

**Produção de micropartículas deformáveis para o
desenvolvimento de análogos: análise reológica e cálculo do
índice de deformação**

Cláudia Filipa Anes

Dissertação apresentada à
Escola Superior de Tecnologia e Gestão
Instituto Politécnico de Bragança

para obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia Biomédica

Julho de 2017



**Produção de micropartículas deformáveis para o
desenvolvimento de análogos: análise reológica e cálculo do
índice de deformação**

Cláudia Filipa Anes

Dissertação apresentada à
**Escola Superior de Tecnologia e Gestão
Instituto Politécnico de Bragança**

para obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia Biomédica

Este trabalho foi efetuado sob orientação de:

Dra. Ana Isabel Pereira (IPB)

Dr. Emílio J. Veja (UEX)

Julho de 2017

“If I have seen further it is by standing on the shoulders of Giants”

Isaac Newton

Agradecimentos

Quero agradecer a todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante o tempo de realização deste projeto, as quais me ajudaram e me incentivaram. Em especial:

ao professor Doutor Emílio J. Veja Rodríguez da Escola de Engenharias Industriais da Universidade da Extremadura, co-orientador da minha tese, obrigada pela disponibilidade, acompanhamento e apoio incondicional;

à professora Doutora Ana Isabel Pereira, da Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Bragança, orientadora principal da minha tese, pela disponibilidade;

ao professor Doutor José Maria Montanero, ao investigador Alberto Ponce-Torres da Escola de Engenharias Industriais da Universidade da Extremadura, e à investigadora Beatriz N. Muñoz-Sánchez, da Universidade de Sevilha, pelas sugestões e apoio prestado.

Quero agradecer também, à mestre Diana Pinho, da Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Bragança, pela paciência, disponibilidade, ajuda e acompanhamento incansável que sempre me prestou.

Agradeço ainda, e de maneira ainda mais especial e emotiva, aos meus pais e ao meu irmão pela paciência e força que me deram, sem eles nada disto seria possível.

Não esquecendo os meus amigos, obrigada pela paciência que tiveram comigo.

Por fim, quero agradecer a oportunidade de ter feito Erasmus e de me ter sido possível a utilização dos laboratórios, quer em Badajoz – UEx, quer em Bragança – IPB.

Resumo

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do mestrado em Tecnologia Biomédica e é essencialmente de natureza experimental, tendo como principal objetivo a produção de micropartículas deformáveis em polidimetilsiloxano (PDMS), capazes de simular o comportamento mecânico dos glóbulos vermelhos (GVs). A técnica utilizada para a produção das partículas foi a focagem de fluxo na qual é formado um jato de PDMS dentro de um capilar de vidro, quebrando-se em microgotas de PDMS as quais são curadas para se obter micropartículas sólidas. Esta técnica já foi usada anteriormente por Muñoz-Sánchez, *et al.* 2016 demonstrando a sua viabilidade na produção de partículas com dimensões abaixo de 10 μm . Neste trabalho utilizou-se a mesma técnica e efetuou-se um estudo intensivo sobre a redução do tamanho das microgotas produzidas aquando da passagem do estado líquido para sólido – coeficiente de redução de tamanho. O estudo foi efetuado para vários rácios de PDMS. Foram, ainda, introduzidos corantes para atribuir cor às micropartículas produzidas e facilitar a sua visualização no sistema de microscopia, efetuando-se também o estudo do coeficiente de redução de tamanho para as partículas produzidas com PDMS corado (corante vermelho) e PDMS cinzento.

Por fim, e não menos importante, as micropartículas produzidas, foram suspensas em Dextrano 40 (Dx 40) para se poder analisar a sua capacidade de deformação aquando da passagem por um microcanal com contração hiperbólica de dimensão 12 μm . Os resultados do índice de deformação (ID) foram comparados com o ID de GV's a escoarem no mesmo microcanal. Foi ainda obtida a curva de viscosidade das suspensões das micropartículas a 22° C e de igual forma comparadas com a curva de viscosidade obtida para 5 % de GV's suspensos também em Dx 40.

Este trabalho possibilitou, pela primeira vez, tirar conclusões sobre o coeficiente de redução das partículas de PDMS após a cura, ajudando assim, a entender melhor o processo de fabricação. Foi ainda possível estudar as propriedades de deformação e reológicas das suspensões das micropartículas produzidas. Com os resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que as micropartículas produzidas têm uma grande

potencialidade para desenvolver fluidos análogos do sangue, pois obtivemos valores de ID próximos dos GVs e curvas de viscosidade similares às suspensões de GVs em Dx 40.

Palavras-chave: técnica de focagem de fluxo, produção de micropartículas, coeficiente de redução de tamanho, índice de deformação, escoamento em microcanais, viscosidade.

Abstract

This work was developed under the master's degree in Biomedical Technology and is essentially an experimental work, having as main objective the production of polydimethylsiloxane (PDMS) deformable microparticles able to mimic the mechanical behavior of human red blood cells (RBCs). The technique used for the production of the particles was the flow focusing technique in which a PDMS jet is formed inside a glass capillary, breaking into PDMS microdroplets which are cured to obtain solid microparticles. This technique was previously used by Muñoz-Sánchez, et al. 2016 and it was demonstrated ability to produce particles with dimensions below 10 μm . In this work the same technique was used and a detailed study was carried out regarding the reduction of the size of the microdroplets produced during the transition from liquid to solid state – curing shrinkage coefficient. The study was carried out for several PDMS ratios. Dyes were also applied to introduce color into the microparticles and to improve their visualization in the microscopic system. In addition, the study of the curing shrinkage coefficient for color particles was performed.

Last, but not least, the microparticles produced and dried were suspended in Dextran 40 (Dx 40) in order to analyze their deformability when passing through a microchannel with a hyperbolic contraction. The results of the particles deformability were compared to the deformation index of the RBCs flowing in the same microchannel. The viscosity curve of the microparticles suspensions was also obtained at 22 ° C and compared with viscosity curve obtained for 5% of RBCs also suspended in Dx 40.

This work made possible, for the first time, to obtain results about the curing shrinkage coefficient of the PDMS particles, helping to improve our understanding regarding the production of PDMS microparticles. It was also possible to study the deformability and rheological properties of the microparticles suspensions. Hence, with the obtained results it was possible to conclude that the produced microparticles have the potential to improve the existent blood analogue fluids, since the obtained values of

deformation index of the particles were in close agreement with the RBCs deformability and the viscosity curves were similar to the suspensions of RBCs in Dx 40.

Keywords: flow focusing technique, microparticles production, curing shrinkage coefficient, deformation index, microchannel flow, viscosity.

Conteúdo

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract.....	xi
Conteúdo.....	xiii
Índice de figuras	xvii
Índice de tabelas	xxiii
Lista de abreviaturas	xxv
Capítulo 1	1
Introdução	1
1.1. Enquadramento e motivação	1
1.2. Objetivos do trabalho	2
1.3. Estrutura do relatório.....	2
Capítulo 2	5
Revisão da literatura	5
Capítulo 3	13
O sangue e as suas propriedades reológicas	13
3.1. O sangue.....	13
Glóbulos vermelhos.....	14
Glóbulos brancos	15
Plaