntese, aperfeiçoou-se o conceito de Laboratórios em Chip (LOC, pela sigla em inglês). Os LOC reúnem os avanços em microeletrônica, micro-óptica, micro-fluídica e micro-mecânica para a manipulação de amostras com volumes na ordem de picolitros e realizar reações e testes de maneira segura e eficiente.

A grande vantagem dos LOC está na possibilidade de executar rotinas de análise ou síntese com quantidades diminutas de reagentes, de forma automatizada, com mínima

ou nenhuma intervenção humana. Processos como o mapeamento do genoma humano ou experiências de química combinatorial para desenvolvimento de novos medicamentos ou a otimização de processos de cristalização de proteínas, rapidamente aproveitaram estas características dos LOC, conduzindo a criação de novas empresas e produtos baseados no conceito LOC tais como plataformas de instrumentação para detecção de moléculas, equipamentos de separação eletroforética (*Bio-Rad* da Agilent), sistemas de amplificação PCR (*Bio-Mark* da Fluidigm), entre outros.

No capitulo 3 é apresentada uma compilação do estado da arte dos sistemas LOC a partir de uma revisão da literatura sobre os principais materiais e métodos utilizados na fabricação de sistemas LOC e suas aplicações. No capitulo 4 são descritos os diversos métodos de microfabricação de moldes, técnicas de moldagem e processos de ativação de PDMS com plasma de oxigênio para solda química, que foram desenvolvidos durante este trabalho de doutorado e no capitulo 5.1 os resultados obtidos com estes métodos.

Também no capitulo 5.2 é apresentado um protótipo de sistema ótico para litografia por projeção com resolução de 5 µm, sua caracterização e utilização para fabricação de máscaras óticas e para litografia em escala de cinzas para gerar canais e estruturas com relevos arbitrários, e no capitulo 5.3 são apresentados os dispositivos microfluídicos desenvolvidos para estudos em biofísica celular. Nos capítulos 6 e 7 são discutidos os resultados da tese e as conclusões respectivamente.

# **2 OBJETIVOS**

Este trabalho tem por objetivo principal o desenvolvimento de uma metodologia de fabricação de sistemas LOC, úteis no estudo de processos celulares, a partir da adaptação de tecnologias próprias da microeletrônica.

### **Objetivos específicos**

- Apropriar técnicas de prototipagem de dispositivos microfluídicos em PDMS.
- Desenvolver novos protocolos e métodos de microfabricação.
- Desenvolver novos dispositivos para estudo de processos em biofísica celular.

# **3 REVISÃO DA LITERATURA**

#### 3.1 ESTADO DA ARTE DOS LAB ON CHIP

Os laboratórios em chip surgem como uma aplicação da microfluídica que pode ser definida como a ciência e tecnologia de manipular e controlar quantidades diminutas de fluidos em canais com dimensões de alguns micrometros. Nestas condições de confinamento o comportamento dos fluidos difere da teoria tradicional e alguns efeitos como a tensão superficial, as cargas superficiais e a dissipação de energia cobram uma maior importância.

O número de Reynolds (Re), definido como: Re = L V  $\rho/\mu$ ; onde L é o comprimento mais representativo do dispositivo, V a velocidade média do fluido,  $\rho$  a densidade e  $\mu$  a viscosidade do fluido, é geralmente menor que 100 e em ocasiões menor que 1 nos sistemas microfluídicos, dado o pequeno tamanho destes dispositivos. Como conseqüência do baixo número de Reynolds, os microcanais em geral não apresentam regimes turbulentos e o transporte de massa fica dominado por fenômenos principalmente difusivos, o que dificulta tarefas como a mistura de reagentes, mas que descortina um amplo leque de possibilidades para estudos moleculares e outras aplicações.

Nas décadas dos anos 80s e 90s a microfluídica desenvolveu-se principalmente usando silício como material estrutural e um grande número de trabalhos foram publicados sobre o desenvolvimento de micro sensores de fluxo, microbombas e microválvulas, visando miniaturizar e integrar o maior número possível de componentes dos sistemas microfluídicos.

Em muitos casos as vantagens de utilizar a microfluídica, ao invés de uma técnica convencional, derivam-se do fato de trabalhar com quantidades minúsculas de fluidos

ou das interações especiais que acontecem em canais com dimensões microscópicas, independente do tamanho da instrumentação externa requerida, sendo que somente os elementos que interagem com o fluido precisam ser miniaturizados. Portanto, a miniaturização de todo o sistema, embora desejável, não é uma exigência para todos os sistemas microfluídicos. De fato, a maioria dos chips microfluídicos comerciais são estruturas simples produzidas em vidro, contendo misturadores, geradores de emulsões, reatores químicos ou arranjos de cavidades como os apresentados na Figura 1.



Figura 1. Alguns chips comerciais: empresas *Dolomite* (esq), *NSG* (cent) e *Nanopoint* (dir).

Outros chips comerciais mais complexos que incluem partes móveis como válvulas são fabricados em PDMS, vidro e policarbonato fabricados em massa para aplicações de amplificação de DNA, e cristalização de proteínas, como os apresentados na Figura 2



Figura 2. Digital Array chip (esq) e Topaz (dir) da Fluidigm.

A fabricação de dispositivos micro-fluídicos mostra uma tendência à miniaturização e integração similar à acontecida com a microeletrônica, fala-se inclusive da lei de Moore da micro-fluídica que estipula que a densidade de micro-válvulas dobra a cada 4,5 meses (HONG, 2003). Começam a surgir novos conceitos tais como linguagens de programação de chips micro-fluídicos (THIES, 2008), dispositivos de fluídica digital (LUAN, 2008), com componentes elementares como chaves, diodos, capacitores, multiplexadores, memórias, somadores fluídicos, tornando cada vez mais plausível a tecnologia dos chamados circuitos fluídicos integrados (IFC) (FAIR, 2007).

Em seu trabalho sobre microfluídica programável, William Thies do Instituto Tecnológico de Massachusetts propõe camadas de abstração que permitam aos cientistas programar, em uma linguagem amigável, os mais variados protocolos experimentais sobre a base de plataformas de dispositivos fluídicos re-configuráveis que possam executar tarefas como mistura, aquecimento, resfriamento, eletroforésis, lise celular, armazenamento, amplificação PCR entre outras, com volumes da ordem de picolitros.

Três diferentes aproximações ou tecnologias estão sendo desenvolvidas para possibilitar plataformas versáteis que implementem os elementos primitivos genéricos de hardware requeridos para construir toda uma microfluídica digital programável. A primeira faz uso da válvula pneumática desenvolvida por *Quake* da Universidade de Stanford como elemento base para construir circuitos de chaveamento como multiplexadores, memórias, trincos (*latch*) e misturadores, com os quais podem ser configurados dispositivos mais complexos como formuladores, que fazem misturas programadas de componentes e armazenam os resultados das operações de mistura em cavidades

direcionadas com multiplexadores. Na Figura 3 são apresentadas micrografias tomadas dos citados artigos de Thies e *Quake*, demonstrando diferentes elementos digitais primitivos fabricados com válvulas pneumáticas.



Figura 3 Primitivos: misturador (esq), memória multiplexada (cent), trinco (dir)

Outra abordagem diferente, desenvolvida pelo professor Richard B. Fair da Universidade Duke, para a manipulação programada de volumes diminutos de líquidos aproveita o fenômeno conhecido como *electrowetting* que consiste em manipular o ângulo de contato de uma superfície estruturada com arranjos de eletrodos mediante a aplicação de um potencial que induz cargas superficiais que atraem as moléculas polares da água e conseguem deslocar pequenas gotículas de um lado para outro sobre uma superfície hidrofóbica, chaveando os potenciais dos eletrodos contíguos que a tornam temporalmente hidrofílica (*electrowetted*). Usando esta estratégia tem sido desenvolvidos esquemas de mistura, separação, dosagem, endereçamento e detecção de substâncias aquosas, em volumes da ordem de dezenas de nanolitros. Na Figura 4 são apresentadas micrografias extraídas dos citados artigos de Fair (2007) e Luan (2008), demonstrando seu conceito de microfluídica digital controlada por *electrowetting*.



Figura 4 Dispositivos de microfluídica digital por *electrowetting*: misturador (esq), seqüenciador de DNA (cent) e detector Metal-Semicondutor-Metal em um dispositivo de *electrowetting* (dir)

Outra estratégia para direcionar um conjunto de testes programados com volumes da ordem de picolitros foi desenvolvida pelo professor David Weitz do grupo de matéria condensada branda da Universidade de Harvard. A proposta de Weitz é uma microfluídica baseada em microgotas dispersas em um meio separador imiscível, as quais podem ser manipuladas usando dieletroforese com eletrodos integrados, para comandar o caminho das microgotas, fusionar, separar, ou injetar componentes ao interior de cada gota, isto combinado com as técnicas existentes de PCR, detecção por fluorescência, electroforese capilar entre outras pode configurar verdadeiros laboratórios integrados programáveis. Na Figura 5 são apresentadas micrografias tomadas dos trabalhos de Weitz: Agresti et al. (2010); Abate et al. (2010); Zhao et al. (2011).



Figura 5 Dispositivos para produção e separação de microgotas (esq), injeção de reagentes (cent) e microemulsões compostas de microgotas (dir).

Dispositivos microfluídicos podem ser utilizados para obter uma variedade de medidas, principalmente nas áreas de química e biomédica, como por exemplo: pH, cinética de reações, eletroforese capilar, imunoensaios, citometria de fluxos, injeção de proteínas para análise através de espectrometria de massa, análise de DNA, manipulação de células, e muitas outras aplicações em outras áreas.

Enquanto alguns estudos procuram o desenvolvimento de sistemas avançados de instrumentação para pesquisas da ciência básica, outros grupos apontam suas pesquisas em microfluídica para a criação de dispositivos de diagnósticos clínicos portáteis e integrados para uso doméstico, reduzindo o tempo de análise e o custo por paciente, contribuindo a melhorar a qualidade de vida das pessoas e trabalhando para suprir as carências em matéria de diagnóstico dos países de terceiro mundo. Nesta linha tem surgido algumas propostas como *Lab On Chip* feitos de papel com técnicas de fabricação de baixo custo como impressão a jato de tinta e serigrafia (LIU et al., 2011, Martinez et al., 2008).

Usando materiais como o papel ou o PDMS que são permeáveis à passagem de gases o que permite o intercâmbio de  $O_2$  e  $CO_2$  entre cultivos de células e o meio externo, podem ser fabricados sistemas automatizados de cultura celular, contagem e separação de células (HUANG;LEE, 2007, CHRISTEN;ANDREOU, 2007, CHOI et al., 2009), que com a integração de eletrodos, sensores químicos, controladores de temperatura e válvulas para fornecimento programado de substâncias, podem configurar verdadeiros laboratórios de análise biológico para teste de viabilidade, cito-toxicidade, resposta a estímulos, fertilização in-vitro, entre muitos outros (VALERO et al., 2008; YAMAGUCHIA et al., 2009; WANG et al., 2007).

Trabalhos interessantes em manipulação e análise de células têm sido apresentados utilizando as ferramentas de integração microfluídica em grande escala (uF-LSI)

baseada em PDMS. Wang et al.(2007) do MIT apresentaram um estudo da resposta de diferentes células a cinco toxinas, (digitonina, saponina, CoCl2, NiCl2, acroleina) com um estudo simultâneo realizado em um arranjo de 576 celas independentes de cultivo, como as ilustradas na Figura 6



Figura 6 Arranjo microfluídico de alta densidade para captura e estudo de células, imagens tomadas de Wang et al. (2007).

Usando também a tecnologia de microválvulas pneumáticas de Quake, Balagaddé (2007) desenvolveu um sistema quimiostático de incubação de células com anéis misturadores para manter o caldo de cultura agitado e entradas de nutrientes e limpadores para evitar a formação de biofilmes e manter a densidade de células constante no tempo para experimentos de longa duração. Na Figura 7 é apresentada uma fotografia do chip quimiostato desenvolvido por Balagaddé no seu trabalho de doutorado.

Figura 7 Quimiostato para cultura celular, tomada da Balagaddé (2007).

Existem inclusive aplicações comerciais de sistemas microfluídicos para cultivo de células e avaliação de viabilidade, caso do sistema *CellTRAY* da companhia *Nanopoint* para reprodução assistida que aproveita o fluxo laminar e bombeamento pulsado, para estimular o intercâmbio de nutrientes com os ovócitos, recriando as condições do oviduto, em uma plataforma de cultivo que pode ser colocada no microscópio para monitoramento contínuo.

A separação de células é outro passo importante nas áreas de biotecnologia, biomedicina e engenharia biológica. Este processo geralmente leva vantagem de diferenças fenotípicas ou genotípicas para classificar populações e isolar células individuais. Métodos como a cromatografia por afinidade celular (CAC) tem demonstrado uma adequada separação de células de diferentes tipos usando receptores de membrana específicos (WANG et al., 2008 e MANDRUSOV et al., 1995), também, o uso de dispositivos microfluídicos para separação de células por tamanho, usando propriedades hidrodinâmicas das células (INGLIS et al., 2008) ou com microestruturas de separação ativas tem sido publicado (GERHARDT et al., 2011). Outras técnicas incluem a separação de alta velocidade de células marcadas fluorescentemente em separadores celulares ativados por fluorescência (FACS) (FU et al., 1999).

A citometria de fluxo (FC) e a separação de células ativadas por fluorescência (FACS) estão entre as técnicas mais utilizadas. Na FC e FACS, forças hidrodinâmicas controlam o fluxo de células através de um fluido e passam por um detector. As células são marcadas com um reagente ou diferencialmente expressam moléculas que alteram suas propriedades ópticas (fluorescência ou índice de refração, por exemplo) sendo medidas e detectadas (FC), ou isoladas por meio da comutação do fluido (FACS).

As bactérias apresentam um desafio para a FC e a FACS por causa da incompatibilidade entre as suas dimensões físicas e hidrodinâmicas com o tamanho do núcleo de instrumentos comerciais, que normalmente é uma ordem de magnitude maior do que a maioria das células bacterianas. O pequeno tamanho das bactérias complica a FC e a FACS, já que estas técnicas são projetadas para analisar células que passam pelo detector em uma única fileira. A detecção de grupos de bactérias pode ser erroneamente identificada e isolada como falsos positivos.

Os métodos tradicionais de separação de bactérias tiram proveito do crescimento e da seleção para isolar genótipos. A identificação visual de células que sobrevivem em um ambiente modificado ou colônias expressando moléculas específicas cultivadas em placas de cultura com indicadores colorimétricos pode ser suficiente para separar manualmente genótipos diferenciados. Embora a seleção em placas de cultura não seja particularmente adequada para separar fenótipos móveis, a seleção em placas semi-sólidas permite o isolamento de populações de células móveis que penetram no Agar

diluído infundido com nutrientes e conseguem se movimentar longe do ponto de inoculação.

Recentemente Hulme et al 2008 demonstraram a separação de células individuais móveis de *Escherichia coli* (cepa MG1655) em um sistema consistindo de microcatracas fluídicas, explorando as forças hidrodinâmicas produzidas por células que se deslocam através de seu ambiente. Eles demonstraram que as catracas funcionaram como diodos fluídico para direcionar o movimento de bactérias, o que poderia ser isolado com base em seu comprimento e propriedades hidrodinâmicas.

Embora essa técnica permita aos usuários isolar células móveis com base no comprimento ou em propriedades hidrodinâmicas, elas não permitem a seleção de bactérias a partir de populações de células com base na velocidade. A introdução de sistemas microfluídicos simples que facilitem essa separação seria particularmente útil para estudos microbiológicos e biofísicos.

### 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS UTILIZADOS NA FABRICAÇÃO DOS LOC

Os primeiro material utilizado na fabricação dos LOC foi naturalmente o silício, cuja micro-usinagem já era amplamente dominada o que por sua vez facilita os processos de integração com as tecnologias da microeletrônica. Entre as técnicas de fabricação utilizadas para a fabricação de canais em silício as principais são a corrosão anisotrópica em KOH (hidróxido de potássio) ou TMAH (hidróxido de Tetrametil Amonio) e a corrosão profunda por plasma com íons reativos. Na Figura 8 são apresentados alguns exemplos de micro-canais fabricados em silício.



Figura 8 Micro-canais fabricados em silício, tomada de http://www.imm.cnr.it/en/imm\_en/research/microsystems/fabr\_microsystems.htm

Para aplicações biológicas materiais translúcidos como o vidro oferecem a possibilidade de medição e inspeção óptica dos processos, porém as tecnologias de fabricação são às vezes incompatíveis com a microeletrônica e a integração com os circuitos deve ser híbrida. Canais em vidro são usinados por corrosão com ácido fluorídrico (RODRIGUEZ et al., 2003) ou técnicas de abrasão com partículas (YUN et al., 2008) ou ablação laser (ISSA et al.,2008). Na Figura 9 são apresentados alguns exemplos de micro-canais fabricados em vidro.



Figura 9. Micro-canais fabricados em vidro, tomada de Lin et al. (2003)

Os canais usinados em vidro ou silício são geralmente fechados com outra lâmina soldada termicamente ou através de um processo de solda anódica, que demanda temperaturas menores com a ajuda da aplicação de um campo elétrico forte que induz cargas superficiais para promover a ligação química dos átomos. Outros processos de solda a baixa temperatura tem sido apresentados na literatura a partir de uma ativação química das superfícies por métodos de limpeza exaustiva (LINGXIN et al., 2006) ou tratamentos com plasma (HOWLADER et al., 2006).

Materiais inertes como os cerâmicos, o vidro e o silício apresentam uma maior estabilidade química e podem ser operados em altas temperaturas possibilitando levar a cabo reações químicas exotérmicas ou termo-ativadas como os reformadores de combustíveis para células baseadas em hidrogênio. Por outro lado aplicações biológicas e médicas não ultrapassam os 100 graus Celsius, cenário no qual os polímeros são uma alternativa de baixo custo que possibilitam a produção em massa e a fabricação de dispositivos micro-fluídicos descartáveis, característica desejável quando se trabalha com amostras biológicas.

Os polímeros podem ser moldados ou estruturados a partir de formas microfabricadas em silício, metal, ou diretamente em polímeros foto sensíveis. Na Figura 10 são apresentados alguns exemplos de micro-canais fabricados em polímeros.





Figura 10. Micro-canais fabricados em SU8 e PMMA, tomadas de Huang, 2006 e Tsao, 2009.

Depois do vidro e o silício, que ainda hoje são os materiais mais populares para aplicações em micro-fluídica, aparece na última década o polidimetilsiloxano (PDMS) como o mais utilizado. Seguidamente encontram-se os polímeros termoplásticos como o PMMA à frente e recentemente o copolímero de poli-oleofinas cíclicas (COC/COP) em rápido crescimento. Na Figura 11 é apresentada uma estimativa do número de publicações que referenciam diferentes materiais para aplicações em micro-fluídica.



Figura 11 Estimativa do número anual de publicações referenciando cada material para micro-fluídica, tomada de Tsao et al. (2009)

O PDMS é um polímero de silicone produzido em diferentes pesos moleculares desde líquidos de baixíssima tensão superficial utilizado em lubrificantes e produtos cosméticos, até borrachas elásticas altamente entrelaçadas, biologicamente inertes, utilizadas para recobrir implantes médicos. As propriedades de compatibilidade química e resistência mecânica do PDMS para aplicações biomédicas têm sido estudadas em detalhe por diferentes autores (MATA et al., 2005 e KHANAFER et al., 2009).

Dado seu consumo na área médica o PDMS é produzido com um rigoroso controle de qualidade com relativo baixo preço, fato que somado à sua facilidade de desmoldagem e a possibilidade de soldar quimicamente com outros materiais após oxidação com plasma, torna-o um excelente material para prototipagem de dispositivos micro-fluídicos. O PDMS é também transparente no visível possibilitando a fabricação de guias de onda integradas com os micro-canais (CHANG et al., 2005 e KEEA et al., 2008).

Por outro lado nenhum material é perfeito. O PDMS apresenta uma característica desfavorável para o trabalho com amostras e solventes orgânicos, ao absorver pequenas moléculas hidrofóbicas em seu volume, o que pode interferir fortemente nos resultados de quantificação de substâncias como proteínas, enzimas e medicamentos. Para diminuir a interação do PDMS com compostos orgânicos, tratamentos superficiais por técnicas de sol-gel ou deposição de polímeros hidrofílicos têm sido implementados (ROMAN et al., 2005). Outras modificações e misturas têm sido reportadas na literatura para tornar o PDMS magnético, ou condutor elétrico (NIU et al., 2007).

#### 3.3 PROTOTIPAGEM EM PDMS

A micro-moldagem do PDMS remonta-se à década dos anos 70s com os primeiros trabalhos de nano-estampagem para replicação de estruturas (AUMILLER et al., 1974) e já nos 80s tinha sido utilizado para aplicações celulares em micro-canais (MASUDA et al., 1989), mas a grande popularidade do PDMS surge a partir dos trabalhos de George M. Whitesides e seu grupo de micro-fluídica na Universidade de Harvard (DUFFY et al., 1999, MCDONALD et al., 2000, ANDERSON et al., 2000) quem conheceu o PDMS por Chaudhury um cientista da Dow Corning, companhia que comercializa o produto como Sylgard 184, um bi-componente que misturado na proporção 10:1 de PDMS e agente interligante (Dimetil, Metil-hidrogênio Siloxano) cura a temperatura ambiente sem produzir subprodutos de reação ou liberação de solventes, o que possibilita a moldagem em cavidades fechadas sem importar o grau de confinamento.

Na Figura 12 é ilustrada uma seqüência de fabricação de um dispositivo micro-fluídico com PDMS, a qual consta de (A) construção dos moldes, (B) moldado, (C) solda das múltiplas camadas e (D) colocação de tampas e conectores fluídicos.



Figura 12 Seqüência de fabricação de um dispositivo micro-fluídico com PDMS

Os moldes podem ser fabricados por corrosão de silício, eletrodeposição de metais, ou diretamente por fotolitografia com fotoresistes espessos como o Shipley SJR 5740, AR3220 ou o SU8 da Microchem entre outros. O SU8 é um dos mais utilizados para a fabricação de moldes para PDMS, e dada sua transparência pode ser processado com espessuras que vão desde frações de micrometro até milímetros para produzir perfis retangulares com paredes retas bem definidas.

Para obter perfis arredondados como os utilizados nas válvulas pneumáticas de *Quake* usam-se fotorresistes que possam fluir durante a cura para dar o formato de gota requerido. Técnicas alternativas para a fabricação de moldes têm sido apresentadas usando ferramentas de prototipagem rápida de sólidos como a estéreolitografia ou microdispensadores de líquidos (GHAFAR-ZADEH et al., 2009, MCDONALD et al., 2002).

Diferentes métodos de moldagem têm sido apresentados na literatura para produzir geometrias variadas em PDMS. Camadas estruturadas com espessuras de uns poucos

nanômetros podem ser obtidos por aplicação por *spinning* de PDMS diluído em hexano (THANGAWNG et al.,2007).

Para moldar dispositivos de várias camadas, com vias de acesso entre elas. Jô et al. (2000) utilizaram folhas de acetato como tampa do molde de SU8 para produzir furos passantes no PDMS, demonstrando o empilhamento de camadas finas de PDMS com canais de larguras entre 100 e 250um. Também em 2000 Anderson e Whitesides publicaram uma técnica de moldagem com estruturas nas duas faces do molde para a fabricação e empilhamento de camadas de PDMS com furos passantes, utilizando como contramolde PDMS passivado mediante silanização em vapor de tridecafluoruro-tetrahidrooctil-triclorosilano (ANDERSON et al., 2000). Lucas et al. (2008) publicaram um método de moldagem dupla-face usando uma camada flexível de SU8 como contramolde.

Após a cura o PDMS é hidrofóbico e tem uma baixa energia livre superficial, mas pode ser processado com plasma de oxigênio fazendo com que as terminações metila (Si-CH3) sejam substituídas por grupos hidroxila (Si-OH) que tornam a superfície hidrofílica (BHATTACHARYA et al., 2005), mas esta terminação é instável e os grupos hidroxila migram ao interior do PDMS e reagem com os monômeros não ligados à estrutura do PDMS para diminuir novamente a energia livre superficial o que retorna a superfície a sua condição hidrofóbica em menos de 30 minutos. LEE; PARK, WHITESIDES (2003) estudaram um método para extrair as moléculas pequenas não interligadas à rede de PDMS presas no interior do material mediante o tratamento com solventes fortes, com o qual a superfície ativada com plasma continuou sendo hidrofílica por muito mais tempo.

A incorporação de grupos hidroxila pode ser utilizada também para obter a união covalente do PDMS a outras moléculas com terminações hidroxila a partir da reação de desidratação representada na Figura 13.



Figura 13 Diagrama ilustrando a reação de desidratação.

Esta união é irreversível e pode-se conseguir a partir da ativação com plasma de oxigênio das superfícies, mas também com exposição a ozônio obtido por descargas corona ou lâmpadas UV (KIM et al.,2004) sendo uma característica importante do ponto de vista da engenharia porque permite a vedação de microcanais em PDMS sobre diferentes materiais contendo silício (Si, SiO2, vidro, etc).

Duas camadas de PDMS podem também ser unidas irreversivelmente preparando uma delas com excesso de agente interligante (catalisador) e a outra com falta, misturando em diferentes proporções as duas componentes do PDMS, curando parcialmente cada uma em separado e terminando posteriormente a cura duas unidas (UNGER et al., 2000). EDDINGS et al.(2008) apresentam um estudo comparativo de cinco diferentes técnicas para solda de PDMS/PDMS incluindo a cura parcial das partes, a mistura em diferentes proporções, a utilização de PDMS como adesivo e ativações com plasma de

oxigênio e descargas corona, encontrando os resultados do gráfico de barras apresentado na Figura 14.



Figura 14 Comparação de 5 técnicas de solda PDMS/PDMS, tomada de Eddings et al.(2008)

Eddings concluiu que a solda por mistura com diferentes proporções apresenta menor variabilidade e a maior resistência que as uniões por plasma, mas reconhece que a possibilidade de soldar via plasma o PDMS a outros materiais como o vidro pode ultrapassar os inconvenientes e limitações que a técnica apresenta.

A ativação por plasma de PDMS pode ser também aproveitada para a incorporação de moléculas que modificam as propriedades químicas das superfícies, podendo funcionalizar o PDMS com biomoléculas como DNA, proteínas, enzimas e demais. WONG; HO,(2009) e ZHOU et al. (2010) apresentam revisões completas de técnicas de modificação superficial do PDMS para aplicações em microdispositivos fluídicos. Adicionalmente os canais em PDMS podem ser recobertos pela técnica de Sol-Gel para aumentar a resistência do dispositivo a solventes orgânicos e diminuir a absorção de

moléculas. Na Figura 15 é apresentado um exemplo de um canal em PDMS recoberto por sol-gel, do trabalho de Abate et al (2008).



Figura 15 Microcanal em PDMS antes e depois de recobrir com sol-gel, tomada de Abate et al (2008).
# **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

# 4.1 LISTADO DE EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Equipamentos para processamento

- ✓ Alinhadora EVG420 da Electronic Vision Co (LSI).
- Alinhadora MA6 da SUSS MicroTec do Centro para Microeletrônica Aplicada de Wisconsin (WCAM)
- ✓ Sistema de litografia sem máscara por projeção desenvolvido para este trabalho de doutorado (LSI).
- ✓ Spinner EasySpin desenvolvido pela Universidade Nacional da Colômbia (LSI)
- ✓ Reatores de plasma Indutivo, capacitivo e remoto desenvolvidos no LSI (LSI)
- ✓ Reator de plasma Harrick-plasma PDC-001 (Weibel-Lab)
- ✓ Hot plates IKA C-MAG HS7 (LSI)
- ✓ Microfresa CNC Protomat C100/HF da LPKF (LSI)
- ✓ Prensa hidráulica com controle de temperatura da marca Láctea (LSI)
- ✓ Forno de sinterização Lindberg/blue (LSI)
- ✓ Estufa Memmert da Láctea (LSI)

Equipamentos de caracterização.

- ✓ Microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo, FEI, Nova nanoSEM400
- ✓ Microscópio de força atómica da Nanosurf NaniteAFM (LSI)
- ✓ Medição de ângulo de contato, fabricado no LSI (LSI)
- ✓ Perfilómetros Dektak 3030 e Dektak 6M (LSI)
- ✓ Estereomicroscopio Coleman D XTB 3AT (LSI)
- ✓ Microscópio biológico da Andrade's modelo TNB-41B com câmera refrigerada TCC3.3ICE-N, programa de captura BELView 6.2.2.1 (LSI)
- ✓ Microscópio biológico NIKON LV-UDN (Weibel Lab)
- ✓ Microscópio invertido NIKON Eclipse Ti (Weibel Lab)
- ✓ Maquina fotográfica Nikon Coolpix 4500 (LSI)
- ✓ Maquina fotográfica Canon PowerShot a480 (pessoal)

## 4.2 LISTA DE MATERIAIS UTILIZADOS

Fotorresistes e materiais de sala limpa:

- ✓ AZ1518 com o revelador MIF302 da Microresist
- ✓ S1318, S1827 STR1045 da Shipley
- ✓ AR3220 da Allresist
- ✓ SU8-2000.5, SU8-2005, SU8-2050 com o revelador PGMA da MicroChem.

Químicos para limpeza e corrosão

- ✓ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>OH, HCl, BOE, grau eletrônico da JT Baker
- ✓ Acetona, 2-Propanol, Álcool etílico da Casa Americana
- ✓ Hidróxido de potássio KOH em flocos Casa Americana

Gases:

- ✓ Tetrafluoreto de Carbono (CF₄) da Matheson
- ✓ Oxigênio, Nitrogênio, Hidrogênio da WhiteMartins

Materiais para processos celulares:

- ✓ Bacto Tryptone BD Biosciences
- ✓ Bacto Yeast Extract BD Biosciences
- ✓ Ampicillin Sodium Salt Fisher
- ✓ Cephalexin Sigma
- ✓ Sodium Chloride Fisher
- ✓ EDTA Tetrasodium salt hydrate Alfa Aesar
- ✓ Brij 35 Sigma
- ✓ Tryptone-Soy-Broth Sigma

Substratos:

- ✓ Lâminas de silício 3" tipo P <100> 1-10 Ohm.cm da Silicon Quest Int'l
- ✓ Lâminas de sílica fundida VM Dynasil 4000 da Valley Design
- ✓ Lâminas e lamínulas lisas não lapidadas para microscopia Exacta da Perfecta.
- ✓ Cerâmica verde *Green Tape* 951 AX da Dupont

# 4.3 PROCESSOS DESENVOLVIDOS PARA FABRICAÇÃO DE SISTEMAS LAB ON A CHIP

### 4.3.1 PROCESSOS DE MICROFABRICAÇÃO DE MOLDES

Dentre as possíveis tecnologias para a fabricação de micro-moldes trabalhou-se principalmente com fotolitografia em camadas espessas de SU8, assim, foram desenvolvidos processo para construção de moldes de um e dois níveis sobre substratos de vidro e silício. Outros fotorresistes a base de novolak também foram utilizados para canais que precisassem apresentar perfis curvos não retangulares. Foi desenvolvido paralelamente um procedimento para prototipagem rápida de moldes por usinagem com máquina CNC e implementada uma técnica para produzir moldes com dimensões submicrométricas por litografia com máscaras de fase. A seguir são descritos cada um destes processos:

#### Moldes simples em fotorresiste

Para a maioria das aplicações em micro-fluídica basta um molde simples fabricado por litografia com uma única máscara no qual linhas no fotorresiste definirão os canais no PDMS. Neste trabalho foram utilizadas diferentes espessuras e tipos de resistes dependendo das dimensões desejadas. Para os canais menores foram utilizados os fotorresistes: S1318, S1347, AZ1518, e para os mais espessos o AR322, SU8 2005, SU8 2010 e SU8 2050 como será apresentado ao longo da tese.

Os moldes em fotorresiste foram gravados e revelados seguindo as receitas dos fabricantes resumidas no Anexo 2 e posteriormente foram curados a 130°C para

aumentar sua resistência mecânica ou a 200°C para refluir o resiste e obter arestas suaves para válvulas pneumáticas.

#### Moldes multicamadas

Para permitir a conexão entre níveis é preciso conseguir que as camadas de PDMS que conformam o dispositivo tenham furos passantes a modo de vias de interconexão, o que é feito comumente puncionando com agulhas, porém este processo manual dificulta a fabricação em massa dos dispositivos e limita os tamanhos de furo possíveis. Para resolver esta dificuldade foi proposta a moldagem do PDMS em moldes de duas camadas, uma camada fina para definir os canais, e uma camada espessa para definir postes de interconexão entre níveis, que ao serem enfrentados contra uma superfície plana definam um molde fechado como se indica no diagrama da Figura 16.



Figura 16. Esquema de moldes abertos e fechados

As duas partes do molde fechado poderiam apresentar estruturas, para conseguir em uma só etapa a definição de canais, furos, membranas e interconexões complexas em cada camada de PDMS.

Para a fabricação destas estruturas escolheu-se a espessura de 50µm para o primeiro nível e uma altura de 300µm na segunda camada que define as vias de interconexão entre níveis. Dada a transparência do SU8 e a dificuldade de realizar o alinhamento

através da segunda camada idealizou-se uma seqüência de fabricação que permite que o alinhamento seja feito durante a litografia da camada de 50µm, seqüência ilustrada na Figura 17.



Figura 17. Seqüência de fabricação dos moldes

Esta seqüência obedece ao protocolo descrito a seguir:

- Limpeza da lâmina de vidro em solução piranha 1:4 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 10 min.
- Evaporação de uma camada de alumínio
- Litografia e corrosão do alumínio para transferir a Máscara II
- Aplicação e cura de uma camada de 5µm de SU8 (SU8-2005 30s a 3000RPM)
- Aplicação da camada de 50µm de SU8-2050 3000RPM
- Evaporação do solvente a 95°C por 15min
- Litografia da camada de 50µm com a Máscara I (600mJ/cm2)
- Aplicação da camada de 300µm SU8-2050 500RPM
- Evaporação do solvente a 95°C por 4 horas em vácuo
- Exposição da lâmina pelas costas (3600mJ/cm2)
- Cura a 65°C 2 minutos e 150°C por 15 minutos com esfriamento lento.
- Revelação em PMGA por 2h.

A transferência da Máscara II para a camada de alumínio, além de permitir o alinhamento das estruturas, confere aos postes um perfil vertical com ângulo de saída que facilita o processo de desmoldagem, como resultado da exposição da lâmina invertida e a atenuação no resiste. A camada de 5µm foi aplicada para evitar o desprendimento do alumínio com as forças que aparecem no momento de destacar o PDMS do molde, e serve também para dar continuidade à superfície do molde o que facilita a aplicação de desmoldantes.

#### Moldes por usinagem CNC

Para estruturas de dimensões que não precisam de resolução microlitográfica desenvolvemos um processo de obtenção de moldes para PDMS por usinagem mecânica em máquina CNC.

A prototipagem rápida empregando máquinas CNC oferece características interessantes como facilidade de usinar diferentes níveis com profundidades maiores às alcançáveis por litografia com SU8, porém a fabricação de moldes similares aos ilustrados na Figura 16, a partir da usinagem de uma chapa de material gera dificuldades, já que se o acabamento superficial no fundo do molde não é suficientemente bom o PDMS copiará as marcas deixadas pela ferramenta atuando como micro-canais que geram vazamentos entre os canais projetados.

A solução proposta para aproveitar as ferramentas de prototipagem rápida com CNC na fabricação de micro-canais em PDMS, foi usinar um pré-molde em acrílico, com ranhuras e furos no lugar das linhas e postes, e usá-lo para criar moldes flexíveis em PDMS, cujas superfícies são modificadas para possibilitar que o PDMS vertido no molde possa ser destacado posteriormente e não forme uma peça única com o molde.

Diferentes tratamentos superficiais foram testados como desmoldantes: a metalização com alumínio por evaporação térmica e com ouro por sputtering, a silanização com vapor de HMDS imediatamente após ter ativado as superfícies com plasma de oxigênio

e finalmente o processamento com plasmas fluorados. Os resultados de estes processos serão apresentados e discutidos no capitulo 5.1.4.

#### Moldes flexíveis

Outra aplicação importante do protocolo de moldagem PDMS/PDMS desenvolvido é a realização de cópias flexíveis em PDMS dos moldes fabricados no fotoresiste SU8, com o intuito de aumentar a durabilidade dos originais, de aumentar o número de moldes disponíveis para processamento em paralelo ou de obter moldes flexíveis para trabalho com estruturas nas duas faces.

#### Moldes com seção transversal arbitrária

Foi desenvolvido um sistema de litografia em escala de cinza que será apresentado no capitulo 5.2, com o qual foi possível fabricar moldes em resiste com seção transversal arbitrária, controlando ponto a ponto a dose fornecida ao fotorresiste. Para definir um canal com perfil arbitrário é criada uma imagem de 8 bits (valores de cinza de 0 a 255) onde 0 representa regiões que não serão expostas e 255 corresponde os pontos completamente revelados. Dita imagem é convertida em uma matriz de tempos de exposição calculados a partir da curva de contraste do fotorresiste como será apresentado no capitulo 5.2.3. Na Figura 18 é apresentado um exemplo da imagem utilizada para produzir um canal com perfil triangular inclinado e sua respectiva representação tridimensional esperada no fotorresiste.



Figura 18. Imagem em escala de cinza para um canal de seção triangular (esq) e perfil 3D (dir).

#### Moldes para nanocanais

Para produzir canais com dimensões sub-micrométricas foi implementado um método litográfico baseado em mascarás de fase fabricadas em PDMS a partir de litografia convencional e soft-lithography, apresentado em 1997 por J.A. Rogers.

O método consiste em fabricar estruturas micrométricas em fotorresiste que posteriormente são usadas para moldar uma camada de PDMS que servirá como máscara de fase para expor outra camada de fotorresiste. A máscara de fase gerará franjas de interferência na proximidade da borda das estruturas, e as regiões escuras das franjas não serão sensibilizadas. O resultado do processo é uma fina linha nanométrica que rodeia cada micro estrutura (ver Figura 19).



Figura 19. Seqüência para fabricação de nanomoldes: a) litografia de microestruturas, b) moldagem da máscara de fase, c) exposição com máscara de fase, d) nanoestruturas.

## 4.3.2 TÉCNICAS DE MOLDAGEM

A moldagem do PDMS é, em geral, um processo simples; o PDMS preparado a partir de dois componentes *Sylgard* 184 A e 184 B da *DowCorning* misturadas em proporção 1:10 pode ser vertido em qualquer tipo de molde e curado em temperaturas entre 20 e 200°C copiando fielmente relevos com resolução nanométrica.

Para os diferentes moldes fabricados foram desenvolvidos protocolos de moldagem, apresentados a seguir, os quais foram classificados em: moldagem aberta, quando uma das superfícies é aberta à atmosfera e moldagem fechada, quando é usado um contramolde para confinar completamente o PDMS.

### Moldagem aberta

Foram recobertos moldes de um e dois níveis com camadas de PDMS preparado a partir do bi-componente *Sylgard 184* da *DowCorning*, misturado na proporção 1:10 recomendada pelo fabricante e de-gaseficado em vácuo por 30 minutos para extrair o ar incorporado durante a mistura. As camadas foram aplicadas tanto em repouso como por rotação em *spinner* a baixa velocidade dependendo das espessuras desejadas. Após verter o PDMS os moldes foram colocados em vácuo por 5 minutos para eliminar as bolhas de ar que podem se formar nas cavidades das estruturas.

#### Moldagem fechada

Foi desenvolvida a técnica de moldagem em molde fechado utilizando como contramolde uma lâmina de PDMS para os moldes de SU8 e contramoldes de vidro

para os moldes de PDMS. Ao pressionar o contramolde contra o molde até espremer fora o PDMS em excesso é possível obter camadas com furos passantes para interconexão entre camadas. Na Figura 20 são apresentados diagramas ilustrativos das configurações utilizadas para moldar o PDMS entre duas superfícies.



Figura 20. Esquemas dos arranjos para moldagem fechada.

#### 4.3.3 SOLDAGEM DE PDMS

Após a moldagem dos canais, a etapa seguinte estudada para completar as estruturas microfluídicas foi a solda de uma camada para fechar os canais. Para algumas aplicações que utilizam técnicas de bombeamento sem pressões positivas como, por exemplo, bombeamento a vácuo (*vacuum loading*) ou bombeamento passivo aproveitando forças como a tensão superficial ou a capilaridade, os dispositivos podem ser selados por união reversível do PDMS a superfícies de vidro ou PDMS; mas para aplicações contendo elementos ativos como válvulas ou que precisem de pressões maiores nos fluidos, é importante obter uma solda resistente entre as superfícies.

A seguir são apresentados dois métodos apropriados ao longo desta tese para obter soldas irreversíveis. Foi atingida a solda química de PDMS sobre diferentes materiais por ativação com plasma de oxigênio, empregando diferentes tipos de reatores e condições de processo. Foram desenvolvidos também protocolos para solda por difusão de catalisador entre duas peças parcialmente curadas de PDMS preparadas com proporções complementares de polímero base e catalisador (ou agente interligante).

#### Solda química ativada por plasma

Como foi apresentada na revisão do estado da arte, a solda ativada por plasma é um processo amplamente conhecido e documentado na literatura, porém que apresenta detalhes técnicos a serem ajustados para as condições particulares de cada reator.

Os primeiros testes de solda química ativada por plasma foram realizados em um reator RF (13.56MHz) com acoplamento capacitivo desenvolvido para aplicações de RIE (*Reactive Ion Etching*) no LSI, para diferentes pressões, potências e tempos de oxidação.

Para diminuir o bombardeamento, pressões altas e potências e tempos de processo baixos são desejados, porém o reator RIE não foi projetado para tais condições, sendo que a fonte RF não consegue realimentar e corrigir a potência refletida para valores abaixo de 50 W precisando de um estímulo inicial que dobra ou triplica a potência requerida para ativar a superfície.

Foi estudada posteriormente uma configuração de reator de plasma remoto, no qual as colisões provocadas pelos campos elétricos para ionizar o gás ocorrem longe do substrato, não se tendo íons acelerados que atinjam a superfície do substrato e assim ocorram apenas reações químicas com as espécies produzidas no plasma, as quais são arrastadas pela bomba de vácuo até a região do substrato. Na Figura 21 é apresentada

uma fotografia do reator RF capacitivo e do reator de plasma remoto utilizado, o qual se compõe de um tubo de vidro com entrada de gás por um dos seus extremos e o outro extremo conectado à câmara de processamento das amostras. Uma alta tensão DC é aplicada entre os extremos do tubo, gerando e confinando a descarga luminosa.



Figura 21 Fotografia dos reatores de plasma RF (esq) e remoto (dir).

Utilizando esta configuração de plasma remoto, foram exploradas diferentes condições de processamento para colar irreversivelmente o PDMS a diferentes materiais. A exploração foi realizada avaliando em escala de 1 a 10 a quantidade de área em contato que ficou irreversivelmente aderida, para 30 combinações de parâmetros empregando pressões entre 100 e 300 mTorr, correspondentes a vazões de oxigênio de 100 a 500 sccm, para potências entre 10 e 30 W e tempos de 30 a 300 segundos.

A maioria das soldas foi efetuada no reator de plasma remoto, porém foram estudados outros dois reatores de plasma de RF com acoplamento indutivo: um reator de bobina plana desenvolvido no LSI com sistema de vácuo de alta vazão, controladores de pressão e fluxo de massa, e um reator de limpeza a plasma da *Harrick-Plasma* modelo PDC-001 que consiste em um tubo de quartzo de 6" de diâmetro, conectado a uma

pequena bomba mecânica, rodeado por uma bobina que induz o plasma no interior do tubo. Na Figura 22 são apresentadas fotografias destes equipamentos.



Figura 22. Reatores de plasma indutivo: desenvolvido no LSI (esq) e Harrick (dir).

## Solda por difusão de catalisador

Ao colocar em contato uma camada de PDMS com excesso de agente interligante (catalisador) e uma camada de PDMS com agente interligante em falta, ambas parcialmente curadas, a interface desaparece quando as moléculas interligantes livres são difundidas de uma camada à outra e a cura é completada a uma temperatura maior. Este método produz uniões PDMS-PDMS com resistência mecânica comparável ou até superior às obtidas por ativação com plasmas de oxigênio segundo o trabalho de Eddings, 2008; porém, por diversos fatores, este é um processo difícil de implementar.

Quando o nível de cura das camadas é insuficiente o material é ainda visco-elástico e pode se deformar preenchendo os relevos moldados nas camadas e inutilizando os microcanais, e pode ser quase impossível de destacar dos moldes; mas se a cura está muito avançada não se obtém o efeito desejado de soldar as duas superfícies, por quanto o tempo e a temperatura de pré-cura são parâmetros críticos para o sucesso da técnica.

Foram preparadas misturas de PDMS em proporções 1:20 e 1:5 de catalisador para polímero base, no lugar da proporção 1:10 recomendada pelo fabricante. A mistura 1:20 foi aplicada por *spinning* para obter uma camada fina enquanto que a mistura 1:5 foi moldada com uma espessura de 5 mm para facilitar sua manipulação. Ambas as partes foram curadas em chapa quente a 90°C com tempos ajustados de acordo à espessura, a seguir a camada espessa foi destacada do molde e colocada em contato com a camada fina e aquecida paulatinamente até 120°C para completar a cura durante 30 minutos.

Devido ao atrito entre camadas parcialmente curadas ser alto, não é fácil conseguir o alinhamento entre as camadas para o qual aplicou-se álcool etílico como lubrificante entre as interfaces.

## 4.3.4 MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DO PDMS

O PDMS é um polímero de natureza hidrofóbica que quando tratado com plasma tornase temporariamente hidrofílico, mas recupera sua característica hidrofóbica em questão de minutos. Neste trabalho de doutorado foi estudado um processo de hidrofilização do PDMS mediante a incorporação do polímero hidrofílico PVP (Poli Vinil Pirrolidona) na superfície ativada do PDMS.

Foram estudados também dois tratamentos baseados em plasma para conferir ao PDMS uma característica antiaderente que permita a moldagem PDMS/PDMS, para conseguir a confecção de cópias flexíveis em PDMS de moldes fabricados em SU8 ou outros materiais. Para esta finalidade é desejável que o tratamento cumpra três características principais: a força requerida para destacar o PDMS do molde tratado deve ser baixa, a rugosidade superficial do molde não deve ser aumentada e o efeito antiaderente deve ser estável e permanente.

Para todos os testes de modificação superficial foram preparadas amostras de PDMS misturando o bi componente *Sylgard* 184 da *Dow Corning* na proporção 1:10 colocando a mistura para de-gaseificar em vácuo por 30 minutos e curar sobre lâminas de silício a 100°C usando uma chapa quente durante 15 minutos. Também foram preparadas amostras com textura rugosa curando o PDMS sobre as costas de uma lâmina de silício para aumentar a área de contato para testes de adesão. Todas as amostras foram preparadas com espessura de 2 mm, cortadas em quadrados de 2x2 cm e soldadas sobre lamínulas de vidro para facilitar a manipulação. As amostras foram enxaguadas com água destilada, submetidas a ultra-som em álcool isopropílico para remover particulado e enxaguadas novamente em água para eliminar restos de álcool. Na Figura 23 é apresentada uma fotografia das amostras preparadas para os processos de modificação superficial.



Figura 23. Fotografia das amostras utilizadas para estudar os diferentes processos de modificação superficial do PDMS.

A seguir são apresentados os procedimentos para os diferentes tratamentos estudados.

#### **Recobrimentos hidrofílicos com PVP**

A ativação superficial com plasmas de oxigênio torna a superfície do PDMS temporalmente hidrofílica mediante a criação de ligações pendentes e grupos hidroxilas na superfície do polímero, mas o efeito desaparece completamente após algumas horas, porém a ativação química produzida pelo plasma pode ser aproveitada para funcionalizar a superfície do PDMS com diversas moléculas.

A fim de conseguir uma modificação superficial que torne o PDMS hidrofílico por mais tempo depositamos soluções aquosas de PVP sobre superfícies ativadas com plasmas de oxigênio; a ativação é idêntica à utilizada para soldar o PDMS (ver capitulo 4.3.3). A solução de PVP foi preparada com 10% w/v de PVP em água e aplicada imediatamente depois da ativação superficial, seguidamente as amostras são aquecidas a 100°C para evaporar o solvente e promover a substituição das terminações reativas por cadeias de PVP.

Finalmente as amostras são lavadas com água abundante para dissolver as cadeias de PVP que não ficaram fortemente aderidas ao PDMS, e analisadas para avaliar o resultado da modificação e sua durabilidade. Foram feitas medidas de ângulo de contato das superfícies modificadas com PVP imediatamente após o tratamento e depois de 24 horas de exposição ao ambiente.

#### Tratamento com plasmas de CF<sub>4</sub>+H<sub>2</sub>

Este tratamento consiste na polimerização de compostos fluorados na superfície do PDMS empregando plasmas de misturas de  $CF_4+H_2$ . Diferentes proporções de mistura foram estudadas para tempos de processo de 1 a 15 minutos. Os tratamentos foram realizados em um reator de placas paralelas com uma fonte RF (13.56MHz) utilizando uma vazão total de 30 sccm a uma pressão de 300 mTorr com potência de 30W.

As superfícies tratadas foram analisadas com a técnica de ângulo de contato. As interações das superfícies tratadas com o PDMS foram também estudadas com espectroscopia de força atômica (AFS) usando uma ponta de AFM (*NanoWorld CNTR-10*) recoberta com PDMS. A topografia das superfícies processadas foi analisada por microscopia de força atômica.

#### Silanização com HMDS

O *Hexa-Metil-Di-Silazano* é usado como promotor de aderência para fotorresistes sobre silício; é uma molécula que possui um ponto com afinidade ao silício e seis terminações CH<sub>3</sub> afins ao polímero. Foi estudado o efeito de incorporar esta molécula na superfície do PDMS para evitar a aderência com o PDMS e conseguir o efeito desmoldante.

O método consiste na ativação com plasma de oxigênio da superfície de PDMS para promover a incorporação do HDMS. As amostras de PDMS foram oxidadas em atmosfera de plasma usando o mesmo procedimento de ativação para solda descrito no capitulo 4.3.3 e seguidamente foram colocadas sobre uma chapa quente a 100°C com duas gotas de HMDS e cobertas imediatamente com uma placa de Petri para confinar o vapor de HMDS e condensá-lo na superfície ativada.

Após o tratamento as amostras foram enxaguadas em álcool isopropílico e água para eliminar moléculas não ligadas à superfície e posteriormente analisadas mediante microscopia e espectroscopia de força atômica, medidas de ângulo de contato e testes qualitativos de adesão ao PDMS curado sobre a superfície.

#### 4.3.5 INTEGRAÇÃO COM OUTRAS TECNOLOGIAS

A miniaturização de processos complexos em *Lab-on-Chip* é possível graças à integração de várias tecnologias que permitam realizar diversas tarefas em um único dispositivo; principalmente a microfluídica para manipular amostras, e sistemas óticos ou eletrônicos de detecção e controle para comandar, processar ou analisar diferentes variáveis. A seguir são apresentados alguns desenvolvimentos concebidos neste trabalho de doutorado para juntar as tecnologias de fabricação de microdispositivos fluídicos em PDMS apresentados até o momento com as tecnologias de chips em silício, fibras óticas, eletrodos metálicos e com a tecnologia de LTCC (*Low Temperature Co-fired Ceramics*).

#### Integração com tecnologias de silício

O PDMS ativado com plasma de oxigênio pode ser soldado sobre silício, vidro ou PDMS como foi mostrado no capítulo 4.1.3; isto permite a selagem hermética de dispositivos fluídicos em PDMS sobre chips de silício que podem conter diversos elementos como sensores de pressão, sensores químicos, eletrodos, diodos para medição de temperatura, fotodiodos entre outros. Neste trabalho foi verificada a opção de integrar sensores de pressão a dispositivos fluídicos em PDMS.

#### Integração com fibras óticas

Graças ao fato de o PDMS ser transparente, é possível integrar fibras óticas aos dispositivos microfluídicos fabricados neste material onde os canais são de tamanhos comparáveis ao diâmetro das fibras, basta a criação de canais adicionais para inserir as fibras. Os canais para inserir as fibras foram definidos ligeiramente menores que o diâmetro da fibra para criar um atrito que ajude na fixação da fibra. Usando este método é possível dispor as fibras óticas em diversas configurações para medidas de espectroscopia, absorbância, fluorescência ou espalhamento da luz.

Quando as dimensões dos canais são menores que o diâmetro das fibras a estratégia antes citada apresenta problemas; uma opção possível é afinar o diâmetro da fibra com ácido fluorídrico, mas isto debilita a fibra e compromete o guiamento da luz, a alternativa proposta neste trabalho para acoplar a luz proveniente de uma fibra ótica com um microcanal de qualquer dimensão é a utilização de sulcos em V usinados em silício por corrosão anisotrópica, para fixar o centro da fibra a uma determinada altura **H** sobre a superfície do silício. Na Figura 24 é ilustrada a configuração proposta para acoplar e alinhar as fibras óticas a qualquer canal ou guia de onda fabricada no PDMS com altura **D**, bastando apenas calcular as dimensões do sulco (*V-groove*) no silício que fazem  $\mathbf{H} = \mathbf{D}/2$ .

Foram adicionados também sulcos de alinhamento para guiar o chip de PDMS contendo os microcanais ou guias de onda que será soldado sobre o silício para fechar os canais e completar o dispositivo.



Figura 24. Secção transversal da configuração proposta (esq) e esquema 3D (dir).

Os sulcos no silício são usinados mediante corrosão anisotrópica com KOH usando como máscara uma camada de óxido de silício. Os relevos em PDMS complementares aos sulcos são obtidos ao moldar o PDMS sobre uma lâmina de silício com sulcos e com as estruturas em fotorresiste que definirão os canais ou guias de onda do dispositivo.

Para fabricar dispositivos de prova de conceito que avaliassem a utilidade da técnica proposta foram projetadas diversas configurações de canais, guias de onda e portos de entrada para fibras óticas como mostrado na Figura 25. Dentre os quais se encontram geradores de microemulsões, células de fluxo para fluorescência ou absorbância e dispositivos opto-fluídicos.



Figura 25. Desenho dos dispositivos projetados (esq) e detalhe de um dispositivo mostrando seus elementos (dir)

Foram utilizados fotolitos como máscaras tanto para as ranhuras no silício como para definir os canais e guias de onda. Foram processadas duas lâminas de silício de 3", grau teste, tipo P, 10 ohm.cm com uma micra de óxido crescido por via úmida, uma das lâminas para a base dos chips, contendo ranhuras de alinhamento com 75µm de profundidade e ranhuras para as fibras, e a outra para a fabricação do molde apenas com as ranhuras de alinhamento com profundidade de 45 µm sobre a qual foi depositada uma camada de 50 µm de SU8-2000 para definir por litografia o molde para os canais e guias de onda.

O método desenvolvido é compatível com as técnicas de pós-processamento de silício, podendo ser integrados circuitos eletrônicos, sensores e demais elementos da microeletrônica com fibras óticas e dispositivos fluídicos em PDMS em um único chip. Na Figura 26 é apresentado um conjunto de equipamentos óticos acoplados a fibras óticas que foram adquiridos com o financiamento do projeto associado a este trabalho de doutorado e que estarão disponíveis para futuros trabalhos derivados desta tese.



Figura 26. Fotografia de dispositivos a fibra ótica no laboratório.

#### Integração com eletrodos metálicos

Foi implementada a técnica de integração de eletrodos metálicos depositados sobre vidro ou silício com microcanais fabricados em PDMS. Dado que o PDMS não solda sobre o metal, o principal fator avaliado foi a formação de vazamentos através da interface PDMS metal, os quais para pressões elevadas e dependendo da largura das linhas metálicas, poderiam inutilizar os dispositivos.

Foram depositados filmes finos de titânio e cromo pela técnica de sputtering sobre substratos de vidro, com os quais foram definidas diferentes geometrias de eletrodos de exemplo por litografia ótica usando fotolitos e corrosão úmida. Outras técnicas como lift-off ou eletrodeposição podem ser utilizados para obter eletrodos em diferentes metais.

Sobre os eletrodos foram soldados microcanais em PDMS por ativação com plasma de oxigênio, pressurizados com água e corante para detectar vazamentos.

#### Integração com cerâmica LTCC.

A cerâmica LTCC (*Low Temperature Cofired Ceramics*) é principalmente utilizada na integração híbrida de componentes eletrônicos, tais como resistores, indutores, capacitores, circuitos integrados, em aplicações de RF e comunicações sem fio. A tecnologia LTCC é também uma ferramenta para a prototipagem de dispositivos contendo canais e estruturas microfluídicas em conjunto com eletrodos e diversos tipos de sensores e atuadores.

A cerâmica LTCC como material para a fabricação de protótipos para microfluídica apresenta vantagens como resistência química à maioria de solventes, ácidos e bases, resistência a altas temperaturas e pressões de trabalho, porém para aplicações requerendo áreas translúcidas para visualização ou partes flexíveis como válvulas ou membranas o PDMS é mais adequado.

Neste trabalho se propõe a integração dos processos desenvolvidos para a fabricação de dispositivos em PDMS com as técnicas de prototipagem e integração híbrida com eletrônica em LTCC, mediante a solda irreversível do PDMS sobre camadas vítreas aplicadas ao LTCC.

Foi desenvolvido um protocolo de integração no qual uma camada de pasta vítrea encapsulante é aplicada sobre a cerâmica LTCC e co-sinterizada para produzir uma superfície sobre a qual é soldado irreversivelmente um dispositivo em PDMS via ativação com plasma de oxigênio, sendo empregado exatamente o processo de solda utilizado com outros materiais (ver Capitulo 4.3.3).

Para esta integração é importante levar em consideração o acabamento superficial da camada vítrea aplicada, a fim de diminuir a rugosidade da topografia para facilitar a solda. Foi encontrado que dita rugosidade é influenciada pela espessura da camada vítrea e a temperatura de sinterização. Camadas mais grossas (com duas ou mais passadas no estêncil) sinterizadas a 850° (co-sinterizadas) apresentam um acabamento melhor que as camadas simples pós sinterizadas a 550°. Foi avaliada a utilização de 4 referências de pastas vítreas diferentes: QS580, QQ550, 9137 e 3500N.

A integração de PDMS com LTCC é recomendável para aplicações que explorem as características vantajosas de cada um dos materiais, resumidas na Tabela 1.

PDMS	LTCC
Translúcido	Resistente
Flexível	Rígido
Alta resolução	Prototipagem rápida direta
Replicável	Integrável com eletrônica

Tabela 1. Resumo de características vantajosas do PDMS e do LTCC

Foram exploradas duas aplicações desta integração:

- ✓ Solda de janelas de vidro à cerâmica para visualização dos canais em LTCC.
- ✓ Integração híbrida de chips em PDMS.

## Solda de janelas de visualização:

Para esta aplicação o PDMS tem apenas uma função de intercamada de união entre o LTCC e o vidro, podendo ser tão fino quanto se queira ou ainda ser removido nas áreas abertas da cerâmica que não estarão coladas ao LTCC para minimizar os efeitos não desejados do PDMS no dispositivo, tais como a permeabilidade a gases, a absorção de solventes orgânicos e a perda de resistência mecânica com a temperatura.

Para testar esta aplicação foi projetado um misturador de 2 níveis em LTCC apresentado na Figura 27, no qual uma das tampas foi substituída por uma lamínula de vidro soldada mediante uma fina camada de PDMS (200 µm).



Figura 27 Layout do misturador (esq), composição de camadas (dir).

A sequência de fabricação foi a seguinte:

- Laminação de três folhas de LTCC a 80° por 5 minutos (5 toneladas de pressão).
- Usinagem do laminado para fabricar os dois níveis em LTCC
- Laminação dos dois níveis de LTCC a 80° por 5 minutos (3 toneladas de pressão)
- Serigrafia de camada soldável para colocação de conectores fluídicos
- Serigrafia de camada vítrea para soldar o PDMS (em duas passadas)
- Sinterização do dispositivo seguindo a receita do fabricante.
- Colocação por rotação de uma camada fina de PDMS sobre um suporte flexível.
- Cura do PDMS a 120° em estufa por 15 minutos.
- Ativação e solda do dispositivo em LTCC sobre o PDMS.
- Retirada do suporte flexível
- Ativação e solda de uma lamínula de vidro sobre a outra face do PDMS.
- Solda com estanho dos tubos para entrada e saída de líquido.

## Integração híbrida de chips em PDMS.

O encapsulamento de chips eletrônicos tem evoluído bastante, para acompanhar a miniaturização e aumento na complexidade dos circuitos integrados modernos, por outro lado no caso dos *Lab-On-Chip* as conexões fluídicas com o meio exterior são ainda um problema a ser estudado, que dificulta a miniaturização dos dispositivos.

Na Figura 28 é apresentada a foto de um molde fabricado em silício por litografia para produzir chips microfluídicos de 6x6 mm<sup>2</sup> tendo de 3 a 6 portos de entrada e saída de líquido. Com estas dimensões as técnicas de furação para conexão de tubos ou conectores se tornam pouco práticas, sendo que o tamanho do chip é comparável ao tamanho de um único conector (Ver Figura 28, direita). A alternativa mais adotada é aumentar o tamanho do chip o que reduz o numero de chips cabíveis em cada lâmina e aumenta o custo por chip.



Figura 28. Molde para chips (esq), chips em PDMS ao lado de mini conectores (dir)

Para resolver este problema foi proposta neste trabalho, a integração híbrida de chips fluídicos de PDMS usando como substrato integrador um dispositivo em LTCC. Esta estratégia permite configurar diversos circuitos complexos que integrem dispositivos fluídicos genéricos discretos, tais como válvulas, misturadores, filtros, separadores, geradores de microemulsões, entre outros, que podem ser miniaturizados para reduzir o custo de produção.

# **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.**

# 5.1 PROCESSOS DE MICROFABRICAÇÃO

# 5.1.1 FABRICAÇÃO DE MOLDES

Foram obtidos moldes em fotoresistes com diferentes espessuras. Na Figura 29 são apresentadas micrografias de um molde fabricado por litografia sobre o resiste S1347 para as aplicações de estudos celulares descritas no capitulo 5.3.



Figura 29. Fotografia de um molde em AZ1318

Também foram fabricados moldes de vários níveis de fotorresiste para gerar furos de interconexão entre camadas. Na Figura 30 são apresentadas as micrografias óticas e eletrônicas dos moldes obtidos em fotorresiste SU8, conforme o protocolo descrito no capítulo 3.3.1.



Figura 30. Micrografia ópticas (esq) e eletrônicas (cent e dir) das estruturas de dois níveis fabricadas.

Obtiveram-se estruturas com boa definição e correto alinhamento entre as duas etapas litográficas, sendo a resolução das estruturas apenas limitada pelas dimensões mínimas do fotolito empregado como máscara. O empilhamento de camadas de PDMS moldadas a partir destas estruturas pode dar origem a um sem número de dispositivos complexos sem modificar o processo de fabricação, o qual se padronizado pode constituir uma tecnologia multiusuário para prototipagem de chips micro-fluídicos multicamada. No capitulo 5.1.2 serão apresentados os resultados da utilização deste tipo de molde para obter vias de interconexão entre camadas.

Foram obtidos moldes flexíveis de PDMS a partir de usinagem CNC de pré-moldes em acrílico. Na Figura 31 são apresentadas fotografias de um pré-molde usinado em acrílico, do molde em PDMS e da peça final com micro canais. As dimensões mínimas alcançáveis dependem da ferramenta utilizada, canais de 0.2 mm foram obtidos.



Figura 31. Pré-molde usinado em acrílico (esq), molde em PDMS (centro), peça final em PDMS (dir)

Utilizando ferramentas de ponta cônica ou esférica podem ser obtidos canais com perfis suaves úteis na fabricação de válvulas pneumáticas em PDMS.

Entre as alternativas estudadas para passivar as superfícies dos moldes de PDMS, obtidos a partir de pré-moldes usinados em acrílico, as metalizações com ouro e

alumínio facilitaram efetivamente a desmoldagem do PDMS, mas os filmes metálicos acabaram-se fragmentando com o uso e deixando resíduos nas peças; já os processos de silanização e tratamento com plasma de  $CF_4/H_2$  permitiram ao PDMS ser moldado sobre formas do mesmo material sem deixar resíduos que possam atrapalhar as etapas de solda, dos quais foi decidido trabalhar com o tratamento de silanização por simplicidade.

Para certas aplicações como a separação eletroforética de moléculas orgânicas o desempenho do PMMA é superior ao PDMS, mas por outro lado características como a flexibilidade e a possibilidade de trabalhar com mais altas temperaturas e soldar irreversivelmente ao vidro fazem o PDMS mais adequado para prova de conceitos em micro-fluídica. A metodologia desenvolvida permite adaptar as tecnologias de prototipagem rápida em PMMA para a prototipagem rápida em PDMS.

A partir desta técnica de moldagem PDMS/ PDMS foi obtida a inversão e réplica positiva de moldes de fotorresistes, se obtendo moldes flexíveis e translúcidos de PDMS. Na Figura 32 são apresentadas micrografias eletrônicas do negativo e da cópia positiva feita do molde da Figura 30.



Figura 32. Negativo em PDMS do molde (esq) e cópia positiva em PDMS (dir).

O molde em PDMS apresentou vantagens sobre o molde feito em SU8 devido a ser completamente translúcido o que facilitou os processos de alinhamento e inspeção do processo de moldagem, além do mais o PDMS não sofre do deterioro ocasionado pelos ciclos térmicos de cura e esfriamento que podem desprender as estruturas de SU8. Ao ser flexível foi mais fácil separar-lo do contramolde quando usado na configuração de sanduíche. A única desvantagem observada da utilização dos moldes flexíveis é que estruturas de alta relação de aspecto como os postes de interconexão, por exemplo, podem ser deformadas se uma pressão excessiva for aplicada ao contramolde.

Usando o equipamento de litografia desenvolvido, junto com a técnica de litografia de escala de cinza que será apresentada no Capitulo 5.2 foram obtidos canais com seção transversal não retangular. Na Figura 33 é apresentada uma micrografia de um molde para microcanais com seção transversal triangular variável e seus perfis medidos no perfilômetro Dektak 6M.



Figura 33. Molde por litografia em escala de cinzas (esq), perfis medidos no perfilómetro Dektak 6M (dir).

Este tipo de perfil tridimensional complexo foi apresentado de forma teórico na literatura como um possível misturador mas devido a sua complexa fabricação não tem sido reportada sua aplicação prática.

Foram obtidos também moldes para nano canais usando a técnica de litografia ótica com máscaras de fase antes descrita. Na Figura 34 são apresentadas micrografias eletrônicas de varredura de linhas submicrométricas obtidas seguindo o procedimento descrito no Capitulo 4.3.1, usando como microestruturas de base, quadrados de 10 um de lado e linhas de 5 um de largura.



Figura 34. Micrografias em MEV de linhas submicrometricas

Esta técnica permite alcançar tamanhos de até dezenas de nanômetros sendo controlados a principio mediante a espessura do resiste usado para moldar a máscara de fase.

## 5.1.2 MOLDAGEM DE PDMS

Com a aplicação por rotação de camadas de PDMS sobre moldes de dois níveis apresentados no capítulo 3.3.1, se obtiveram furos passantes, quando a espessura da camada fica menor que a altura do molde, porém os furos apresentaram uma borda tipo menisco que pode dificultar a selagem com as camadas posteriores Na Figura 35 apresentamos fotografias de camadas obtidas por *spinning* em moldes de dois níveis.



Figura 35 Camadas de PDMS obtidas por spinning em moldes de dois níveis.

Para verificar a condição de furos passantes as camadas produzidas por moldagem aberta foram coladas sobre vidro e submersas em anilina vegetal. Apesar da borda tipo menisco que rodeia cada furo, é possível interconectar camadas usando estas vias.

A aplicação por *spinning* a velocidades baixas permitiu obter também camadas mais espessas, porém para espessuras maiores que um milímetro é preciso dispor de uma borda nos limites do molde para confinar o PDMS líquido.

Mediante a moldagem em configuração sanduíche (ou de molde fechado) obtiveram-se também camadas de PDMS com furos passantes para interconexão entre camadas. Os furos obtidos por este método não apresentaram os acidentes na topografia encontrados na moldagem aberta já que o contramolde cria uma superfície plana. A máxima pressão que pode ser aplicada ao molde sanduíche dependerá da densidade de estruturas altas e da relação de aspecto (altura/largura) das mesmas; bons resultados foram obtidos com 2kgf para lâminas de três polegadas.

A desmoldagem a partir desta configuração foi consideravelmente mais difícil e transferiu esforços maiores às estruturas do molde, o que somado aos esforços por dilatação térmica dos ciclos de aquecimento e esfriamento tende a ocasionar o

desprendimento parcial da interfase SU8-A1. Para minimizar os esforços da desmoldagem na configuração fechada, o PDMS usado como contramolde deverá ser também fino (2-3 mm) para permitir uma separação paulatina do sanduíche, ou empregar somente moldes flexíveis contrapostos enfrentados a lâminas de vidro como contramoldes como foi apresentado no Capitulo 4.3.2.

Os resultados obtidos com ambas as configurações de moldagem foram satisfatórios, permitindo a definição de furos de acesso entre camadas. Na Figura 36 são apresentadas fotografias de dispositivos de duas camadas com interconexões, preenchidos com anilina para ilustrar a continuidade dos canais formados.



Figura 36. Dispositivo de duas camadas fabricado em molde fechado.

#### 5.1.3 SOLDAGEM DE PDMS

Dos primeiros testes de ativação com plasma de oxigênio em reatores RF capacitivos obtiveram-se somente algumas uniões parciais entre as peças de PDMS para condições

de potências e tempos de processamento baixos, como era esperado segundo a literatura. Observou-se que as regiões não diretamente expostas ao plasma, tais como as bordas de fixação das amostras experimentaram maior adesão, o que sugere que o bombardeamento direto sobre as superfícies influencia fortemente o resultado da solda.

Já com o reator de plasma remoto e os reatores RF indutivos foram obtidas soldas com 100% da área, e boa reprodutibilidade. Encontrou-se que para diferentes combinações os resultados podem ser equivalentes, existindo uma relação inversa entre potência e tempo. Os diferentes testes evidenciaram que a soldabilidade das peças ativadas apresenta, para cada condição, um tempo de tratamento ótimo, acima do qual a oxidação não contribui ao aumento da resistência da solda e pelo contrário cria um óxido não reativo que impede a união das peças, este resultado é coerente com os estudos reportados na literatura consultada (Bhattacharya, 2005).

Das combinações que lograram 100% da área soldada e boa reprodutibilidade foi adotada como padrão a ativação em plasma de oxigênio a 300 mTorr, durante 50 segundos com 18W de potência. Na Figura 37 são apresentadas fotografias de fragmentos de PDMS soldados nestas condições.



Figura 37. Testes de colagem PDMS/PDMS (esq), PDMS/Silício (cent.) e PDMS/Vidro (dir).

Com o reator de plasma remoto, e usando a condição adotada de 30W, 300 mTorr, 50 segundos, obteve-se a solda irreversível do PDMS sobre vidro, silício, óxido de silício e pasta vítrea co-sinterizada sobre cerâmica LTCC, o qual permite utilizar o PDMS como material integrador de diferentes tecnologias baseadas nestes materiais, como será apresentado na seção 5.1.5.

Com ambos os reatores indutivos foram obtidas soldas reprodutíveis com 100% de efetividade para as condições de 300mTorr, 30W com tempos de 30 segundos para o reator do LSI e 2 minutos para o Harrick. A diferença dos tempos de processo requeridos para uma correta ativação ocorre devido ao fato de que a composição do gás no plasma Harrick contém maior proporção de ar residual devido a sua menor pressão de fundo.

Foi verificado que o efeito da ativação superficial do plasma pode ser prolongado mais tempo aplicando um pouco de etanol na superfície sem prejuízo ao resultado da solda, mas é importante que as superfícies permaneçam em contato até a completa evaporação do álcool. Mediante a adição de álcool conseguiu-se alinhar manualmente múltiplas camadas de PDMS para produzir dispositivos complexos. Na Figura 38 é apresentado um dispositivo microfluídico de dois níveis soldado por ativação com plasma de oxigênio usando álcool para alinhamento.



Figura 38. Dispositivo de dois níveis soldado por ativação com plasma de O2.

Encontrou-se que após ter alinhado as camadas com ajuda do álcool obtém-se melhores resultados esperando que o álcool se difunda e evapore a través do material para que não forme bolhas ao aquecer até 120°C a junção.

Além das soldas ativadas por plasma obtiveram-se soldas irreversíveis com 100% da área soldada mediante a técnica de difusão de catalisador apresentada na seção 3.3.3. Este método apresenta duas vantagens principais em relação ao método de solda ativada por plasma; a opção de fabricar dispositivos multicamadas sem a utilização de reatores de plasma, o que barateia o custo da técnica, e a possibilidade de manipular por mais tempo as camadas no processo de alinhamento sem perder a soldabilidade.

Com este método foi possível também fabricar dispositivos com mais de dois níveis, intercalando camadas finas das duas composições de mistura. Na Figura 39 é apresentada uma micrografia de um dispositivo de três camadas fabricado usando a técnica de solda por difusão de catalisador.


Figura 39. Dispositivo de três camadas soldadas por difusão de catalisador. Com corante vermelho e azul as camadas de válvulas de controle sobre canais circulares

# 5.1.4 MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DO PDMS

## **Recobrimento com PVP**

Com a incorporação de moléculas de PVP à superfície de PDMS ativada por plasma foi possível tornar o PDMS permanentemente hidrofílico diminuindo o ângulo de contato como mostrado na Figura 40.



Figura 40. fotografia de uma gota de água DI sobre o PDMS antes e após o recobrimento com PVP.

O ângulo de contato caiu de 110° da amostra sem tratar, para 24.19° imediatamente após o tratamento e se manteve em 24° após 24 horas, o que indica que o comportamento hidrofílico é devido ao PVP e não ao tratamento com plasma. Foram também analisadas as superfícies por microscopia de força atômica. Na Figura 41 são apresentadas as micrografias AFM do PDMS antes e depois do tratamento.



Figura 41. micrografia AFM de uma amostra de PDMS antes e após o recobrimento com PVP

São apenas visíveis os aglomerados de PVP sobre a superfície, sendo que a rugosidade praticamente não é afetada.

Este tratamento poderia ser utilizado para diversas aplicações onde a característica hidrofílica seja importante, como por exemplo o bombeamento por capilaridade, ou nos quais se requeira tornar o PDMS parcialmente hidrofílico, mascarando o processo de ativação com plasma, para estampagem ou fixação localizada de moléculas; ou também como etapa intermediária para incorporar outras ramificações na cadeia do PVP para funcionalizar as superfícies. Na seção 5.3 será apresentado o uso deste processo para cultura de células em confinamento.

#### Tratamento com plasmas fluorados

As medidas de ângulo de contato das amostras tratadas com plasmas de CF4/H2 apresentaram uma tendência a diminuir a hidrofobicidade do PDMS com o tempo de tratamento; efeito que é também proporcional à porcentagem de  $H_2$  na mistura gasosa como é apresentado nos gráficos da Figura 42.



Figura 42. Ângulo de contato de amostras de PDMS processadas com plasma de CF<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>

Não se pode afirmar que haja uma relação direta entre a característica hidrofóbica ou hidrofílica da superfície e suas propriedades de aderência ao PDMS durante a moldagem, já que a diminuição do ângulo de contato pode ser devida a diferentes fatores como o aumento da rugosidade, à formação de espécies carregadas ou ligações polares na superfície ou à deposição de um material com maior afinidade à água.

As curvas na Figura 43 correspondem às medidas de ângulo de contato das superfícies de PDMS e do vidro tratadas com plasmas fluorados após serem enxaguadas por 10 minutos com IPA e água para remover cargas superficiais e compostos não quimicamente ligados à superfície.



Encontrou-se que sobre vidro o tratamento tem o efeito de aumentar o ângulo de contato enquanto que sobre o PDMS o tratamento diminui o ângulo de contato, indicando que o polímero depositado poderia ter um valor intermediário de ângulo de contato por volta de 90°.

O resultado de ambos os tratamentos com 5% e 20% de hidrogênio foram similares no caso do vidro, mas bastante diferentes no caso do PDMS. Este fato pode ser devido a uma depleção de íons de flúor por reações de corrosão do vidro que acaba incrementando localmente a concentração relativa do hidrogênio chegando perto da saturação da taxa de deposição que acontece acima de 20% de H<sub>2</sub>.

Quando comparada a evolução do ângulo de contato das amostras recém-tratadas da Figura 42 em relação ao tempo de processo, com as mesmas amostras após enxaguar com IPA (Figura 43) é evidente que há uma degradação do efeito que conduz à recuperação parcial do valor de ângulo de contato original do substrato, possivelmente devido à eliminação de cargas e ao rompimento do filme depositado. A partir da Figura 43 pode ser concluído também que os filmes mais espessos depositados com 20% de hidrogênio e tempos maiores são afetados em maior medida pelo processo de enxágüe e que a adesão do polímero fluorado ao vidro é aparentemente maior que ao PDMS.

Todos os tratamentos estudados conseguiram em maior ou menor grau o efeito antiaderente desejado, e foi possível classificar de baixa para alta a força requerida para destacar com pinças uma gota de 200  $\mu$ l de PDMS curado sobre cada amostra. Seis amostras correspondentes a duas proporções de CF<sub>4</sub>/H<sub>2</sub> para três tempos de processo foram indexadas de 1 a 6 segundo a comparação qualitativa feita por dois experimentadores em três repetições independentes.

Os espectrogramas de força atômica das amostras exibiram saltos de *pull-off* diferentes para cada tratamento e também diferentes variabilidades ponto a ponto dentro da mesma amostra. Na Figura 44 são apresentados diferentes espectrogramas de força atômica das amostras e os saltos de *pull-off* de cada tratamento.



Esperava-se que o salto de *pull-off*, que é a máxima deflexão do cantilever antes de perder contato com a amostra no ciclo de retorno, fosse proporcional à força adesiva entre o PDMS e a superfície tratada, porém quando são desenhados simultaneamente os dados de AFS com os índices da força requerida para destacar o PDMS curado encontraram-se comportamentos completamente invertidos. O gráfico da Figura 44 direita apresenta ambos os diagramas superpostos sendo que o menor salto de *pull-off* correspondeu ao maior índice de força e vice-versa.

Esta aparente inconsistência pode estar relacionada com a rugosidade das superfícies que pode afetar a área de contato efetiva entre a ponta recoberta e a amostra. Se a rugosidade da superfície é tão alta que somente alguns picos irão interagir com a ponta de AFM então a força de *pull-off* será baixa, mas pelo contrário a área de contato efetiva com a gota de PDMS líquida curada sobre a superfície será maior precisando uma força maior para destacá-la.

As amostras com maior variabilidade, que coincidem com as menores forças de *pull-off*, são aquelas com filmes polimerizados de maior espessura (20% H2, 5 e 10 minutos), que aparentam ter sido danificados pelo enxágüe em álcool isopropílico, o que explica o fato de ter alta variação de um ponto ao outro. As imagens de AFM das superfícies podem fornecer maior informação a esse respeito.

Na Figura 45 são apresentadas as micrografias da amostra de referência e duas amostras tratadas. As três amostras tratadas com 5% de  $H_2$  e a tratada com 20% de  $H_2$  por um minuto apresentaram topografias similares à amostra de referência, sendo que todas elas continuaram translúcidas com apenas um pequeno aumento na rugosidade, enquanto

65

que as amostras com tratamentos mais longos com 20% de  $H_2$  produziram filmes de cor marrom que conduziram a uma textura rugosa após enxaguar as amostras.



Figura 45. Micrografias AFM das amostras de PDMS: não tratadas (esq), processadas com CF4+20%H2 por um minuto (centro) e 10 minutos (dir).

Estes resultados são consistentes com as observações anteriores de AFS e medidas de ângulo de contato, indicando que os tratamentos que produzem filmes mais finos são mais estáveis que os que produzem filmes espessos. Quando comparados os resultados dos diferentes tratamentos encontrou-se que os processos para 1 minuto com  $CF_4+20\%$  $H_2$  e 10 minutos com  $CF_4+5\%$   $H_2$  são bastante semelhantes, possivelmente equivalentes a uma espessura similar da camada polimerizada; Estes dois tratamentos apresentaram a menor força de adesão e menor rugosidade e menor variabilidade nas medidas de AFS.

O ângulo de contato medido para a superfície tratada com HMDS foi de 86° (110° referência de PDMS) verificando que há uma modificação química da superfície; este ângulo se manteve estável após 48 horas, indicando que o efeito é permanente e não apenas uma ativação temporal devida ao plasma, porém depois de moldar e dês-moldar vinte vezes PDMS sobre a superfície o ângulo de contato voltou a 102° como se o tratamento fosse suprimido no processo.

Os testes de adesão ao PDMS demonstraram que a silanização com HMDS confere também ao PDMS uma característica antiaderente com forças de adesão baixas comparáveis às obtidas com os melhores tratamentos com plasmas fluorados que foram estudados. Na Figura 46 é apresentada uma micrografia de força atômica da superfície de PDMS tratada com HDMS ao lado da micrografia da superfície de referência.



Figura 46. Micrografia AFM da amostra de PDMS: referência (esq) e tratada com HMDS (dir).

A superfície tratada com HMDS apresenta uma textura com aparência de trincada, mas ainda com rugosidade baixa. Este tratamento é de mais baixo custo e menos contaminante que o tratamento com  $CF_4$ , e utiliza o mesmo reator de plasma remoto usado para a solda de PDMS. Portanto ele foi adotado como padrão para tornar antiaderentes os moldes de PDMS.

## 5.1.5 INTEGRAÇÃO COM OUTRAS TECNOLOGIAS

Integração com chips de silício

Na Figura 47 é apresentada a fotografia de um sensor de pressão em silício soldado sobre um dispositivo simples em PDMS. A conexão entre o microcanal e a membrana do sensor foi feita cortando um furo de 1 mm de diâmetro similar aos utilizados para a conexão aos tubos de entrada e saída de líquidos.



Figura 47. Dispositivo em PDMS unido a um sensor de pressão

O dispositivo foi pressurizado até a pressão máxima de trabalho do sensor (30 PSI) sem vazamentos.

# Integração com fibras óticas

Para integrar fibras óticas a sistemas fluídicos com canais de dimensões similares ao diâmetro da fibra bastou a criação de canais adicionais para inserir as fibras como se mostra nas fotografias da Figura 48.



Figura 48. Dispositivos com canais e fibras ópticas (A) canais fluídicos, (B) e (C) fibras óticas

Para o caso de canais com dimensões inferiores ao diâmetro da fibra a integração foi possível a partir de chip de silício com sulcos que atuam como guias mecânicos para a fibra e para o PDMS. Na Figura 49 são apresentadas fotografias do chip de silício e do chip hibrido PDMS/Si obtido após soldar por plasma as duas partes. O PDMS foi moldado com uma espessura de 5 mm e furado com uma agulha de 1 mm de diâmetro previamente à solda, para conectar as tubulações de entrada e saída de líquidos.



Figura 49. Chips de silício com sulcos para fibra (A) e alinhamento (B) (esq) e chips após soldar o PDMS (dir)

Os chips foram cortados, clivados e soldados um por um manualmente, porém o processo é escalável ao nível de lâmina podendo ser cortado o chip em conjunto na etapa final do processo de fabricação. Para as conexões fluídicas foram utilizados tubos flexíveis calibre 18 (1,024 mm). Na Figura 50 são apresentadas duas fotografias de um chip conectado às tubulações de entrada e saída de líquido e às fibras óticas.



Figura 50. Fotografias de um chip conectado às tubulações e fibras (esq) e detalhe do chip sendo iluminado com um LED de 455nm (dir).

# Integração com eletrodos metálicos

Na Figura 51 são apresentas fotografias de eletrodos metálicos fabricados sobre vidro.

Figura 51. Eletrodos em titânio depositados por *sputtering* sobre vidro (esq), detalhe de microcanal em PDMS (marcado com corante) soldado sobre eletrodos (dir).

Na Figura 52 é apresentada uma micrografia do canal da figura 51 ao injetar uma suspensão de leveduras as quais são imobilizadas perto dos eletrodos ao aplicar um potêncial DC de 10V entre eles.



Figura 52. Leveduras sendo capturadas pelo campo elétrico nos eletrodos

Diversas técnicas de detecção eletroquímica, amperométrica ou impedométrica podem ser implementadas com os eletrodos assim fabricados, ao mesmo tempo que podem ser implementadas técnicas de bombeamento eletrocinético ou separação ou classificação de partículas usando campos elétricos chaveados.

Até uma pressão aproximada de 5 PSI não houve vazamentos apreciáveis, mas dado que o metal não solda com o PDMS, criam-se nano canais no contorno dos eletrodos pelo degrau que gera o filme metálico (aprox. 100nm de altura). Para resolver este problema uma camada de passivação deve ser colocada sobre o metal nas áreas que serão soldadas. Foi verificado que o PDMS pode ser soldado sobre oxido de silício depositado pela técnica de *sputtering*, sendo uma possível camada de passivação que facilita a vedação dos canais soldados sobre eletrodos metálicos. Dependendo do tipo de metal depositado a camada de oxido de silício pode ser removida da superfície ativa do eletrodo usando corrosão em HF ou por corrosão com plasma de CF<sub>4</sub>.

## Integração com cerâmicas verdes

Todas as referências de pastas vítreas utilizadas para possibilitar a solda ativada com plasma de dispositivos em PDMS sobre dispositivos em LTCC apresentaram boa soldabilidade resultando em 100% da área soldada. Na Figura 53 é apresentada uma fotografia do dispositivo terminado, misturando dois corantes vegetais de cores amarelo e azul.



Figura 53. Dispositivo em LTCC (misturador) com janela de vidro colado com PDMS.

O dispositivo foi testado em condições extremas a uma temperatura de 150° e uma pressão de 30 PSI por uma hora, sem apresentar vazamentos ou falhas.

Na Figura 54 é apresentado o desenho esquemático de um circuito composto por três geradores de microemulsões discretos, interligados mediante um substrato de LTCC para gerar emulsões água/óleo/água com diferentes composições e uma fotografia do dispositivo fabricado.



Figura 54. Esquema de circuito com três geradores de micro-emulsões (esq), dispositivo fabricado (dir).

A padronização de componentes fluídicos discretos, fabricados em larga escala e baixo custo, mediante técnicas bem estabelecidas da microeletrônica, possibilitaria a laboratórios que não contam com infra-estrutura para microfabricação, a opção de desenvolver dispositivos complexos mediante a integração híbrida com LTCC com um sem número de possibilidades.

# 5.2 SISTEMA PARA LITOGRAFIA SEM MÁSCARA.

## 5.2.1 INTRODUÇÃO

Uma facilidade para quem pesquisa em microfluídica é que as dimensões dos dispositivos são geralmente de dezenas ou até centenas de micrometros pelo qual é possível fabricar rapidamente protótipos para prova de conceitos usando máscaras flexíveis impressas em *photoplotters* da indústria gráfica, que conseguem boa definição para estruturas com tamanhos críticos a partir de 35 µm; para obter máscaras com estruturas menores é preciso recorrer a processos de cópia com redução, ou mandar a fabricar máscaras profissionais com litografia por feixe de elétrons ou laser de alta

resolução, o que encarece a prototipagem de dispositivos e aumenta os tempos entre o projeto e o protótipo.

Para agilizar o processo de prototipagem e alcançar geometrias menores às resolvidas pelos fotolitos da indústria gráfica local foi desenvolvido um sistema ótico para litografia sem máscara, no qual, uma imagem é criada com ajuda do chip DMD (*Digital Micromirror Display*) da *Texas Instruments* e projetada sobre a superfície de amostras recobertas com fotorresiste. Na Figura 55 é apresentado um desenho esquemático do sistema, o qual se compõe de uma lâmpada de mercúrio, lentes para iluminação e projeção, o chip de microespelhos que modula a luz refletida, uma câmera CMOS para alinhamento e um sistema mecânico de varredura para deslocar o substrato.



Figura 55. Desenho esquemático do sistema litográfico

O chip DMD é um microsistema eletromecânico que chaveia pequenos espelhos entre duas posições angulares, que dada sua minúscula massa podem trabalhar em freqüências de até 10 kHz, nesta configuração cada microespelho do chip DMD atua como um ponto ou pixel dinâmico da imagem que esta sendo projetada. A possibilidade de mudar rapidamente o padrão que está sendo projetado, durante a exposição, permite criar um efeito de escala de cinza definindo independentemente o tempo que cada pixel recebe radiação. Esta estratégia pode ser empregada para gravar relevos com perfis arbitrários em fotorresiste, o que tem interessantes aplicações em áreas como a micro-ótica e microfluídica.

Ao utilizar uma lâmpada de mercúrio do mesmo tipo das empregadas nas alinhadoras da sala limpa a montagem proposta pode ser utilizada para gravar diretamente qualquer fotorresiste ou para fabricar uma máscara em vidro que depois seja transferida por litografia de contato.

As principais características do sistema desenvolvido são: a possibilidade de obter estruturas com resolução maior à alcançável com fotolitos da indústria gráfica local, a opção de escrever diretamente no substrato sem a confecção de uma máscara intermediária e a possibilidade de expor cada pixel com uma dose diferente para conseguir litografia em escalas de cinza.

A seguir são apresentados os procedimentos efetuados para caracterizar e otimizar o sistema litográfico e sua aplicação na fabricação de máscaras e microestruturas 3D. No Anexo 3 é apresentada uma descrição técnica detalhada de todos os circuitos, sistemas mecânicos e óticos e programas de controle que foram desenvolvidos para o sistema litográfico.

# 5.2.2 CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA LITOGRÁFICO

O sistema litográfico foi estudado em detalhe para estabelecer os limites e condições ótimas de operação, corrigindo os diferentes efeitos negativos da difração e a não homogeneidade da iluminação, entre outros.

#### Distribuição de irradiância

A área útil do sistema litográfico é composta por 800x600 microespelhos que são iluminados por um feixe de luz produzido por um iluminador tipo Köhler (ver Anexo 3) que oferece uma relativa uniformidade, porém é um pouco menos intenso na proximidade das bordas pelo qual as os espelhos próximos aos cantos do chip recebem uma dose menor que os do centro, precisando de uma compensação ponto a ponto para garantir a gravação homogênea no fotorresiste.

Para conhecer a distribuição de irradiância em cada ponto do chip foi utilizada uma câmera CCD (*Motic de 3.3 MPixel*) posicionada no lugar do substrato, adicionando um atenuador (conjunto de dois polarizadores) no feixe de iluminação. Uma seqüência de imagens foi capturada em diferentes ângulos de rotação da câmera para evitar interferências causadas pela varredura do CCD, as imagens foram processadas com o software *Matlab* 7.6 com o qual se fez uma media das várias imagens, se giraram, recortaram e escalaram para construir uma matriz de compensação C, normalizada. Na Figura 56 é apresentada a distribuição de irradiância medida.



Figura 56. Distribuição de irradiância no plano do substrato: gráfico 3D (esq), imagem 2D (cent) e perfil de intensidade da diagonal (dir).

A máxima diferença de intensidade encontrada foi de 30% em um dos cantos do chip, porém 80% da área central possui uma variação menor que 10%. Para algumas aplicações estas variações podem ser desprezíveis, mas para estruturas com dimensões críticas perto das bordas é preciso compensar a falta de luz nos cantos. A compensação consiste simplesmente em somar a cada pixel da imagem I a porcentagem que falta a os pixels da imagem de compensação C para dar seu valor máximo, ou seja: I = I + I [1-C]. Na Figura 57 são apresentadas duas imagens comparativas de uma grade gravada com e sem a compensação.



Figura 57. Micrografias de uma gravação sem (esq) e com (dir) compensação de irradiância.

#### Correção de efeitos de proximidade

Devido à difração da luz e à baixa abertura numérica do sistema ótico, cada ponto (pixel) no resiste recebe a luz refletida no seu microespelho correspondente, mas também uma pequena contribuição dos espelhos vizinhos, precisando que no cálculo da dose adequada para cada pixel deva ser levada em conta uma correção similar à que se usa na litografia por feixe de elétrons para compensar o retro espalhamento dos elétrons da vizinhança.

Para corrigir estes efeitos de proximidade foi desenvolvido um algoritmo de correção linear simples que consiste em somar ao valor de cada pixel iluminado um fator inversamente proporcional ao valor médio gaussiano da vizinhança, assim os pixels rodeados de pixels iluminados recebem menos intensidade que os rodeados por pixels escuros. Para implementar o algoritmo se aplicou um suavizamento gaussiano ao negativo da imagem original operando da seguinte maneira:

I2 = I \* [1+k \*Gauss(1-I)]

O algoritmo foi implementado como um script em Matlab descrito a seguir:

```
I=imread('mascara.bmp');
K=2;
S=2;
Iinv = 255-I; % inverter os tons da imagem
h = fspecial('gaussian',[3 3],S);
G =imfilter(Iinv, h); % Aplicar suavizamento gaussiano
G= G/max(max(G)); % normalizar
for i=1:600
for j=1:800
I2(i,j)= I(i,j)*[1+(K * G(i,j))]; % Imagem corrigida
end
```

imwrite(I2/max(max(I2)),['mascara\_mod.bmp']);

end

Dois parâmetros S e k são configuráveis neste algoritmo, ambos relacionados ao quando a luz de um pixel espalha-se aos pixels vizinhos, S representa o tamanho da vizinhança considerada e k um fator multiplicativo que acentua em maior ou menor grau a correção. Na Figura 58 é apresentado um exemplo do resultado de aplicar o algoritmo de compensação a um padrão com fatores S=2 e k=2.



Figura 58. Máscara original (esq) e compensação por proximidade com  $\mathbf{k}$  =2 (dir).

A rigor, estes parâmetros deverão ser ajustados experimentalmente para cada condição de exposição já que os resultados mudarão com a lente utilizada e com o plano de exposição. Na Figura 59 são apresentados os resultados de gravar os anteriores padrões com e sem compensação em fotorresiste.



Figura 59. Resultados de gravar os padrões da Figura 58 em fotorresiste.

As melhorias na qualidade e definição dos padrões ao aplicar o algoritmo de compensação são evidentes. Nas áreas mais abertas a largura das linhas fica menor que nas áreas estreitas, mas quando a compensação de proximidade é utilizada a largura obtida é uniforme. Para valores altos de K o resultado obtido é super compensado, sendo que unicamente as bordas das estruturas acabam sendo reveladas; bons resultados foram obtidos com valores de S=2 e K=2.

#### Tamanho de pixel e limite litográfico

Para medir o período espacial dos pixels projetados utilizou-se a câmera CMOS interna do sistema e uma amostra de silício com um padrão de quadrados previamente medidos com a ajuda de um microscópio ótico; assim, ao capturar a imagem da amostra de silício através do sistema, superposta com a imagem de uma quadricula projetada conseguiu ser estimada uma distância entre pixels de 2.5µm para a lente de 5X e de 10µm para a lente de 1X.

Estes valores correspondem aproximadamente ao tamanho do pixel projetado com cada lente, porém não representa a máxima resolução alcançável com o sistema, já que múltiplos fatores podem conduzir a que seja requerido mais de um pixel para definir um padrão corretamente transferido ao fotorresiste. Para estabelecer a resolução ou limite litográfico do sistema foram expostos diferentes padrões de teste com linhas e quadrados de diferentes tamanhos para cada uma das duas lentes objetivas do sistema variando o tempo de exposição e o plano focal, adicionalmente foram usados padrões circulares com diferentes raios que possam fornecer uma guia que oriente o projeto de máscaras a serem escritas com o equipamento. Na Figura 60 é apresentada a imagem utilizada para estabelecer o limite litográfico do sistema e uma micrografia do melhor resultado obtido ao gravar o fotorresiste AZ1518.



Figura 60. Padrão de resolução utilizado para testes (esq) e resultado no fotoresiste AZ1518(dir).

Para condições rigorosas de exposição e revelador linhas isoladas de um pixel de largura ainda conseguem ser definidas, como pode ser apreciado na Figura 61 esquerda, porém, os limites práticos são 2 pixels para linhas abertas (~5  $\mu$ m), 4 pixels de diâmetro para círculos (10  $\mu$ m) e 6 pixels para obter retângulos bem definidos (15  $\mu$ m), ver Figura 61 direita.



Figura 61. Detalhe dos resultados obtidos: linhas (esq), círculos e Quadrados (dir).

### Efeito do espaçamento entre microespelhos

Os microespelhos do chip DMD da *Texas Instruments* não compõem uma superfície continua, possuem uma pequena distância de separação entre elementos que aparecem como linhas escuras no padrão irradiado. Estes defeitos na imagem projetada criam uma rugosidade alta nas superfícies dos relevos 3D gerados com o sistema ou bordas serrilhada nos padrões 2D. Para corrigir este problema foi estudada a estratégia de projetar as imagens ligeiramente desfocadas, analisando o compromisso entre a rugosidade e resolução de amostras gravadas em diferentes planos focais.

Na Figura 62 são apresentadas micrografias de força atômica (AFM) de gravações feitas em diferentes planos focais; a do centro corresponde a uma imagem em foco que evidencia a rugosidade periódica criada pelos espaços escuros entre os microespelhos, as outras duas correspondem a gravações ligeiramente fora de foco.



Figura 62. Micrografias AFM de uma gravação para três planos de enfoque diferentes.

O suavizado obtido ao mudar o plano de exposição pode comprometer por outro lado a resolução.

## Sistema mecânico de varredura

O sistema permite expor uma área de 8x8 mm<sup>2</sup> de cada vez com a lente objetiva de menor aumento e de 1.2 x 1.6 mm<sup>2</sup> com a de maior aumento, portanto imagens com dimensões maiores precisam ser compostas a partir de múltiplas exposições deslocando a posição do substrato, por este motivo a caracterização do sistema mecânico de varredura e seu alinhamento em relação à imagem projetada é um fator crítico para conseguir a gravação de uma máscara completa.

Para calcular o deslocamento equivalente a um passo dos motores de varredura, foi projetada uma quadrícula com o sistema, colocando uma câmera CCD no lugar da amostra para capturar como varia a posição de algum ponto de referência quando o estágio XY é deslocado em intervalos constantes. Após recortar e superpor fragmentos equivalentes de oito imagens com incrementos de 50 micropassos em X e oito com incrementos em Y obteve-se o resultado apresentado na Figura 63.



Figura 63. Gráfico dos incrementos medidos (esq) e imagem composta do deslocamento da marca projetada (dir).

Esta análise permite estimar uma relação de 1,85 pixels projetados por cada micropassos (4  $\mu$ m por micropasso) e evidencia um erro aleatório de aproximadamente  $\pm$ 4 micropassos.

Outro fator importante é alinhar os eixos da imagem projetada com os eixos do sistema de varredura. Para isto foram projetadas linhas paralelas e capturadas com a câmera CCD em diferentes posições. As imagens superpostas são apresentadas na Figura 64.



Figura 64. Imagem composta de linhas paralelas deslocadas.

A partir desta imagem calculou-se que há um pequeno erro de alinhamento de aproximadamente 1º a ser corrigido girando a base do sistema XY.

### 5.2.3 LITOGRAFIA EM ESCALAS DE CINZA

## Introdução e prova de conceito

O programa desenvolvido para o sistema litográfico decompõe as imagens em escala de cinzas em um arranjo multicamadas de imagens em preto e branco mediante um algoritmo de binarização dinâmica no qual o valor limiar é definido pelo índice da imagem no arranjo, ao projetar seqüencialmente as imagens se obtêm o efeito de dose variável que dependendo do contraste do fotorresiste utilizado conduz a relevos com diferentes alturas após a revelação.

Para comprovar o efeito da exposição com tempos variáveis sobre a topografia resultante no fotorresiste foram utilizados gradientes lineares de preto a branco como os apresentados na Figura 65.



Figura 65. Gradientes de dose desenhados (esq), transferidos ao fotorresiste (cent) e perfil medido no perfilômetro (dir).

Este resultado confirma que podem ser obtidos relevos por este método, porém é claro que a relação entre o perfil de cinzas da imagem original e o perfil medido no fotoresiste não é linear precisando de um algoritmo de linearização. Para estudar a aplicação do sistema litográfico desenvolvido, na fabricação de microestruturas 3D por exposição com doses variáveis, e aperfeiçoar o controle preditivo sobre os perfis revelados, foi estudado em detalhe o fotorresiste espesso AZ322 (da Allresist.de), reproduzindo sua curva de contraste para com ela calcular a relação entre tempo de exposição e altura do perfil revelado.

## Curva de contraste e Linearização

Foi aplicada uma camada de fotorresiste AZ322 a 2000 RPM (~12um) sobre uma lâmina, curada a 100° em *hot plate* por 10 minutos e exposta com 100 doses diferentes entre 500 e 10500 milissegundos. Os degraus produzidos para 4 minutos de revelação foram medidos com ajuda de um perfilômetro Dektak 3030 para construir uma curva de que relacione tempo de exposição e profundidade no fotorresiste, apresentada na Figura 66.



Figura 66. Curva de exposição VS profundidade no resiste AZ322.

A partir desta curva extrai-se que a profundidade P no resiste esta dada por:

De onde:

$$Tempo = 241.22 \cdot e^{0.3419 \cdot P}$$

Esta equação, ajustada experimentalmente para o fotorresiste AZ322, permite implementar um algoritmo que transforme uma imagem em escala de cinzas em uma

```
matriz de tempos de exposição que conduza a relevos que correspondam linearmente à
imagem original. A seguir é apresentado o dito algoritmo para Matlab 7.6:
[filename, pathname] = uigetfile('*.bmp', 'seleccione a imagem');
I= imread(filename);
I=double(I)/255;
T=10; % máxima altura dos relevos em um
Imod=241.22*power(exp(0.3419*I),T); % Calcular a dose
imwrite(Imod/max(max(Imod)),['MOD_' filename]); salvar imagem
```

Com este algoritmo foram processados os arquivos das máscaras para obter os tempos de exposição que produziriam os relevos desejados. Na Figura 67 (esquerda) é apresentado em azul um perfil de dente de serra com diferentes inclinações e superposto em vermelho o perfil de doses calculadas ao aplicar o algoritmo de linearização; e à direita na mesma Figura 67 (direita) são apresentados os perfis de relevos obtidos no fotorresiste AR322 ao expor com os perfis anteriores.



Figura 67. Perfis de dose linear e exponencial (esq), relevos resultantes no resiste (dir).

Ao expor com perfis de dose lineares os resultados obtidos foram superfícies ligeiramente côncavas e para doses com perfis exponenciais calculados os resultados

foram mais planos porém agora convexos o que indica que as constantes utilizadas na linearização ainda podem ser otimizadas.

### Exemplos de geometrias úteis

#### Microcanais com seção transversal arbitrária:

A utilização de microcanais com seção transversal retangular facilita a modelagem de dispositivos microfluídicos, mas para algumas aplicações como válvulas pneumáticas e misturadores são desejáveis outros perfis transversais, o que nem sempre é fácil de obter por técnicas convencionais de micro usinagem; seções transversais semi-esféricas podem ser obtidas por corrosão isotrópica de materiais ou por refluxo térmico de fotorresistes e seções transversais triangulares podem ser obtidas por corrosão anisotrópica de silício, porém, em ambos os casos os perfis obtidos estão limitados à geometria natural dos processos químicos ou físicos. A litografia de escala de cinzas por outro lado permite a obtenção de perfis diversos nos quais as alturas em cada ponto estão definidas pela dose arbitrária recebida por cada ponto do fotorresiste.

Na Figura 68 é apresentada a micrografia de um molde para micromisturador do tipo *twist flow* que foi fabricado usando o sistema litográfico desenvolvido.



Figura 68. Micromisturador de seção transversal triangular variável.

## Microlentes:

Outra aplicação interessante da litografia em escala de cinzas é a fabricação de estruturas refrativas e difrativas como arranjos de microlentes e outros elementos óticos. A exposição com doses variáveis permite produzir no fotorresiste todo tipo de perfis que posteriormente podem ser utilizados para moldar lentes flexíveis em PDMS ou transferir a diferentes substratos usando corrosão por plasma.

Os arranjos de microlentes podem ser aplicados aos sistemas LOC para amplificar informação ótica proveniente de microcanais ou microcavidades para tarefas como mapeamento por fluorescência de processos bioquímicos. Outras aplicações incluem sistemas de metrologia ou detecção baseados em câmeras CCD. Na Figura 69 são apresentadas micrografias e perfis medidos de arranjos de microlentes esféricas e cônicas fabricadas com o sistema litográfico usando o fotorresiste AR322.



Figura 69. Microlentes esféricas (esq) e cônicas (dir) fabricadas com o sistema litográfico desenvolvido.

## 5.3 DISPOSITIVOS E APLICAÇÕES

#### 5.3.1 CHIPS PARA ESTUDOS CELULARES.

Neste capítulo são descritos os dispositivos e métodos desenvolvidos para o estudo de fenômenos celulares, estes dispositivos foram desenvolvidos em conjunto com o Professor Douglas Weibel da Universidade de Wisconsin em Madison – Estados Unidos. Os dispositivos desenvolvidos foram: chips para separação de bactérias por suas velocidades lineares para estudos de motilidade bacteriana, chips para estudo do crescimento de *streptomyces coelicolor*, e chips para manipulação de esferoplastos para estudos biofísicos de membranas.

#### Chips para cromatografia de bactérias móveis.

Foi desenvolvido o protótipo de um micro dispositivo para classificação de células bacterianas móveis, segundo suas velocidades lineares em fluidos. O dispositivo incorpora canais microfluídicos com estruturas que orientam a direção de movimento das bactérias e válvulas pneumáticas de temporização para permitir a triagem e isolamento de células segundo sua velocidade linear. Este dispositivo fornece uma capacidade importante para estudar a relação entre fenótipos e motilidade celular e para estudos de evolução dirigida de bactérias.

Este projeto faz parte de um projeto maior de estudo biológico da motilidade bacteriana, embasado na hipótese de que após várias corridas de experimentos de seleção de bactérias móveis e modificações genéticas randômicas por mutagênese química, é possível obter cepas de bactérias geneticamente diferenciadas capazes de se locomover com velocidade superior à media, as quais podem fornecer informação importante sobre os mecanismos de locomoção em bactérias.

Para este projeto é necessário um dispositivo capaz de resolver em uma população mista de mutantes, aqueles com a maior velocidade linear em líquidos, em uma espécie de cromatografia de velocidade. Para este fim foi inicialmente proposto um arranjo polar de canais unidirecionais, dispostos entre um furo central para carregamento e um anel externo de coleta como mostrado na Figura 70.



Figura 70. Desenho esquemático do dispositivo proposto

Nesta configuração as bactérias são colocadas no centro do dispositivo através do porto A, e deixadas para nadar livremente (sem fluxo) pelos canais radiais e após certo tempo as mais rápidas se afastam do grupo e chegam ao anel exterior onde são coletadas por uma corrente de *buffer* entre B e C.

Para atingir um deslocamento unidirecional das bactérias foi projetado um conjunto de catracas com forma de seta ao longo dos canais, similares às utilizadas por S. Hulme et al, 2008, as quais orientam a passagem das bactérias em um só sentido, redirecionando

aquelas que quisessem voltar no sentido contrário como é indicado nas trajetórias remarcadas da Figura 71.



Figura 71. Explicação do efeito de orientação (adaptada de Hulme et al. 2008)

Análise teórica do dispositivo

Para avaliar o desempenho teórico do dispositivo e estudar a influência das variáveis de projeto no resultado obtido foi desenvolvido um modelo matemático simplificado que permite a simulação de diversas condições de operação. O modelo envolve:

- Criação de uma população simulada de células composta por uma mistura de duas colônias com distribuições normais de velocidades lineares.
- ✓ Uso deste conjunto para alimentar o dispositivo e simular o processo de separação espacial considerando a formula:
- ✓ Posição = [Tempo T entrada] \* velocidade
- ✓ Integrar o numero de células para um tempo x de coleta e avaliar a potência teórica de resolução.

Os pressupostos básicos do modelo são:

- ✓ Seleção aleatória dos concorrentes na entrada
- ✓ Taxa de fluxo constante de células na entrada
- ✓ Velocidade média linear constante durante a corrida.

As duas primeiras suposições são justificadas pelo fato de que as células são colocadas no dispositivo de uma só vez através de um canal largo, dando-lhes um local aleatório de partida, de onde aquelas que estão próximas aos canais de separação irão entrar com uma taxa de entrada que será limitada principalmente pela largura dos canais estreitos de separação. A terceira condição é uma simplificação mais drástica uma vez que poderia haver perdas na motilidade durante a corrida, no entanto pode-se supor que todas as células serão afetadas da mesma maneira não conduzindo a erros na separação.

Com este modelo e usando a plataforma *Matlab f*oram estudados os efeitos de variáveis como a concentração da suspensão de células, a dispersão de velocidades de cada colônia, a proporção relativa de cada colônia na mistura, a forma como as células são carregadas, etc., dando uma idéia de como a resolução e eficiência do dispositivo podem ser otimizadas.

Foi observado que quando um grupo de células de duas distribuições de nadadores, com velocidades principais diferentes, ligeiramente dispersas, é carregado no dispositivo, vai-se segregar e espalhar na coluna (chip), assim como na cromatografia, de acordo com sua velocidade efetiva de deslocamento no meio líquido, causando uma separação temporal e espacial em picos de células que podem ser independentemente coletadas.

Nos gráficos da Figura 72 é apresentada a distribuição espaço-temporal de dois tipos de células dentro do dispositivo; as células marcadas em vermelho com uma velocidade principal de 18  $\pm$  2 µm/s e as verdes com uma velocidade principal de 15  $\pm$  2 µm/s, considerando que são carregadas 100 células e que se tem uma taxa de fluxo constante de 10 células por segundo na entrada.



Figura 72. Distribuição espaço-temporal simulada no dispositivo de separação (esquerda), e número de células na saída do dispositivo em função do tempo (direita).

A partir da contagem do número de células na saída do dispositivo em função do tempo, foi ser realizada uma rotina de ajuste gaussiano que permite avaliar a resolução de separação, adaptando definições da cromatografia para este dispositivo microfluídico.

Quanto maior comprimento do dispositivo maior o tempo de retenção e a separação entre os picos, no entanto, devido à dispersão, a resolução não aumenta infinitamente com o comprimento do dispositivo, existindo um comprimento ideal para cada conjunto de condições. O custo do dispositivo é proporcional ao seu tamanho, logo, dependendo da aplicação, dispositivos pequenos poderiam ser preferidos. Na Figura 73 é apresentado um conjunto de curvas de resolução versus tempo calculada para células com distribuições normais de velocidade com diferentes graus de dispersão (desviopadrão).



Figura 73. Comportamento simulado da resolução com o comprimento do dispositivo e a dispersão de velocidades.

Conseqüentemente, todos os parâmetros que aumentam a dispersão de células dentro do dispositivo irão degradar a resolução. A concentração da suspensão de nadadores carregada, por exemplo, irá definir a taxa de entrada de células aos canais de separação; quanto mais concentrada a suspensão, maior a quantidade de nadadores disponíveis para estatisticamente encontrarem a entrada; se a taxa de entrada das células ao dispositivo é menor, é necessário um tempo maior para ter suficientes células para separar, fazendo com que o pulso de células seja mais largo no tempo e que a resolução seja diminuída como pode ser apreciado na Figura 74.



Figura 74. Efeito da taxa de entrada de células sobre a resolução.
Foi observado também que se a velocidade de todas as células é diminuída por um fator o efeito sobre a resolução é equivalente a ter um aumento do comprimento do dispositivo, o que poderia ser conseguido ajustando a viscosidade do buffer de mobilidade utilizado nos experimentos.

Todas as simulações anteriores foram realizadas assumindo uma taxa de fluxo constante de 10 células por segundo na entrada, com uma largura de pulso de 100 células (10 segundos), se um maior número de células é admitido, ou seja, pulsos temporalmente mais largos, as curvas de separação também são afetadas, mudando de uma distribuição de resposta ao impulso a uma distribuição de resposta a degraus, onde apenas as primeiras células correspondem aos nadadores mais rápidos e toda a população seguinte vai estar misturada e não pode ser separada, como ilustrado nas curvas de separação da figura 75.



Figura 75. Curvas de separação para diferentes larguras de pulso.

Este resultado sugere que uma seqüência de pulsos iria funcionar melhor do que uma alimentação contínua de célula ao dispositivo. Desta forma a totalidade da amostra poderia ser processada, tendo uma chance maior de coletar uma pequena subpopulação de mutantes mais rápidos se estivessem presentes em baixa concentração.

#### Estudo experimental

Para o primeiro conjunto de experimentos foram utilizadas as cepas de e-coli HCB437 e HCB326, cujos sistemas quimiotáticos foram apagados. Foi estudado o crescimento para diferentes condições, analisando a fisionomia e o comportamento cinético das células confinadas baixo uma lamínula de microscópio. Em geral, foi observado que na fase inicial (densidade óptica em 600 nm  $OD_{600} < 0,15$ ) a maioria das células está se dividindo (células longas de movimento lento) com algumas células maturas (nadadores mais rápidos); depois de um tempo, ( $OD_{600} ~ 0,3$ ) a maioria das células são de tamanho médio com movimento suave e muito poucos *wobblers* (nadadores excêntricos, hesitantes) e após um  $OD_{600}$  de 0,5 os *wobblers* estão cada vez mais presentes. A principal diferença observada comparado as duas cepas é que a HCB326 tende a formar grupos de células (pares ou até mais) o que nunca foi observado com cepas de HCB437.

Presença de *wobblers* que são células menores com os mecanismos de nado aparentemente defeituosos poderia estar explicada pelo esgotamento de nutrientes no meio de cultura, como indicado no artigo: *"Escherichia coli Physiology in Luria-Bertani Broth, Guennadi Sezonov,\* Danie`le Joseleau-Petit, and Richard D'Ari, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Dec. 2007, p. 8746–8749"*. De acordo com Sezonov o crescimento em estado estacionário cessa a partir de um OD<sub>600</sub> de 0,3 para o caldo LB, sendo que teoricamente suporta, um crescimento de e-coli até um OD<sub>600</sub> de 7, mas para um OD<sub>600</sub>>0,3 a massa por célula começar a para diminuir. Estas observações concordam com os experimentos anteriores realizados pelo grupo de Weibel, onde foi descrita e analisada a presença de wobblers e agregados para diferentes condições de cultivo. Para comparar a motilidade da HCB437 em diferentes fases do crescimento celular foram tomadas alíquotas de 1 ml a cada certo tempo de uma cultura continua (27ml) a 30° em caldo tríptico (com agitação de 200 RPM); após diluir as amostras para obter a mesma densidade ótica foram colocados 50 µl entre uma lâmina e uma lamínula, empregando fita dupla face como espaçador e uma vedação com parafina líquida para evitar a evaporação. Foram gravados vídeos de 20 segundos, (200 frames) com ajuda de um microscópio de contraste de fase em modo campo claro, com objetiva de 40X, os quais foram processados na plataforma *Matlab* rastreando todos os caminhos das bactérias para calcular a velocidade média e construir os histogramas apresentados na Tabela 2.

Tempo de cultura (Horas)	Histograma de velocidades para cultura em caldo Tríptico, 30°C, agitação de 200RPM (Unidades não calibradas)	OD <sub>600</sub>	Micrografia de campo claro de uma alíquota diluídos até um OD 0,11
2	30 55 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10	0,11	
3		0,29	

Tabela 2. Histogramas de velocidade e morfologia de células de HCB437



Em conclusão a cepa HCB326 se determinou inconveniente para este projeto, dada sua tendência de formar grupos (*clusters*) que em alguns casos chegam a até entupir os microcanais. HCB 437 apresentou uma natação muito suave em círculos abertos como esperado. A partir do estudo das diferentes fases de crescimento decidiu-se adotar como condição de trabalho padrão para usar com os dispositivos, a cultura em caldo tríptico (TB) a 30 ° C por 3 horas de uma alíquota de solução saturada, diluída 1:100, com agitação de 200 RPM, para obter uma densidade ótica de 0,25 a 0,3 e então resuspendida em solução tampão para motilidade (ver composições no Anexo 4).

#### Fabricação de dispositivos

Inicialmente foi fabricado o protótipo apresentado na Figura 70, usando uma máscara de campo claro de cromo sobre quartzo fabricada no CNF (*Cornell Nanofabrication* 

*Facility*), e o fotorresiste S1347 para a definição do molde. Este primeiro protótipo, com canais de 2500 µm de comprimento, foi moldado em PDMS com uma espessura de 5 mm, furado com uma agulha de 1 mm para a conexão das tubulações e soldado por ativação com plasma sobre vidro. Na figura 76 são apresentadas fotografias de um chip da primeira versão preenchido com corante vermelho.



Figura 76. Primeira versão do dispositivo fabricado.

Usando as condições de cultura estabelecidas para a cepa HCB437 foi desenvolvido um protocolo de carregamento e teste de motilidade descrito a seguir:

- ✓ Preencher a totalidade do dispositivo com solução tampão para motilidade usando o furo central.
- ✓ Colocar uma gota (10µl) de suspensão concentrada de células sobre o furo central.
- Aplicar pressão negativa no furo A de carregamento por um minuto para forçar a entrada das células no dispositivo.
- ✓ Remover a pressão e deixar as células nadarem observando o avanço no microscópio
- ✓ Aplicar um fluxo de buffer entre B e C para coletar as células do canal de saída.

Observou-se que as células são capazes de resolver os caminhos radiais do dispositivo a partir do centro para o anel externo em cerca de 2 minutos, tempo muito curto que não proporciona uma segregação considerável de nadadores (equivalente a uma maratona de 15 segundos). Mas permitiu verificar o correto funcionamento das catracas e do protocolo experimental.

Foi adaptada uma rotina de processamento de imagens que faz o rastreamento das trajetórias das células, adicionando um algoritmo que elimina o fundo estático (contorno das microcatracas) nas seqüencias de vídeo para permitir o correto cálculo da trajetória e velocidade linear das bactérias. Na Figura 77 é apresentado um exemplo das imagens capturadas e do resultado de seu processamento.



Figura 77. Micrografia de campo claro (esq), eliminação de fundo estático (cent), rastreamento das trajetórias (dir)

Com o dispositivo funcionando e os protocolos de utilização e métodos de medição de velocidades desenvolvidos foram feitas diferentes experiências de separação, capturando vídeos em diferentes tempos e posições programadas do dispositivo para mapear a distribuição de células no tempo e a distribuição de velocidades. Na Figura 78

é apresentado um gráfico com os resultados preliminares que mostra o histograma de velocidades das bactérias na saída do dispositivo em diferentes instantes de tempo.



Figura 78. Histogramas de velocidade para diferentes tempos na entrada (esq) e na saída do dispositivo (dir)

Os dados mostram que as primeiras células registradas na saída (T= 2min) possuem uma velocidade média em torno de 8 u.a. (unidades arbitrárias) enquanto que para os demais tempos a velocidade média é de 5 u.a. que corresponde com a velocidade média da população na entrada do dispositivo. Como era esperado o dispositivo estaria efetivamente separando uma pequena porção de células com velocidade acima da média, bastando ajustar o tempo de corte para coletar as primeiras células.

Para aumentar a resolução do dispositivo foram projetadas duas novas versões do dispositivo de maior tamanho, com tempos previstos de resolução de 10 e 20 minutos (ver Figura 79)



Figura 79. Três primeiras versões do dispositivo.

Com caminhos mais longos alguns outros problemas se tornaram mais evidentes, a viabilidade ou, pelo menos, a motilidade das células foi diminuindo ao longo do dispositivo, começando a ficar algumas células presas às paredes do chip. Isto exigiu alguns experimentos adicionais para avaliar a degradação da motilidade das bactérias sobre confinamento anaeróbico e para descartar se resíduos químicos no PDMS ou a composição do buffer de motilidade estejam afetando as células.

Foi proposta uma quarta versão do dispositivo que utiliza as mesmas catracas para orientar a natação unidirecional de células móveis no interior dos canais e incorpora um conjunto de válvulas pneumáticas para controlar o tempo de início e término do processo de separação. O layout do dispositivo de dois níveis é apresentado na Figura 80.



Figura 80. Layout do dispositivo: microcanais em azul, válvulas em vermelho.

O dispositivo é composto por longos microcanais paralelos com a forma de catraca e duas válvulas principais (V1 e V2) em cada extremidade que podem colapsar, simultaneamente todos os canais por baixo, para impedir a passagem de células. Canais e válvulas adicionais foram dispostos nos portos para selecionar entre entradas de carregamento/limpeza e saídas de coleta/descarte.

Para realizar uma separação, as células são carregadas em um extremo do dispositivo (do canal A para o C) e, quando a válvula de entrada V1 é aberto, as células são livres para nadar nos canais para o outro lado. As formas de catraca ao longo dos canais têm um efeito diodo no deslocamento das células para reorientar as células que tentam nadar de volta para a entrada. Depois de um tempo determinado, a válvula de saída V2 é aberta para permitir que as células que atingiram a meta saíam no final e sejam coletadas por um fluxo de buffer do porto D a F.

Devido a que os nadadores mais rápidos alcançarão primeiro o fim do caminho, então o tempo de coleta irá determinar a velocidade média das células coletadas. O dispositivo opera em uma condição sem fluxo, com a entrada e a saída de válvulas fechadas para as células serem separadas apenas por suas velocidades lineares. Quando as células desejadas foram recolhidas o dispositivo pode ser lavado do porto B e D para o E para estar pronto para uma nova separação.

A fabricação desta última versão é ligeiramente diferente às anteriores por incorporar válvulas. Os moldes para o dispositivo foram confeccionados por litografia de contato sobre lâminas de silício de três polegadas usando para a matriz mecânica dos canais um

fotorresiste positivo de 2,7 μm de espessura (S1827) e um negativo de 50μm (SU8-2000) para matriz mecânica das válvulas.

Foi preparado PDMS em proporções 1:5 e 1:20 de catalisador para polímero base para as válvulas e camada de canais, respectivamente. A camada de válvulas foi moldada com uma espessura de 3 mm, parcialmente curado (80°C 15 min) e destacado do molde; a camada de canais foi colocada por *spinning* a 2000 RPM com uma espessura aproximada de 30 µm e após uma cura parcial (80°C 15 min) foi alinhada e unida à camada de válvulas, previamente perfurada com os acessos de controle e submetido o conjunto a uma nova cura a 150°C por meia hora.

Finalmente são perfurados os portos de entrada / saída e soldado o PDMS a uma lamínula de vidro por ativação com plasma para selar os microcanais. Na Figura 81 é apresentada uma foto do dispositivo terminado, marcando com corantes de fluorescência os diversos canais e linhas de controle.



Figura 81 Quarta versão do dispositivo com válvulas pneumáticas de controle.

Esta última versão do dispositivo foi fabricada no LSI depois de concluído o estagio no laboratório de bioquímica. Por este motivo este dispositivo ainda não pode ser testado com células.

#### Crecimento apical de Streptomyces Coelicolor (S.C.) em confinamento

*Streptomyces coelicolor* é um modelo representativo de um grupo de organismos de solo, com um ciclo de vida complexo com um crescimento micelial e que envolvem a formação de esporos. Estes micróbios são notáveis por sua produção de compostos farmacêuticos úteis incluindo agentes anti-tumorais, imunossupressores e mais de dois terços de todos os antibióticos naturais atualmente disponíveis.

Este projeto, desenvolvido em parceria com o professor Klas Flärdh do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade de Upsala na Suécia, visa estudar o papel de condução da proteína divIVA na inserção de novos bloco de peptidoglicano na membrana de Streptomyces coelicolor durante o crescimento das hifas. Neste projeto é necessário desenvolver um chip e um protocolo para carregar S.C. em microcanais estreitos para promover a germinação e crescimento apical de S.C. com o constrangimento das paredes do canal.

Para ter uma variedade de cotovelos e junções em T no qual possam crescer as células e estudar as interações com as paredes, foi projetado um padrão tipo labirinto (mostrado na Figura 82) que se repete em áreas de 1 x 1.5 mm2. Estes padrões foram plotados em uma foto-máscara de cromo com duas larguras de linha diferentes de 1.5  $\mu$ m e 2  $\mu$ m e depois transferidos por litografia de contato para três espessuras de fotorresiste: 1.3  $\mu$ m,

2.7  $\mu$ m e 4.9  $\mu$ m, dando uma ampla combinação de moldes para testar a melhor condição de confinamento.



Figura 82. Layout do conjunto completo (esq), vista detalhada do padrão repetido (centro) e padrão transferido para agarose 4% p/v selado com uma lamínula e algumas bactérias para ilustrar o confinamento (dir).

As linhas no desenho CAD foram transferidas como trincheiras no fotorresiste que depois foram usadas para produzir relevos em PDMS, estes carimbos de PDMS foram usados logo para moldar os chips em agarose. A seguir (Figuras 83-85) são mostradas micrografias com uma objetiva de 40x dos diferentes labirintos carregados de bactérias e selados com uma lâmina de vidro apenas para verificar o confinamento.



Figura 83. Dispositivo em agarose, com larguras de 1,5 (esq) e 2  $\mu$ m (dir) matriz mecânica com altura de 1,3  $\mu$ m



Figura 84. Dispositivo em agarose, com larguras de 1,5 (esq) e 2  $\mu$ m (dir) máster com altura de 2,7  $\mu$ m.



Figura 85. Dispositivo em agarose, com larguras de 1,5 (esq) e 2  $\mu$ m (dir) máster com altura de 4,7  $\mu$ m.

Os moldes de 2,7 µm apresentaram melhor definição e confinamento, pelo que foram escolhidos para os demais experimentos.

Foram recebidos esporos de S.C via correio da Suécia, os quais foram cultivados em placas de Manitol-Soja-Agar (MSA), preparadas com 20 g/l de manitol, 20 g/l de farinha de soja e 20g/l de Agar. Após quatro dias de incubação a 30 ° C uma abundância de micelas foram formadas e em seguida recolhidas, filtradas e re-suspensas em glicerol para serem congeladas, seguindo o protocolo fornecido por *Flärdh* (ver Anexo 4).

Esta suspensão foi inoculada em um caldo TSB (*Tryptone-Soy-Broth*) comercial para iniciar os experimentos, cultivadas com agitação a 37°C e alíquotas observadas ao microscópio para monitorar como os esporos evoluem. Na Figura 86 são apresentadas micrografias de S.C a diferentes tempos de cultura.



Figura 86. Esporos de Streptomyces crescendo em TSB a 0 horas, 3h, e 8h de crescimento.

Foram preparados micro labirintos em manitol-soja-ágar (MSA), mas a turbidez foi demasiado elevada, devido à partículas de soja não solúveis, fazendo quase impossível visualizar os padrões, de modo que foi usado TSB + Agar em vez de MSA para um teste preliminar com os esporos. Este primeiro teste não foi bem-sucedido não sendo apreciada nenhuma germinação dentro do dispositivo.

Ao consultar com o professor Michael Thomas do Departamento de Microbiologia da Universidade de Wisconsin foi dada a sugestão para estimular o processo de germinação dos esporos, criando um transiente de temperatura de 50°C e filtrando os esporos para eliminar qualquer resto da micela.

Com esta orientação foi preparada uma nova suspensão de esporos, a partir de placas de MSA re-suspensas diretamente em TSB. Esta suspensão foi filtrada em uma seringa de

10 ml preenchida com fibras de vidro esterilizadas e depois carregada nos microcanais, colocando uma gota (5μl) sobre uma lamínula de vidro e cobrindo com o dispositivo de TSB+Agar. Finalmente a lamínula foi colocada em uma placa de aquecimento por 5 minutos a 50°C, e depois colocada na incubadora a 30°C por 4 horas.

Na Figura 87 são apresentadas micrografias (40x) de labirintos carregados com esporos de S.C. antes e depois da germinação.



Figura 87. Micro labirintos de TSB+Agar com S. C antes (esq) e após (dir) a germinação.

Neste ensaio os esporos germinam bem, mas o confinamento foi pobre, mesmo quando os esporos parecem estar dentro dos microcanais (pontos brilhantes na Figura 87 esquerda), as células germinaram fora dos canais, provavelmente devido a algum filme de líquido entre o vidro e o Agar.

Vários outros estudos foram realizados em uma forma similar, usando agarose no lugar de Agar e prestando maior atenção ao processo de vedação. Isto aparentemente melhorou o confinamento, mas afetou a germinação que tardou mais tempo para iniciar. Na Figura 88 são apresentadas micrografias (60X) de hifas de SC após 24 horas de carregados os esporos.



Figura 88. Cultura de S.C em chips de agarose mostrando lugares com o confinamento esperado e outros casos onde o crescimento ultrapassou as barreiras das paredes.

Para aplicar uma leve pressão sobre o chip de agarose, a fim de melhorar o confinamento foi testada uma configuração de sanduíche colocando o chip entre duas lamínulas de 50 x 25 mm coladas com fita nos extremos para usar a elasticidade do vidro para forçar o confinamento, porém os resultados obtidos foram os mesmos.

A fim de melhorar a adesão ao vidro e de ter paredes mais fortes foi testada a opção de usar PDMS no lugar da agarose para a fabricação dos chips. Para este efeito, o máster de PDMS foi tratado com plasma e silanizado com vapor de HMDS por 5 minutos, permitindo moldar e destacar chips de PDMS. Os microlabirintos em PDMS foram desgaseificado por 2 horas e tratados com plasma para tornar a superfície hidrofílica para simplificar o carregamento da suspensão de esporos seguindo exatamente o mesmo procedimento que com os chips de agarose.

O PDMS é permeável ao oxigênio, porém em menor medida que o Agar e se recupera rápidamente sua característica hidrofóbica depois de ter sido ativado com plasma o que gerou novos problemas que dificultaram a germinação mas puderam ser superados diminuindo a espessura dos chip e recobrindo a superfície do PDMS com poli-vinilpirrolidona para torná-lo hidrofílico como descrito no Capitulo 4.3.4. Na Figura 89 são apresentadas micrografias (60X) de microlabirintos de PDMS carregados com esporos de S.C. após 24 horas de cultura.



Figura 89 Microlabirinto em PDMS exibindo um forte confinamento das células.

Com chips finos de PDMS (< 1 mm de espessura) revestidos com PVP foi obtido um confinamento de 100% com o qual obtiveram-se bons exemplos do comportamento esperado de flexão e ramificação de S.C. ao interagir com as paredes, como aqueles mostrados na Figura 90.



Figura 90. Exemplos de crescimento bem confinado de SC em microcanais

Foram fabricados 100 chips do microlabirinto em PDMS, tratados com PVP e encaminhado a *Klas Flärdh* para continuar com o projeto. O próximo passo da pesquisa será uma cepa de S.C com a proteína divIVA marcada com fluorescência e capturar um vídeo durante o crescimento dentro dos chips para esclarecer o que acontece quando a ponta da hifa colide com uma parede e como acontece uma flexão ou uma ramificação.

#### Dispositivo para manipulação da curvatura de esferoplastos gigantes

Este projeto surgiu como continuação do trabalho do Pós-doutorando Lars Renner que estuda o posicionamento das estruturas de cardiolipina ao interior da membrana celular e sua dependência com a curvatura do microorganismo. Para dito estudo é preciso manipular a curvatura de membranas marcadas com moléculas fluorescentes para visualizar as mudanças de localização em virtude as mudançãs de curvatura.

Para manipular a curvatura das membranas foi desenvolvido um sistema mecânico de precisão que estica um gel elástico de poliacrilamida no qual estão embebidos esferoplastos gigantes, que são microorganismos esféricos de maior tamanho, produzidos a partir da modificação de células de bactérias. Outra abordagem estudada para conseguir a deformação da membrana foi a utilização de microcanais com dimensões menores que o diâmetro dos esferoplastos, de maneira que eles precisam se deformar, para poder entrar e eventualmente ficarão presos dentro dos canais; Nesta configuração a curvatura da membrana varia de acordo com o razão da seção transversal do canal para o diâmetro do esferoplasto.

Na Figura 91 é ilustrado o princíio de como os esferoplastos são deformados pelos canais, e é apresentado também o layout do dispositivo.



Figura 91. Dispositivo microfluídico para deformação de esferoplastos: conceito (esq), Layout (cent), detalhe do layout (dir)

O dispositivo está composto por seis câmaras adjacentes ligadas uma à outra através de canais paralelos com dimensões laterais de 1 a 5  $\mu$ m e uma profundidade de 2.7  $\mu$ m. Os canais de 1  $\mu$ m de largura não foram bem definidos na etapa de fotolitografia, apenas os de 2-5  $\mu$ m foram úteis para o experimento. No layout cada câmara tem seu próprio porto de entrada, mas eles podem ser perfurados seletivamente de acordo com a configuração desejada.

Dado que os esferoplastos são mais suaves do que as células, o bombeamento e controle do fluxo são críticos, especialmente com este dispositivo, e é necessário deter o fluxo quando um esferoplasto entra no canal, caso contrário, será disparado rapidamente através do canal ou até destruído contra as paredes. O diâmetro ideal dos esferoplastos para esta aplicação é de cerca de 3 a 5 µm, mas a profundidade dos canais é de apenas 2.7 µm portanto os esferoplastos já são deformados entre o fundo e o teto das câmaras, criando uma força de atrito que se opõe ao deslocamento o que exige um fluxo maior para move-los dentro do dispositivo, este fato poderia ser conveniente porque desta maneira é possível ter movimentos lentos ainda com vazões altas.

Depois de várias tentativas de bombeamento manual com seringas e com bombas de infusão, poucos exemplos de esferoplastos presos em microcanais com a membrana intacta foram obtidos. Na Figura 92 são apresentadas micrografias de alguns esferoplastos nas câmaras e canais. Imagens de fluorescência com o marcador de DNA DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) mostrou que há ainda DNA nos esferoplastos presos mas pouca fluorescência do marcador de cardiolipina NAO (10-N-nonyl acridine Orange) foi observada.



Figura 92. Micrografias de campo claro e DAPI de esferoplastos no dispositivo (esq) e micrografias campo claro, DAPI e NAO de esferoplastos presos em um microcanal (dir)

Quando uma pressão é aplicada na entrada do dispositivo, o teto de todas as câmaras é levantado, permitindo a os esferoplastos presos se moverem, mas ao mesmo tempo aumenta a vazão nos microcanais, tornando mais difícil deter o fluxo quando os esferoplastos estejam próximos à entrada dos canais estreitos. Uma maneira de resolver isto poderia ser aplicar simultaneamente pressão nas portas de entrada e de saída com controles independentes para manipular separadamente a deformação das câmaras (mecanismo de retenção-liberação controlado pela pressão absoluta) e a vazão proporcional apenas à pressão diferencial.

Duas modificações poderiam ser feitas a fim de melhorar o desempenho deste dispositivo: primeiro, o sistema de bombeamento poderia ser bidirecional para mover para trás e para frente o líquido, fazendo mais simples a tarefa de prender os esferoplastos nos canais entre câmaras, e segundo, podem ser adicionados canais paralelos aos canais principais, com uma baixa impedância e com válvulas de controle para chavear um caminho alternativo, que reduza o fluxo nos canais estreitos. É conveniente também desenvolver um processo de limpeza da suspensão de esferoplastos para evitar restos de membranas e filamentos não digeridos que podem obstruir facilmente os canais.

# 6 DISCUSSÃO GERAL

O PDMS constitui um importante material para a prototipagem de dispositivos microfluídicos para laboratórios em chip, este material, mesmo apresentando deficiências graves como a absorção dê-localizada de moléculas orgânica, e a baixa tolerância a solventes orgânicos, oferece características que o fazem único e superior para a prova de conceito de dispositivos fluídicos, entre elas a possibilidade de tornar-se reativo quando tratado com plasma de oxigênio, o que permite sua solda irreversível a diferentes materiais ou a incorporação covalente de moléculas na sua superfície para funcionalizar ou alterar suas propriedades químicas.

Outras vantagens do PDMS, além do seu baixo custo, flexibilidade, transparência ótica e biocompatibilidade, é que dada sua popularidade, inúmeros trabalhos e técnicas tem sido reportadas na literatura para sua utilização na fabricação de microdispositivos como válvulas, bombas, separadores, guias de onda, membranas, sistemas de cultura de células, micro reatores, entre muitos outros, conhecimento que facilita a aproximação de grupos de pesquisa novos à utilização das ferramentas que a microtecnologia oferece para o estudo de problemas científicos nas mais variadas áreas de pesquisa.

Este trabalho de doutorado, pioneiro no âmbito local no desenvolvimento e uso de técnicas de microfabricação de laboratórios em chip baseados em PDMS, procurou percorrer todas as etapas associadas ao processamento de PDMS, desde sua preparação e moldagem até a solda com outros materiais para permitir a fabricação de dispositivos e a integração com outras tecnologias; deixando como resultado protocolos e técnicas de microfabricação apropriadas e adaptadas às condições locais de trabalho e algumas propostas de metodologias inéditas para prototipagem de baixo custo de dispositivos

117

microfluídicos. Adicionalmente foram desenvolvidos dispositivos que demonstram a aplicabilidade das técnicas desenvolvidas para estudos celulares específicos.

Em relação à fabricação e utilização de moldes fabricados em fotoresistes foi observado que os processos térmicos para a cura do PDMS diminuem a durabilidade dos padrões, seja por deformação ou desgaste no caso dos termoplásticos como o novolak ou por dêlaminação ou fratura no caso dos termorrígidos como o SU8. O trabalho a temperaturas menores diminui estes efeitos negativos, mas aumenta os tempos de processo. A metodologia proposta de fabricação de cópias flexíveis em PDMS dos moldes fabricados em fotorresiste ajuda a resolver este problema.

Os moldes de PDMS não apresentam deterioração por ciclos térmicos, já que o coeficiente de dilatação é o mesmo que o do material moldado. Também por serem translúcidos, os moldes em PDMS podem ser facilmente alinhados com outros moldes para fabricar dispositivos multicamadas e dado que são flexíveis facilitam o processo de dê-moldagem.

A disponibilidade de ferramentas para geração de padrões a preços e tempos de retorno accessíveis limita na maioria dos casos a produtividade dos grupos de pesquisa dedicados ao projeto de novos dispositivos, ao tempo que limita os mínimos tamanhos alcançáveis; daí que muitos grupos optem por técnicas de prototipagem rápida de baixo custo que empregam fotolitos como máscaras ou até mesmo usinagem mecânica com máquinas CNC para fabricar seus dispositivos, porém para algumas aplicações especialmente na área de biofísica celular é imperativo dispor de ferramentas litográficas na escala dos micrômetros. Este trabalho de doutorado demonstrou que é possível criar técnicas e equipamentos de baixo custo capazes de produzir estruturas micrométricas ou até mesmo nanométricas. No Anexo 3 é apresentada em detalhes a

descrição técnica do sistema litográfico sem máscara desenvolvido o qual é disponibilizado para ser copiado por qualquer um com fins acadêmicos.

O sistema litográfico desenvolvido oferece também a possibilidade de fabricar em um único passo estruturas em fotorresiste com perfis tridimensionais variados, comparáveis aos obtidos por equipamentos comerciais reportados na literatura (ver Ref. litho3D) bastando caracterizar a curva de revelação de cada do fotorresiste a utilizar para ajustar o cálculo da dose requerida em cada pixel do projetor. Esta característica é bastante útil na fabricação de canais com seção transversal variável.

Os diferentes estudos realizados de ativação superficial com plasma de oxigênio para solda ou modificação superficial do PDMS reforçaram a idéia de que apenas os efeitos químicos das espécies e radicais produzidas no plasma é mais vantajoso que o bombardeamento físico dos íons reativos, motivo pelo qual deram melhores resultados os reatores indutivos e de plasma remoto. Foi observado que as terminações reativas que ficam na superfície do PDMS após a ativação são capazes de substituir ligações em outras moléculas não ativadas e incorporá-las covalentemente ao PDMS, como no caso dos tratamentos desenvolvidos com HMDS e PVP.

Embora ambos os processos de solda estudados permitisse o alinhamento de várias camadas mediante a colocação de álcool como lubrificante entre as partes, o processo de solda por difusão de catalisador oferece um maior controle já que a união irreversível é ativada termicamente e a soldabilidade não se perde espontaneamente no curto prazo após a evaporação do álcool o que permite uma maior liberdade para corrigir ou realinhar se for preciso.

A solda ativada por plasma por sua vez permite unir o PDMS a outros materiais como silício, vidro, e óxidos de silício, convertendo-o em um material integrador de tecnologias, como foi mostrado no capítulo 4.1.5

119

# 7 CONCLUSÃO

- Os protocolos de fabricação desenvolvidos possibilitam a prototipagem de uma grande variedade de dispositivos micro-fluídicos com um nível de sofisticação comparável ao encontrado no estado da arte atual desta área no mundo, habilitando a Escola Politécnica da USP para dar início a pesquisas aplicadas em diferentes áreas da micro-fluídica.
- A metodologia proposta de fabricação de moldes flexíveis a partir da modificação superficial do PDMS permite a adaptação das técnicas de prototipagem rápida em PMMA por usinagem com máquinas CNC, para a prototipagem rápida em PDMS. Adicionalmente, a possibilidade de realizar cópias descartáveis dos moldes microfabricados constitui um aporte importante às tecnologias de moldagem com PDMS.
- A montagem óptica desenvolvida para litografia por projeção, além de facilitar os processos de prototipagem de dispositivos e a fabricação de máscaras, oferece a possibilidade de iniciar outras pesquisas em áreas como a micro-óptica aproveitando a litografia em escala de cinzas.
- A estratégia proposta para o alinhamento de chips de PDMS sobre sulcos em silício, facilita os processos de incorporação de fibras óticas e com elas de uma grande variedade de técnicas óticas de análise e detecção aos dispositivos LOC.
- A partir da metodologia proposta neste trabalho para a integração híbrida de chips microfluídicos padronizados, produzidos em PDMS, sobre circuitos fluídicos usinados em substratos de LTCC, pode ser desenvolvida uma tecnologia de baixo custo de prototipagem de dispositivos fluídicos complexos, habilitando a grupos de pesquisa que façam prototipagem em LTCC, mas que

não contem com tecnologias de silício, para usar em seus projetos estruturas com dimensões micrométricas, flexíveis e translúcidas.

 Os dispositivos desenvolvidos para estudos celulares são um importante ponto de partida para pesquisas de relevância científica em biofísica e bioquímica. As quais pretendem ser continuadas no nível de pós-doutorado.

# ANEXO 1. PUBLICAÇÕES DERIVADAS DESTE TRABALHO.

Em revistas indexadas:

LOPERA S, MANSANO R. **Plasma based surface modification of Poly-Dimethyl-Siloxane for PDMS- PDMS molding**. (Manuscrito n° 767151 aceito na revista ISRN Polymer Science. 2012)

LOPERA S, WEIBEL D. Chromatographic separation of motile bacterial cells in the absence of fluid flow. (Manuscrito submetido para Physics Review E.)

LOPERA S, MANSANO R. **Hybrid integration of microfluidic devices in Polydimethylsiloxane using low temperature co-fired ceramics.** (Manuscrito sendo preparado para Microfluidics and Nanofluidics)

LOPERA S, MANSANO R. Home-Made Projection System for Maskless Photolithography (Manuscrito sendo preparado para Journal of Micromechanics and *Microengineering*)

LOPERA S, COUCEIRO P, ALONSO J, MANSANO R. Twist flow micromixers by gray scale photolithography (Manuscrito sendo preparado para Lab On Chip).

Em eventos científicos:

LOPERA S, MANSANO R. Anti-sticking plasma treatment for PDMS/PDMS Molding, Poster apresentado no XIV Latin American Workshop on Plasma Physics. Mar del Plata Argentina Nov. 2011

G.A. Cirino, S.A. Lopera, R.D. Mansano, A.N. Montagnoli, L.G. Neto Low-cost Fresnel microlens array fabricated by a home-built maskless lithography system que será apresentado na *SPIE Optical Engineering* + Applications. San Diego California, Ago. 2012

# ANEXO 2. COMPENDIO DE RECEITAS DE MICROFABRICAÇÃO

## Fabricação de Moldes por litografia

Na Tabela A1 são resumidas as receitas para litografia utilizadas com os diferentes fotorresistes a base de Novolak, usando para todos o promotor de aderência HMDS.

Nome do Resiste	Espessura desejada [µm]	Velocidade [RPM]	Temperatura. Prebake [°C]	Tempo prebake [s]	Dose Exposição [mJ/cm <sup>2</sup> ]
AZ1518	1.6	3500	100	60	300
S1318	1.8	4000	105	60	140
S1827	2.7	4000	105	90	200
STR1045	4.5	3000	105	120	350
STR1045	8	900	105	180	600
AR3320	18	2000	100	600	4000

O tempo de revelação, usando o revelador MIF300 pode variar de acordo com o tipo de estruturas e a espessura, indo de 10 segundos para estruturas abertas com resistes finos, até 4 minutos para estruturas estreitas em camadas espessas.

Após a litografia os moldes são curados a 130°C por 5 minutos para aumentar sua resistência mecânica ou a 200°C por 30 minutos para refluir o resiste e obter arestas suaves para válvulas pneumáticas.

### Fabricação de moldes de SU8 de dois níveis

- Limpeza da lâmina de vidro em solução piranha 1:4 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 10 min, enxaguando antes e depois em água DI por 5 minutos e secando em chapa ou estufa a 200°C.
- Evaporação de uma camada de alumínio ~1000 Å de espessura.
- Litografia e corrosão do alumínio para transferir a máscara do segundo nível. Utilizando o fotoresiste AZ1518 ou equivalente e corroer em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:HNO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>0 80:5:5
- Aplicação e cura de uma camada de 5µm de SU8 (SU8-2005 30s a 3000RPM) precura a 95° por 5 minutos exposição 200 mJ/cm<sup>2</sup> cura pós exposição 130° 5 min.
- Aplicação da camada de 50µm de SU8-2050 3000RPM, evaporação do solvente a 95℃ por 15 min.
- Litografia da camada de 50µm com a Máscara I (600mJ/cm2), cura pós exposição 2 min a 65°C seguido de 5 min a 95°C. Revelado ~ 3 minutos.
- Aplicação da camada de 300µm SU8-2050 500RPM
- Evaporação do solvente a 95°C por 4 horas (cobrir da exposição à luz )

- Exposição da lâmina pelas costas (3600mJ/cm2)
- Cura a 65°C 2 minutos e 150°C por 15 minutos com esfriamento lento.
- Revelação em PMGA por 2h.

#### Moldes para nanocanais

- Litografia de micropatrones com o resiste AZ1518.
- Aplicação de uma camada de PDMS por spinning a 1000 RPM
- Cura em chapa quente a 100°C por 10 minutos.
- Destacar o filme de PDMS e colocar sobre uma camada de AZ1518
- Expor através do PDMS com uma dose entre 50 e  $100 \text{ mJ/cm}^2$ .
- Revelar cuidadosamente.

### Solda química ativada por plasma

(Para duas peças de PDMS ou PDMS sobre outros materiais como vidro, Silício, Oxido de silício, pasta vítrea.)

- Limpar as amostras \*
- Carregar as amostras no reator \*\*
- Bombear a câmera por 2-5 minutos (se a linha de oxigênio estiver despressurizada ativar as válvulas e o *Massflow* para bombear também a linha de gás)
- Abrir o cilindro de oxigênio e ajustar o regulador em 5 PSI.
- Ajustar a vazão para obter uma pressão aproximada de 300 mTorr
- Ligar a fonte de alta tensão e ajustar o Variat até obter 30mA (aprox. 600V).
- Deixar o plasma agir por 50s.
- Desligar a fonte de alta tensão, fechar a entrada de gases e o bombeamento.
- Com a válvula manual de ventilação fechada ativar a chave de *Vent*, e abrir lentamente a válvula manual.
- Abrir rapidamente a tampa do reator e colocar em contato as amostras.\*\*\*
- Garantir contato conforme sem exercer pressão em excesso que possa colapsar os canais.
- Colocar as amostras sobre a chapa quente a 100° por 1-3 minutos para promover a união irreversível.

#### Nota:

\*Se o PDMS está recém moldado basta garantir que não tenha partículas, enxaguando com álcool isopropílico seguido de água DI ou limpar com uma fita adesiva que se grude às partículas e as remova.

Se o PDMS tem sido exposto ao ambiente por vários dias deverá limpar-se a superfície com HCL diluído 1:5 em água DI por 10 minutos, enxaguados e secados antes de proceder à solda.

\*\* Se as amostras a soldar são leves podem ser colocadas sobre um vidro para evitar que sejam sopradas ou deslocadas quando ventilar a câmara para quebrar o vácuo.

\*\*\* Quando precisar alinhar estruturas pequenas entre as camadas aplicar etanol puro com um spray sobre as superfícies ativadas e alinhar imediatamente, deixando secar o álcool com as partes imobilizadas.

### Solda por difusão de catalisador

- Prepar misturas de PDMS em proporções 1:20 e 1:5 de catalisador para polímero base.
- Moldar as misturas em moldes separados, geralmente a proporção 1:20 é utilizada para a camada fina que permanece no molde enquanto que a mistura 1:5 é moldada com uma espessura maior para facilitar sua manipulação.
- Ambas as partes são curadas em chapa quente a 90°C, os tempos devem ser ajustados de acordo à espessura e as características do molde.
- Uma ou ambas as camadas são destacadas do molde e colocadas em contato com a outra superfície a soldar.\*
- O conjunto é aquecido até 120°C para completar a cura durante 30 minutos.\*\*

\*Se só uma das camadas é destacada do molde sofrirá um encolhimento de 1.5% que deve ser compensado no projeto dos moldes. Se ambas as camadas são destacadas dos moldes antes de colocadas em contato não é requerida a compensação entre os tamaños do moldes.

\*\*Quando precisar alinhar estruturas pequenas entre as camadas aplicar etanol puro com um spray sobre as superfícies ativadas e alinhar, deixando secar o álcool com as partes imobilizadas antes de proceder à etapa final de cura.

## Fabricação de dispositivos híbridos LTCC-PDMS

- Laminação de três folhas de LTCC a 80° por 5 minutos (5 toneladas de pressão).
- Serigrafia de camada vítrea para soldar o PDMS (em duas passadas) \*
- Usinagem do laminado para fabricar os dois níveis em LTCC
- Laminação dos dois níveis de LTCC a 80° por 1 minuto (3 toneladas de pressão)
- Serigrafia de camada soldável para colocação de conectores fluídicos
- Sinterização do dispositivo (30 min a 350°C + 30 min a 850°C com rampas de 10°C/min).
- Colocação por rotação de uma camada fina de PDMS sobre um suporte flexível (transparência ou PDMS tratado).
- Cura do PDMS a 90° em estufa por 15 minutos.
- Ativação e solda do dispositivo em LTCC sobre o PDMS.
- Retirada do suporte flexível
- Ativação e solda de uma lamínula de vidro sobre a outra face do PDMS.
- Solda com estanho dos tubos para entrada e saída de líquido.

\* É importante serigrafar a camada vítrea antes de fazer a usinagem para evitar entupir os canais com a pasta.

# **ANEXO 3.** DESCRIÇÃO TÉCNICA DO EQUIPAMENTO LITOGRÁFICO DESENVOLVIDO

A seguir é descrito detalhadamente o sistema litográfico desenvolvido, o qual se baseia em um sistema óptico de projeção com elementos mecânicos para controle da luz e circuitos eletrônicos para geração da imagem e controlar todo o sistema desde o PC via porta USB.

### Sistema optico-mecânico

O sistema se compõe de uma torre de projeção que gera uma imagem reduzida sobre um substrato colocado sobre um sistema mecânico de varredura como é apresentado na Figura A.2.1.



Figura A2.1 Representação 3D dos sistema litografico

Ao interior da torre encontra-se uma lâmpada de mercúrio que ilumina um chip de micro espelhos extraído de um projetor DLP da Optoma, que consiste em 800x600 micro espelhos eletromecânicos que podem ser chaveados entre duas posições angulares, fazendo com que a luz que incide sobre eles possa ser refletida em duas direções diferentes dependendo do estado lógico de cada espelho. A matriz de micro espelhos ao ser re-aproveitada de um projetor de vídeo, aceita um sinal RGB em diferentes formatos padrão que é convertida em estados binários para cada microespelho.

Na configuração projetada a luz refletida em uma das posições dos microespelhos é coletada por duas lentes objetivas de redução, aparecendo como um ponto brilhante sobre o substrato, em quanto que para a outra posição a luz bate sobre a carcaça do sistema e é atenuada, aparecendo como um ponto escuro no substrato. Assim uma imagem preta e branca enviada ao circuito do projetor modula a distribuição de radiação UV no plano do substrato.

No sistema optomecânico é incorporado também um semiespelho móvel e uma câmera CMOS para capturar uma imagem do substrato que permita ajustar o foco do sistema e alinhar a imagem projetada com alguma estrutura previamente gravada no substrato. Para este sistema de imagem foi instalada também uma roda de filtros que insere um atenuador com filtro UV para iluminar a captura de imagem sem expor o fotoresiste. Esta roda de filtros ao igual que a câmera e a lente objetiva são movidas com motores de passo.

Na Figura A2.2 é apresentado um esquema dos componentes ópticos e mecânicos ao interior da torre de projeção.



Figura A2.2 Componentes da torre de projeção.

O sistema de controle de foco foi construído com duas chapas finas de aço mola a modo de guia flexível, deformadas por uma alavanca empurrada por um parafuso micrométrico unido a um motor de passo, como mostrado na Figura A2.3.



Figura A2.3 Desenho 3D do sistema de controle de foco

Com este sistema a lente objetiva pode ser deslocada quase verticalmente com um percurso de 6 mm para ajustar o foco a diferentes espessuras de substrato ou fotoresiste.

O semiespelho para captura de imagem é comandado por um servo motor Futaba de aeromodelismo para permitir sua retirada durante a exposição para não atenuar a radiação UV. Na Figura A2.4 é apresentado um desenho 3D de este módulo.



Figura A2.4 Desenho esquemático do módulo de semiespelho.

### Circuito de comando dos motores de passo

Cinco motores de passo são comandados no sistema litográfico, um para o sistema de foco, outro para a roda de filtros, outro que desloca a webcam e dois mais para controlar a rotação do substrato e deslocar a bandeja do porta-substrato. Para comandar estes motores foi projetado um único *driver* multiplexado composto por 9 transistores darlington, sendo 4 PNP para as fases dos motores unipolares e 5 NPN para selecionar o motor desejado. Todos os transistores são optoacoplados e conectados ao microcontrolador central usando um multiplexador.

Na Figura A2.5 é apresentado o circuito esquemático do módulo de potência dos motores de passo, sinalizando a função dos transistores.



Figura A2.5 Circuito esquemático do módulo de potência para motores de passo

Na Figura A2.6 é apresentado o projeto da placa de circuito impresso do anterior circuito.



Figura A2.5 Desenho do PCI do circuito de potência para motores de passo.

## Circuito de controle central

A os sistemas mecânicos movidos por motores de passo foram adicionados sensores de fim de percurso para referenciar a posição absoluta de cada elemento, estes sensores são recebidos pela placa de controle central composta por um microcontrolador PIC18F4550 que se interfasa ao PC via USB e recebe os comandos para gerar as combinações de cada motor.

O circuito central se encarrega também de ativar o relé que acende o projetor e mover o servo motor do semiespelho e foram também adicionadas duas entradas analógicas para um sensor ultravioleta e um sensor de temperatura a serem adicionados à lâmpada de mercúrio como proteção. Na Figura A2.6 é apresentado o circuito esquemático da placa de controle central e na Figura A2.7 o layout do circuito impresso equivalente.



Figura A2.6 Circuito esquemático da placa de controle central



Figura A2.7 Placa de circuito impresso do controle central.

A seguir o código do microcontrolador central (linguagem Próton-Basic 3.5):

```
Device = 18F4550
XTAL = 48
Declare ADIN_RES 10
Dim P_ON
            As PORTC.0
Dim P_EN
            As PORTE.2
Dim SERVO_EN As PORTC.1
Dim SERVO OUT As PORTC.2
Dim MOTOR_EN As PORTB.1
Dim SIGNOS
             As Byte
Dim CSTEP
             As Byte
Dim stopflag As Byte
Dim stopflag2 As Byte
Dim limited As Bit
```

Dim aborted As Bit Dim sign As Bit Dim VAR1 As Word Dim OUT\_BUFFER As String \* 20 Dim IN\_BUFFER As String \* 20 Dim CNTR As Word **Dim PTIME** As Word Dim MSTATUS[6] As Byte Dim SQNC[4] As Byte Dim M\_POSITION[6] As Word Dim motor As Byte Dim Tmotor As Byte **Dim NSTEPS** As Word

As Word Dim THETA Dim MPOS As Byte As Word Dim TEMP Dim POWER As Word Symbol  $f_IN = 0$ Symbol f OUT = 600 Symbol filter = 1 Symbol focus = 2 Symbol camera = 3 Symbol ThetaM = 4 Symbol stage = 5 Symbol fspeed = 10 Symbol cspeed = 10 Symbol sspeed = 10 Symbol zspeed = 10 Input PORTD Input PORTA.0 Input PORTA.1 **Output PORTB** Output P\_ON Output P\_EN PORTB= 253 SQNC[0]= %011100 'SEQUÊNCIA DE COMBINAÇÕES PRO MOTOR SQNC[1]= %011001 SQNC[2]= %001101 SQNC[3]= %010101 SIGNOS=0 MPOS=0 PTIME=20 For CNTR=0 To 4 MSTATUS[CNTR] = 0 M\_POSITION[CNTR] = 0 Next Low SERVO EN Low MOTOR EN 'CONFIGURAÇÃO DO USB E SUAS INTERRUPÇÕES USB\_DESCRIPTOR = "MyUSBHIDDESC.inc" USBIN\_AUTO\_POLL = OFF USBOUT\_AUTO\_POLL = OFF Symbol USBBufferSizeMax = 8 Symbol USBBufferSizeTX = 8 Symbol USBBufferSizeRX = 8 Dim USBBuffer[USBBufferSizeMax] As Byte Dim PP0 As Byte SYSTEM ' USBPOLL status return Symbol CARRY\_FLAG = STATUS.0 Symbol ATTACHED\_STATE = 6 ' is USB attached Symbol TRNIF = UIR.3 ' low if USB Busy Dim TIMER1 As TMR1L.Word Symbol TimerPreload = \$A23F ' approx 2ms

ON\_HARDWARE\_INTERRUPT GoTo USBServiceInterrupt GoTo ProgramStart USBServiceInterrupt: don't poll USB if it's busy... btfss TRNIF bra ExitInterrupt ' poll the USB interface ... Call (Check@BusStatus) Call (Driver@Service) ' clear interrupt flag and exit ... ExitInterrupt: bcf PIR1,0 TIMER1 = TimerPreload retfie fast \* FIN DA CONFIGURACÃO usb ProgramStart: GoSub AttachToUSB ' turn on interrupt timer... TIMER1 = TimerPreload T1CON = %1000001 ADCON1= %00001101 ADCON2= %10001000 PIE1 = %00000001 'enable TMR1 overflow interrupt INTCON = %11000000 ' enable global and peripheral interrupts TRISB=0 TRISd=0 \* ' \* main program loop StrN USBBuffer =" ok " USBBuffer[6] = 20USBBuffer[7] = 20GoSub DoUSBOut MONITOREO: Low MOTOR EN GoSub DoUSBIn Select Case USBBuffer[0] Case "A" GoSub SERVO\_SKIP Case "B" ' beamspliter move THETA.LowByte =USBBuffer[3] THETA.HighByte=USBBuffer[4] GoSub SERVO MOVE Case "C" HRSOut Str USBBuffer\8 StrN USBBuffer ="okmen" USBBuffer[6] = 20 USBBuffer[7] = 20
GoSub DoUSBOut DelayMS 500 Case "D" HRSin Str USBBuffer\8 GoSub DoUSBOut Case "E" GoSub EXPOSE Case "F" 'goto filter in position THETA=f IN stopflag =3 stopflag2=3 motor=filter PTIME=fspeed GoSub m move Case "G" USBBuffer[0] = motor USBBuffer[1] = PTIME TEMP= M POSITION[motor] USBBuffer[2] = TEMP.LowByte USBBuffer[3] = TEMP.HighByte TEMP= M\_POSITION[0] USBBuffer[4] = TEMP.LowByte USBBuffer[5] = TEMP.HighByte USBBuffer[6] = stopflag USBBuffer[7] = stopflag2 GoSub DoUSBOut Case "H" GoSub GOHOME Case "L" 'lamp state read ' infloop: POWER= ADIn 1 DelavUS 2 TEMP = ADIn 0 USBBuffer[0] = POWER.LowByte USBBuffer[1] = POWER.HighByte USBBuffer[2] = TEMP.LowByte USBBuffer[3] = TEMP.HighByte USBBuffer[6] = 10 USBBuffer[7] = 10 GoSub DoUSBOut ' GoTo infloop Case "M" 'motor move If USBBuffer[5]>0 Then PTIME=USBBuffer[5] motor = USBBuffer[1] stopflag = USBBuffer[6] stopflag2= USBBuffer[7] Select USBBuffer[2] Case 20 NSTEPS.LowByte =USBBuffer[3] NSTEPS.HighByte=USBBuffer[4] GoSub DEC NSTEPS Case 10 NSTEPS.LowByte =USBBuffer[3] NSTEPS.HighByte=USBBuffer[4] GoSub INC NSTEPS Case 30 sign=1 THETA.LowByte =USBBuffer[3]

THETA.HighByte=USBBuffer[4] GoSub m move Case 40 sign=0 THETA.LowByte =USBBuffer[3] THETA.HighByte=USBBuffer[4] GoSub m\_move EndSelect Case "P" 'projector on/off Select USBBuffer[1] Case 10 Low P\_ON Low P EN Case 20 High P\_EN DelayMS 500 High P ON DelayMS 5000 Low P ON EndSelect EndSelect StrN USBBuffer ="ready" USBBuffer[6] = 20 USBBuffer[7] = 20 GoSub DoUSBOut GoTo MONITOREO SERVO MOVE: M\_POSITION[0]=THETA High SERVO\_EN CNTR=0 While CNTR<=50 CNTR=CNTR+1 Servo SERVO\_OUT, THETA DelayMS 20 Wend Low SERVO\_EN Return SERVO SKIP: High SERVO\_EN CNTR=0 While CNTR<=50 CNTR=CNTR+1 Servo SERVO\_OUT, 2000 DelayMS 20 Wend Low SERVO\_EN Return 

INC\_NSTEPS: '(INCREMENT MOTOR, Nsteps, With Ptime pause) MPOS= MSTATUS[motor] For CNTR=0 To NSTEPS-1 limited=GetBit PORTD,stopflag If limited=1 Then Break Inc MPOS If MPOS>=4 Then MPOS=0 Low MOTOR\_EN PORTB= SQNC[MPOS]+32\*motor High MOTOR\_EN DelayMS PTIME

If M\_POSITION[motor]= 0 Then ClearBit SIGNOS,motor Inc M\_POSITION[motor] Else If GetBit SIGNOS,motor = 0 Then Inc M\_POSITION[motor] If GetBit SIGNOS,motor = 1 Then Dec M\_POSITION[motor] EndIf

Next Low MOTOR\_EN MSTATUS[motor]=MPOS Return

#### 

DEC\_NSTEPS: '(INCREMENT MOTOR, Nsteps, With Ptime pause)

MPOS=MSTATUS[motor] For CNTR=0 To NSTEPS-1 limited=GetBit PORTD,stopflag2 If limited=1 Then Break

If MPOS=0 Then MPOS=4 Dec MPOS Low MOTOR\_EN PORTB= SQNC[MPOS]+32\*motor High MOTOR\_EN DelayMS PTIME If M\_POSITION[motor]= 0 Then SetBit SIGNOS,motor Inc M\_POSITION[motor] Else If GetBit SIGNOS,motor = 0 Then Dec M\_POSITION[motor] If GetBit SIGNOS,motor = 1 Then Inc M\_POSITION[motor] EndIf

#### Next

Low MOTOR\_EN MSTATUS[motor]=MPOS

Return

#### EXPOSE:

GoSub SERVO\_SKIP THETA=f\_IN stopflag =3 stopflag2=3 motor=filter PTIME=fspeed

Return m move: If GetBit SIGNOS,motor=sign Then NSTEPS=Abs(M\_POSITION[motor]-THETA) If NSTEPS=0 Then Return Select sign Case 0 If M\_POSITION[motor]<THETA Then GoSub INC NSTEPS Else GoSub DEC NSTEPS Endlf Case 1 If M\_POSITION[motor]<THETA Then GoSub DEC NSTEPS Else GoSub INC NSTEPS Endlf EndSelect Else NSTEPS=Abs(M\_POSITION[motor]+THETA) If NSTEPS=0 Then Return If sign=0 Then GoSub INC\_NSTEPS Else GoSub DEC\_NSTEPS Endlf Endlf Return GOHOME: motor=filter stopflag=6 NSTEPS=600 GoSub INC NSTEPS motor=camera stopflag=0 NSTEPS=3000 GoSub DEC NSTEPS NSTEPS=1000 GoSub INC NSTEPS motor=focus stopflag=3 NSTEPS=10000 GoSub DEC NSTEPS NSTEPS=3000 GoSub INC\_NSTEPS motor=stage stopflag=4 NSTEPS=10000 GoSub INC NSTEPS

GoSub m move

Return

' \* receive data from the USB bus

1	Return		
***********************			
DoUSBIn: USBIn 1. USBBuffer, USBBufferSizeRX, DoUSBIn	' ************************************		
Return	' * wait for USB interface to attach *		
,	********		
***************************************	AttachToUSB:		
' * transmit data *	Repeat		
************************	USBPoll		
DoUSBOut:	Until PP0 = ATTACHED_STATE		
USBOut 1, USBBuffer, USBBufferSizeTX, DoUSBOut	Return		

## Circuito eletrônico para alimentação da lâmpada

Foi projetado um circuito para alimentar a lâmpada de arco utilizada no sistema litográfico, o circuito utiliza um SCR para chavear a etapa de retificação de uma fonte DC para manter a corrente constante sobre a lâmpada. Na Figura A2.8 é apresentado o esquema de controle de corrente constante.



Figura A2.8 Esquema de controle de corrente da fonte principal.

O controle é feito controlando o ângulo de disparo do SCR para recortar a porção da onda que é aplicada ao primário do transformador, passando mais ou menos energia ao secundário para manter a corrente media constante na lâmpada. Para fazer o controle de fase é utilizado um microcontrolador que recebe o sinal de passagem pelo zero da entrada e espera um tempo calculado em função do erro entre o valor medido da corrente e o valor desejado, para emitir um pulso que ativa a condução do SCR a maior o tempo esperado menor a porção transmitida.

Além da fonte principal foi acrescentada uma fonte não regulada de 380V (1A) e uma fonte de alta tensão para a ignição da lâmpada, ambas fabricadas com cascatas dobradoras de tensão.

A seguir o código do microcontrolador na linguagem Proton-Basic 3.5:

' Programa para controle de corrente alternada ou DC com triac ou SCR

<sup>&#</sup>x27; Por Sergio Lopera

' O programa é baseado no controle de fase de disparo de un triac ou SCR

' realimentado por um sinal ADC que pode representar tensão,

' corrente o potência.

' No projeto original o sinal de corrente entra por GPIO.0

' e outro sinal (Tensão da fonte) entra por GPIO.1.

' O primeiro sinal trata de ser mantido em 2,5V

' aumentando o diminuindo a fase de disparo.

' Os sinais AD são enviados serialmente 19200 Baudios

' para um possível módulo de display externo.

Device 12F675 DelayMS 500 Declare RSOUT\_PIN GPIO.5 Declare SERIAL\_BAUD 115200 ANSEL = %00000011 ' configuração de entradas ADC e CMCON= %00001111 ' comparadores dês-habilitados ADCON0 = %10000000 INTCON = %10001000 ' habilito interrupção por cambio em pino IOC= %00001000 ' seleciono o pino que gera a interrupção Input GPIO.3

Symbol dataout = GPIO.5 Symbol RELAYOUT=GPIO.4 Symbol triac = GPIO.2 Symbol plim = 8100 Symbol setpoint=512 Transmissão serial de valores ADC 0-1023 decimal string
acende a fonte de 380V e a de alta tensão
comuta o Triac (a traves do optotriac MOC3061)
limite de tempo de disparo 8200

' setpoint aproximadamente 2.5V

' Variáveis: Dim tosend As Byte Dim ptime As DWord Dim current As DWord Dim voltage As DWord Dim erro As DWord Dim cntr As Word

High RELAYOUT ' iniciar a lâmpada DelayMS 2000 ' calentar unos 2s cntr=0

On Interrupt GoTo dopulse ' a interrupção se produz com a passagem da onda pelo zero. ptime=0

forever:

current=ADIn 0 DelayUS 10 voltage=ADIn 1 DelayUS 10 GoTo forever ' Atualizar continuamente os valores AD

Disable

#### dopulse:

' aqui começa a rotina da interrupção para gerar pulsos

If voltage > 700 Then ptime= ptime-700+voltage Else ptime=ptime+erro EndIf ' Duplo controle por tempo e por limite de tensão.

If ptime>=plim Then ptime = plim If ptime<=1500 Then ptime=1500 Low triac ' seqüência de dois pulsos de 100us separados 200us DelayUS ptime ' parte positiva da onda High triac DelayUS 100 Low triac DelayUS 200 High triac DelayUS 100 Low triac If tosend="I" Then RSOut "I", current.LowByte, current.HighByte tosend="V" Else RSOut "V",voltage.LowByte,voltage.HighByte tosend="l" Endlf DelayUS 1000 ' seqüência de dos pulsos de 100us separados 200us High triac ' parte negativa da onda DelayUS 100

## Interfase de controle no PC

Foi criado um software em VisualBasic 6.0 para gerenciar os sistema de litografia composto por um módulo de tratamento de imagens, controles de posicionamento para os diferentes motores, e variáveis para configurar trabalhos de exposição em arranjos retangulares podendo mudar as condições de exposição e foco de cada frame projetado. Na Figura A2.9 é apresentada a interfase gráfica de usuário do software de litografia.



Figura A2.9 Interfase gráfica de usuário do sistema de litografia.

O programa comanda a inicialização dos componentes do sistema de litografia, acende o projetor, e permite colocar ou retirar o filtro e o semiespelho do caminho ótico. A interfase possui uma janela posicionada na área de trabalho estendida correspondente a uma segunda placa de vídeo instalada no PC conectada diretamente ao projetor, com o qual pode ser controlada a imagem projetada em todo momento pelo sistema.

Uma janela de configuração (Figura A2.10) permite carregar uma imagem em formato BMP que pode ser binária ou em escala de cinza e a converte em arranjos de matrizes segundo os parâmetros de número de tons escolhidos na interfase.

Mask Load	ck to load		
Fragment Mosaic   Image Size Repeats Scan Steps	800         ×         600           X         5         Y         5           X         250         Y         250	Exp Time 3000 s Latitud 0 um Half tone 2 Levels 100 Levels Comp. V Parameter Sweep TIME X 0 Y 0 Cancel Focus X 0 Y 0 Cancel	

Figura A2.10 Janela de definição da máscara a projetar.

Uma vez carregada a imagem a ser exposta pode ser configurada uma varredura X, Y repetindo a mesma imagem com incrementos constantes na posição dos motores de varredura definidos pelo usuário como número de passos e podem ser configurados também incrementos no tempo de exposição e na posição vertical da lente objetiva, para facilitar varreduras de exploração para achar os melhores parâmetros de trabalho do sistema para cada estrutura e fotorresiste utilizado. Na figura A2.11 é apresentada a janela de configuração da varredura.

Exp Time 3000 ms Latitud 0 um	Repeats X 5 Scan Steps X 25	Y         I           0         Y         250
Parameter Sweep	о ō ОК	Cancel

Figura A2.11 Janela de configuração da varredura.

## Sistema de varredura

Para o sistema de varredura foi utilizado uma mesa XY-Theta da *Kensington Laboratories* Modelo 6000 comandada por motores DC e realimentada com *encoders* óticos de sinal senoidal o qual foi re-aproveitado de um equipamento em desuso, mas do qual não se tinha nenhum *driver*. Foi desenvolvido um circuito microcontrolado para cada eixo do sistema XY, que recebe os sinais analógicos dos *encoders* e os interpola para calcular a posição absoluta do sistema e controlar via PWM a corrente e sentido do motor DC usando a ponte H de transistores L298.

O *encoder* ótico gera dois sinais senoidais defasados 90° entre eles (Seno e Cosseno) com período de 20  $\mu$ m, a partir dos quais pode ser interpolada a posição e sentido de deslocamento do sistema. Tipicamente este tipo de sinais são processadas em duas etapas, uma etapa de aproximação, passando os sinais por circuitos comparadores que geram uma versão digital das ondas para contagem rápida do número de períodos deslocados e uma interpolação fina para extrair o valor do arco tangente ou uma aproximação de esta função. Na Figura A2.12 são apresentados os tipos de sinais gerados a partir do *encoder* ótico.



Os sinais digitais que saem dos comparadores ativam circuitos de detecção de direção baseados em flip-flops que geram um pulso para cada período detectado em um determinado sentido.

No circuito desenvolvido os sinais dos *encoders* passam por um buffer e são capturados por entradas ADC do microcontrolador ao tempo que são processadas com um detector de cruze por zero com *Smith-Trigger* e excitam um flip-flop de contagem em cada sentido. Na Figura A2.13 é apresentado o circuito esquemático do *driver* desenvolvido.



Figura A2.13 Circuito esquemático do driver desenvolvido para o sistema XY

A partir dos diferentes sinais extraídos dos *encoders* e considerando comandos recebidos via serial do computador e via analógica de um joystick o microcontrolador calcula os valores de modulação de largura de pulso (PWM) que devem ser enviados à ponte H para ajustar a posição do motor. Na Figura A2.14 é apresentado o layout da placa de circuito impresso projetada para o *driver* desenvolvido.



Figura A2.14 Desenho do circuito impresso para o driver de cada eixo do sistema XY

A seguir o código desenvolvido para o PIC que controla cada eixo:

Device 18F452 XTAL =4

Dim VAR1 As Byte

Declare CCP1\_PIN PORTC.2 'PWM OUT Dim INBUFFER[8] As Byte 'COMAND BUFFER Dim botao As Bit Dim sens As Word Dim integrals As DWord

Dim kp As DWord Dim ki As DWord Dim ad0in As DWord Dim bypass As Bit Dim ypidant As DWord Dim kinic As DWord Dim mvelocityant As DWord Dim mvelocityn As DWord Dim der As DWord Dim kp2 As DWord Dim ki2 As DWord Dim kd2 As DWord Dim inv As DWord Dim div As DWord Dim abspos As DWord Dim inv2 As Byte Dim kd As DWord Dim vlim As DWord Dim velcom As DWord Dim mpositiont As DWord Dim velact As DWord Dim accel As DWord Dim pos As DWord Dim integral As DWord Dim mvelocity As DWord Dim countpos As Byte Dim antpos As DWord Dim UpCount1 As DWord Dim DnCount1 As DWord Dim upcount As Word Dim dncount As Word Dim position As DWord Dim mposition As DWord Dim fposition As DWord Dim u0 As DWord Dim ypid As DWord Dim poserror As DWord Dim u1 As DWord Dim bpwm As DWord Dim cpwm As Byte Dim fase As Bit Dim neg move As Bit Dim move in progress As Bit Dim saturado As Bit Dim proxmais As DWord Dim proxmenos As DWord Dim velim As DWord Dim flatcount As DWord Dim mode As Byte Dim ypwm As DWord Dim command As Byte 'SERIAL COMMAND Dim indata As Byte Dim PWMV As Byte Dim pwmval As DWord Dim freg As Word Dim freg2 As Word Dim DATOS\_1[8] As Byte Dim inpbuf[8] As Byte Dim antpos2 As DWord Dim countpos2 As DWord Dim i As Byte

Dim kpi As DWord Dim kdi As DWord Dim kii As DWord Dim phase1dist As DWord Dim ud As DWord Dim timer1 As TMR1L.Word Dim TEMO As DWord Dim kr As DWord Dim s As Byte Dim direcao As Bit Dim cposition As DWord Dim Ad As Bit Dim Bd As Bit Dim A As DWord Dim B As DWord Dim npos As DWord Dim mposition2 As DWord Declare ADIN RES 10 10-bit result required Declare ADIN TAD FRC 'RC OSC chosen Declare ADIN STIME 50 Symbol Aan = 0 Symbol Ban = 3 Symbol joystick=1 Symbol Adig = PORTD.0 Symbol Bdig = PORTC.1 Symbol sense= PORTB.0 Symbol GIE = INTCON.7 Symbol TMR1IF = PIR1.0 Symbol index = PORTD.1 Symbol DATA\_OUT=PORTC.6 Symbol DATA\_IN=PORTC.7 SerOut DATA\_OUT, 84,[13, 10, " Ready "] ' void InitVars i=0 kp=50 ki=2 kd=650 kr=0 s=0 kp2 = 200ki2=30 kd2=0 der =0 countpos2= 0 antpos2 =0 kinic = 0 pos = 0countpos =0 bypass =0

antpos=0

abspos=0 vlim=70

velcom=0

velact=0 accel=10 'maximum pwm val

sens =1 freg= 400 u1=0 u0=0 GoSub ZERAR mode=10 Str inpbuf ="######### ' InitPorts While GIE=1 : GIE=0 : Wend 'desabilito interrupções TRISA=%11111111 ADCON1= %10000100 TOCON = %10101000T1CON = %10000001 T3CON = %00000111CCP1CON = %00001111 INTCON = %11000000 PIE1 = %00000001 'Enable tmr1 interrupt **PIR1=0** Input index TMR0H=0 TMR0L=0 TMR3H=0 TMR3L=0 GIE=1 GoSub centralizar On Interrupt GoTo servoISR MAIN: SerIn DATA\_IN,84,1,MAIN,[indata] 'SerOut DATA\_OUT,84,[indata] Select indata Case "T" If mode=0 Then mode=10 Else mode=0 Endlf Case "Q" inpbuf[0]="Z" GoSub DoCommand Case 13 GoSub DoCommand Case Else inpbuf[i]=indata i=i+1 If i>7 Then Str inpbuf ="00000000" i=0 Endlf EndSelect

### GoTo MAIN

DoCommand: 'SerOut DATA\_OUT,84,[Str inpbuf] i=0 Select inpbuf[0] Case "A" 'SET ACCEL PARAMETER accel=Val(inpbuf,Dec) Case "a" SerOut DATA\_OUT,84,[" accel=",Dec accel] Case "D" 'SET Kd PARAMETER kd=Val(inpbuf,Dec) Case "d" kd2=Val(inpbuf,Dec) Case "F" 'SET FREQUENCY freq=Val(inpbuf,Dec) Case "f" 'GET FREQUENCY SerOut DATA\_OUT,84,["freq= ", Dec freq] Case "I" 'SET Ki PARAMETER ki=Val(inpbuf,Dec) Case "i" 'SET Ki2 PARAMETER ki2=Val(inpbuf,Dec) Case "K" Case "L" sens=Val(inpbuf,Dec) Case "I" SerOut DATA\_OUT,84,[" sensibilidade do joystick = ",Dec sens, 13, 10] Case "M" 'MOVE TO X ABSOLUTE POSITION HPWM 1,0,freq 'DETER O MOTOR If move\_in\_progress = 0 Then phase1dist = Val(inpbuf,Dec) 'QUANTIDADE A MEXER EM MM phase1dist = phase1dist\*100 If inpbuf[1] = "-" Then neg move =1 SerOut DATA\_OUT,84,[" neg\_move ",13,10] Endlf fposition= phase1dist If phase1dist < 0 Then neg\_move =1 phase1dist = phase1dist \*-1 Else nea move=0 Endlf SerOut DATA\_OUT,84,["movendo ",Dec fposition] phase1dist= phase1dist/2 flatcount= 0 fase=0 move\_in\_progress=1 kpi = kp

kdi= kd kii =ki mode= 1 TMR0H=0 TMR0L=0 TMR3H=0 TMR3L=0 Endlf Case "P" 'SET Kd PARAMETER kp=Val(inpbuf,Dec) Case "p" kp2=Val(inpbuf,Dec) Case "R" kp=". SerOut DATA\_OUT,84,[13,10," Dec kp,13,10," ki=", Dec ki,13,10," kd=", Dec kd,13,10] SerOut DATA OUT,84,[13,13,10," kp2=", Dec kp2,13,10," ki2=", Dec ki2,13,10," kd2=", Dec kd2.13.101 Case "S" pos=0 GoTo centralizar Case "T" SerOut DATA\_OUT,84,[" Pass "] Case "V" 'SET ACCEL PARAMETER vlim=Val(inpbuf,Dec) vlim=vlim\*100000 Case "v" vlim=vlim/100000 SerOut DATA\_OUT,84,[" vlim=",Dec vlim] vlim=vlim\*100000 'RELATIVE MOVE COMMAND Case "X" (VERIFICAR) HPWM 1,0,freq If move\_in\_progress = 0 Then phase1dist = Val(inpbuf,Dec) phase1dist = phase1dist\*100 If inpbuf[1] = "-" Then If pos < 0 Then If Abs pos < phase1dist Then abspos = Abs pos neg\_move=0 fposition = phase1dist - abspos SerOut DATA\_OUT,84,[" pos<TOGO "] Else neg\_move =1 abspos = Abs pos fposition =(abspos - phase1dist)\*-1 SerOut DATA OUT,84,[" pos>TOGO"] Endlf Else fposition = pos + phase1dist 'EXTRANHO fposition = fposition \*-1 neg\_move=1

SerOut DATA\_OUT,84,[" pos>0, fpos=", SDEC fposition, 13, 10] Endlf Else If pos<0 Then fposition = phase1dist + (Abs pos) neg\_move =0 SerOut DATA OUT,84,["else inpbuf, pos<0"] Else If pos > phase1dist Then fposition = (pos -phase1dist)\*-1 neg move =1 SerOut DATA\_OUT,84,[" pos > phase1dist"] Else fposition = phase1dist -pos neg move=0 SerOut DATA\_OUT,84,[" pos> phase1dist 2 else"1 Endlf Endlf Endlf phase1dist= fposition/2 flatcount= 0 fase =0 move\_in\_progress=1 kinic = kp SerOut DATA\_OUT,84,["movendo",Dec fposition, 13, 10] mode= 1 Endlf Case "Z" HPWM 1,0,freg 'DETER O MOTOR GoSub ZERAR Case Else EndSelect Str inpbuf ="########" Return ZERAR: move\_in\_progress=0 mode=10 upcount=0 dncount=0 UpCount1=0 DnCount1=0 TMR0H = 0TMR0L = 0TMR3H = 0TMR3L =0 neq move = 0fase= 0 integral=0 mvelocity=0 mposition=0

mpositiont=0

position=0 fposition=position cposition = 0ypwm = 0; Return centralizar: If index = 0 Then While index = 0Low sense HPWM 1,100,freg Wend While index = 1 High sense HPWM 1,50,freq Wend HPWM 1,0,freq GoTo MAIN Else While index = 1 High sense HPWM 1,100,freq Wend While index = 0 Low sense HPWM 1,50,freq Wend HPWM 1,0,freq Endlf GoSub ZERAR mvelocityant =0 Return Disable servoISR: mvelocityant = DnCount1 - UpCount1 upcount.HighByte= TMR0H upcount.LowByte=TMR0L dncount.HighByte=TMR3H dncount.LowByte=TMR3L DnCount1 = dncount

UpCount1 = upcount mvelocity = DnCount1 - UpCount1 mvelocityn = mvelocity-mvelocityant mpositiont = mpositiont + mvelocityn mposition2= mpositiont\*4000

TEMO=mposition2/100 SerOut DATA\_OUT,84,[SDEC DnCount1,"-",Dec UpCount1," P", SDEC TEMO, 13, 10] Ad= Adig DelayUS 1 Bd= Bdig A = ADIn Aan DelayUS 1 B = ADIn Ban A = A - 470 'EXTRANHO B = B - 470 SerOut DATA\_OUT,84,[" a/b= ", SDEC A,"/",SDEC B, 13,10] div=0 If Ad = Bd Then div = A+ B B= B\*1000 npos = B/div If Ad= 0 And Bd = 0 Then npos = 2000-npos '3000 Else npos = 4000-npos '1000 Endlf Else div = B - A A = A\*1000 npos = A/div If Ad = 0 Then npos = 1000+ npos ' 4000 Else npos = 3000+ npos ' 2000 Endlf Endlf mposition = mposition2 + npos PIR1=0 PIE=1 PIE1=1 Resume 'Return to main program

Enable

# **ANEXO 4.** PROTOCOLOS E PROCESSOS BIOQUÍMICOS UTILIZADOS.

Protocolo para a suspensão de esporos de streptomyces Coelicolor

Por Klas Flärdh klas.flardh@cob.lu.se

1. Pick a single colony and streak on an SFM plate to obtain a confluent lawn of mycelium. Incubate at  $30^{\circ}$ C 4-6 days until there is abundant sporulation (i.e. a grey "powdery" surface of the mycelium).

2. Pour 10 ml sterile water on the plate. Re-suspend as many spores as possible by gently rubbing the surface with a sterile cotton bud (or possibly inoculation loop). Avoid disrupting the "mycelium" and getting pieces of agar medium into your suspension.

3. Pour into a glass vial or tube. Vortex violently for a minute or so.

4. Pour into "filter syringe" (see below), and push the suspension through the cotton plug into a centrifuge tube. (It was used a 60um plastic filter instead of the cotton).

- 5. Spin in a tabletop centrifuge 3000 rpm, 10 min.
- 6. Pour off supernatant and re-suspend spores in 1ml 20% glycerol.
- 7. Spores can now be stored frozen at -80°C.

## Protocolo para preparação de esferoplastos (por Lars Renner)

Materials:

Modified Luria-Bertani medium 10g/L tryptone, 5g/L yeast extract; 5g/L NaCl

Modified LB medium with Cephalexin final conc. 60mg/mL Cephalexin

1 M sucrose

1 M Tris-HCl adjust pH to 8.0

0.5mg/mL lysozyme solution

5mg/mL DNase

125mM EDTA solution adjusted to pH 8.0 with NaOH

Stop Solution 10mM Tris-HCl (pH 8), 0.7M sucrose, 20mM MgCl2

1. Prepare stock and working solutions;

2. Grow E coli strain from single colony overnight and prepare a fresh culture (2mL) diluting 1:100 or

1:50 in modified LB medium incubating at 37±C with 200 rpm to an OD of 0.6{0.7;

3. Dilute fresh culture 1:10 at required OD in 4.5 mL of pre-warmed modi<sup>-</sup>ed LBmedium containing 60mg/mL Cephalexin;

4. Incubate culture at  $37\pm C$  ( $30\pm C$  if °uorescent proteins are present) with 200 rpm for 2 to 4 h to grow E coli into filamentous cell type (growth time determines size of the spheroplast)

5. After the required incubation 1mL of the cell suspensions is harvested and centrifuged at 3,000g for 1 to 2min in a 1.5mL Eppendorf tube;

6. The pellet is carefully resuspended with 500mL of 0.8M sucrose by inverting the test tube;

7. Add subsequently: 30mL of 1M Tris-HCl (pH 8.0), 24mL of 0.5mg/mL lysozyme (»20mg/mL

final conc.), 6mL of 5mg/mL DNase (»50mg/mL final conc.), 6mL of 125mM EDTA-NaOH

(pH 8.0) (»1.3mM <sup>-</sup>nal conc.), and mix immediately in between the additions;

8. Incubate for 5-10min at RT;

9. Add 100mL Stop Solution to terminate digestion;

10. Either use spheroplasts directly or freeze aliquotes to  $-80\pm$ C; for re-use slowly thaw aliquots solutions on ice.

## 8 REFERENCIAS

ABATE A.R.; LEE D.; DO T.; HOLTZE C., WEITZ D.A. **Glass coating for PDMS microfluidic channels by sol-gel methods** Lab Chip, 8, p 516–518, 2008.

ABATE A. R. ; WEITZ D. A. **Faster multiple emulsification with drop splitting.** Lab Chip, 11, p 1911-1915, 2011.

ABATE A. R.; HUNG T.; MARY P.; AGRESTI J. J.; WEITZ D. A. **High-throughput** injection with microfluidics using picoinjectors PNAS 107, p 19163-19166, 2010.

AGRESTI J.J.; ANTIPOV E.; ABATE A. R.; AHN K.; ROWAT A. C.; BARET J.C.; MARQUEZ M.; KLIBANOV A. M.; GRIFFITHS A. D.; WEITZ D.A. Ultrahighthroughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution PNAS 107(9), p 4004-4009, 2010.

ANDERSON J. R. et al. Fabrication of Topologically Complex Three-Dimensional Microfluidic Systems in PDMS by Rapid Prototyping Anal. Chem. 72, p 3158-3164, 2000.

AUMILLER, G. D. et al. Submicrometer resolution replication of relief patterns for integrated optics. J. Appl. Phys. 45 issue 10, p 4557–4562, 1974.

BALAGADDÉ F. K. Microfluidic technologies for continuous culture and genetic circuit characterization PhD Thesis California Institute Of Technology, 2007.

BHAT S et al. Single molecule detection in nanofluidic digital array enables accurate measurement of DNA copy number. Anal Bioanal Chem 394 p457–467, 2009.

BHATTACHARYA S. et al. Studies on Surface Wettability of Poly(Dimethyl) Siloxane (PDMS) and Glass Under Oxygen-Plasma Treatment and Correlation With Bond Strength Journal of Microelectromechanical Systems, Vol. 14, No. 3, 2005.

BRYZEK, J. Impact of MEMS Technology on Society, Sensors And Actuators A56. p1-9, 1996.

CHANG-YEN D. A.; EICH R. K, GAL B. K. A Monolithic PDMS Waveguide System Fabricated Using Soft-Lithography Techniques Journal of Lightwave Technology, Vol. 23, No 6, 2005.

CHOI S.; SONG S.; CHOI C, PARK J.K. Hydrophoretic Sorting of Micrometer and Submicrometer Particles Using Anisotropic Microfluidic Obstacles, Anal. Chem. 81, p50–55, 2009

CHRISTEN J. B., ANDREOU A.G. **Design, Fabrication and Testing of a Hybrid CMOS/PDMS Microsystem for Cell Culture and Incubation**, IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems, Vol.1, No. 1, p. 2-14, 2007. DUFFY D.C, SCHUELLER O.J.A, BRITTAIN S.T., WHITESIDES G.M. Rapid prototyping of microfluidic switches in poly(dimethyl siloxane) and their actuation by electro-osmotic flow. J. Micromech. Microeng. 9 p. 211–217, 1999.

EBRAHIM GHAFAR-ZADEH, MOHAMAD SAWAN, DANIEL THERRIAULT, SUMITRA RAJAGOPALAN, VAMSY P. CHODAVARAPU A direct-write microfluidic fabrication process for CMOS-based Lab-on-Chip applications Microelectronic Engineering 86 p 2104–2109, 2009.

EDDINGS M. A.; JOHNSON M. A., GALE B.K. Determining the optimal PDMS– PDMS bonding technique for microfluidic devices. J. Micromech. Microeng. 18, 2008.

FAIR.R. B. **Digital microfluidics: is a true lab-on-a-chip possible?** Microfluid Nanofluid 3 p.245–281, 2007.

FU A. Y.; SPENCE C.; SCHERER A.; ARNOLD F.H., QUAKE S.R. A microfabricated fluorescence-activated cell sorter. Nature Biotechnology Vol 17 November p 1109-1111, 1999.

HANSEN C L.; SKORDALAKES E., BERGER J.M., QUAKE S.R. A robust and scalable microfluidic metering method that allows protein crystal growth by free interface diffusion; PNAS vol. no. p26. 2002.

HONG J.W, QUAKE S.R. Integrated nanoliter systems. Nature BioTechnol 21,10 p 1179–1183, 2003.

HOWLADER M.M.R., SATORU S., TADATOMO S. Room temperature wafer level glass/glass bonding. Sensors and Actuators A 127 p.31–36, 2006.

HUANG S.H.; TAN W.H.; TSENG F.G.; TAKEUCHI S. A monolithically threedimensional flow-focusing device for formation of single double emulsions in closed open microfluidic systems J. Micromech. Microeng. 16 p.2336–2344, 2006.

HUANG C.W.; LEE G.B. A microfluidic system for automatic cell culture. J. Micromech. Microeng. 17 p 1266-1274, 2007.

INGLIS D. W.; DAVIS J. A.; ZIEZIULEWICZ T. J.; LAWRENCE D. A.; AUSTIN R. H., STURM J.C. **Determining blood cell size using microfluidic hydrodynamics** Journal of Immunological Methods 329 p 151–156, 2008.

ISSA A. BRABAZON D., HASHMI M.S.J. **3D transient thermal modelling of laser microchannel fabrication in lime-soda glass**, Journal of materials processing technology 207 p 307–314, 2008.

JO B.H., L.M. Van Lerberghe, Kathleen M. Motsegood, and David J. Beebe. Three-Dimensional Micro-Channel Fabrication in Polydimethylsiloxane (PDMS) Elastomer Journal Of Microelectromechanical Systems, VOL. 9, NO. 1, 2000 KEEA J. S., et al. Monolithic integration of poly(dimethylsiloxane) waveguides and microfluidics for on-chip absorbance measurements. Sensors and Actuators B 134 p 532–538, 2008.

KHANAFER K., DUPREY A., SCHLICHT M.; BERGUER R. Effects of strain rate, mixing ratio, and stress-strain definition on the mechanical behavior of the polydimethylsiloxane (PDMS) material as related to its biological applications. Biomed Microdevices 11 p 503–508, 2009.

KIM J.H.; NA K.H.; KANG C.J.; JEON D.; KIM Y.S. A disposable thermopneumatic-actuated microvalve stacked with PDMS layers and ITO-coated glass. Microelectronic Engineering 73–74 p 864–869, 2004.

KO Wen H., **Trends and frontiers of MEMS: Review**. Sensors and Actuators A 136, p 62-67, 2007

KURITAA R. et al. Microfluidic device integrated with pre-reactor and dual enzyme-modified microelectrodes for monitoring in vivo glucose and lactate. Sensors and Actuators B 87 p 296–303, 2002.

LEE, J.N.; PARK, C.; WHITESIDES, G.M. Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices Anal. Chem. 75, p 6544-6554, 2003.

LIN C.H., LEE G.B., Micromachined flow cytometers with embedded etched optic fibers for optical detection. J. Micromech. Microeng. 13 p 447–453, 2003.

LINGXIN C. et al. **Bonding of glass-based microfluidic chips at low- or roomtemperature in routine laboratory** Sensors and Actuators B 119 p 335–344, 2006.

LIU, X., MWANGI.M., LI.X., O'BRIEN.M. AND WHITESIDES.G.M. **Paper-Based Piezoresistive MEMS Sensors** Lab on a Chip, 11, p 2189-2196, 2011.

LIU C. C.; Cui D. F. **Design and fabrication of poly(dimethylsiloxane)** electrophoresis microchip with integrated electrodes Microsyst Technol 11 p 1262– 1266, 2005.

LUAN Lin, et al. **Integrated Optical Sensor in a Digital Microfluidic** Platform IEEE SENSORS JOURNAL, VOL. 8, NO. 5, 2008.

LUCAS N.; DEMMING S.; JORDAN A.; SICHLER P.; BÜTTGENBACH S. An improved method for double-sided moulding of PDMS J. Micromech. Microeng. 18, 2008.

MCDONALD J. C.; CHABINYC M. L.; METALLO S. J.; ANDERSON J. R.; STROOCK A. D.; WHITESIDES G. M. Prototyping of Microfluidic Devices in Poly(dimethylsiloxane) Using Solid-Object Printing Anal. Chem. 74, p 1537-1545, 2002.

MCDONALD J. C. DUFFY D. C., ANDERSON J. R. CHIU D.T, WU H., SCHELLET O.J.A., WHITESIDES G.M. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane), Electrophoresis 21 p 27-40, 2000.

MANDRUSOV E.; HOUNG A.; KLEIN E., LEONARD E.F. Membrane-based cell affinity chromatography to retrieve viable cells Biotechnol. Prog. 11 (2), p 208–213, 1995.

MANZ A.; GRABER N.; WIDMER H.M. Miniaturized total chemistry analysis systems: a novel concept for chemical sensing. Sensors Actuators B 1: p 244-248, 1990.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WILEY, B. J.; GUPTA, M, WHITESIDES, G. M., **FLASH: a rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices,** Lab Chip, 8, p 2146-2150, 2008.

MASUDA, S. et al. Novel Method of cell fusion in field constriction area in fluidintegration circuit IEEE Trans. Indus. App. 25, p 732–737, 1989.

MATA ALVARO, FLEISCHMAN AARON J. E ROY SHUVO, **Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro/Nanosystems** Biomedical Microdevices 7:4 p 281–293, 2005.

NIU XIZE, PENG SUILI, LIU LIYU, WEN WEIJIA, AND SHENG PING **Characterizing and Patterning of PDMS-Based Conducting Composites.** Adv. Mater. 19 p 2682–2686, 2007.

PETERSEN, K. E. Silicon as a mechanical material. IEEE, Proceedings, vol. 70 p. 420-457, 1982.

RODRIGUEZ INDALESIO, PAOLO SPICAR-MIHALIC, CHRISTOPHER L. KUYPER,GINA S. FIORINI, DANIEL T. CHIU. **Rapid prototyping of glass microchannel.** Analytica Chimica Acta 496 p 205–215, 2003.

ROMAN GT, HLAUS T, BASS K.J ET AL. Sol-gel modified poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices with high electroosmotic mobilities and hydrophilic channel wall characteristics. Anal Chem 77 p 1414–1422, 2005.

THANGAWNG A.L; RUOFF R.S.; SWARTZ M. A; GLUCKSBERG M. R. An ultrathin PDMS membrane as a bio/micro-nano interface: fabrication and characterization. Biomed Microdevices 9: p 587–595, 2007.

TERRY, S.C; JERMAN, J.H; ANGELL, J.B. A gas chromatographic air analyser fabricated on a silicon wafer, IEEE Trans Electron. Dev. ED-26 p 1880–1886, 1979.

THIES W.; URBANSKI J.P.; THORSEN T.; AMARASINGHE S. Abstraction layers for scalable microfluidic biocomputing. Nat Comput. 7 p 255–275, 2008.

TSAO C.W.; DeVoe D. L. **Bonding of thermoplastic polymer microfluidics.** Microfluid Nanofluid, 6 p 1–16, 2009.

UNGER M.A., Chou H.P., Thorsen T., Scherer A., Quake S.R.. Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography, SCIENCE VOL 288 7 p 113-116, 2000.

VALERO A. et al. Gene transfer and protein dynamics in stem cells using single cell electroporation in a microfluidic device. Lab Chip, 8 p 62–67, 2008.

YAMAGUCHIA Y.; Development of a poly-dimethylsiloxane microfluidic device for single cell isolation and incubation Sensors and Actuators B 136 p 555–561, 2009.

YUN D.J; SEO T.I.; PARK D. S. Fabrication of Biochips with Micro Fluidic Channels by Micro End-milling and Powder Blasting, Sensors, 8 p 1308-1320, 2008.

WANG K.; MARSHALL M. K.; GARZA G., PAPPAS D. **Open-Tubular Capillary Cell Affinity Chromatography: Single and Tandem Blood Cell Separation** Anal. Chem. 80, p 2118-2124, 2008.

WANG Z.; KIM M.C.; MARQUEZ M.; THORSEN T. High-density microfluidic arrays for cell cytotoxicity analysis Lab Chip, 7 p 740–745, 2007.

WONG I; HO C.M. Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices Microfluid Nanofluidics. September 1; 7(3): p291–306, 2009.

ZHANG C.; XING D.; LI Y. Micropumps, microvalves, and micromixers within PCR microfluidic chips: Advances and trends; Biotechnology Advances 25 p 483–514, 2007.

ZHAO Y.; SHUM H. C.; CHEN H.; ADAMS L. L.; GU Z., WEITZ D. A. Microfluidic generation of multifunctional quantum dot barcode particles Journal of the American Chemical Society, Article ASAP, 2011.

ZHOU J.; ELLIS A.V.; VOELCKER N.H. Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices. Electrophoresis. Jan; 31(1): p 2-16, 2010.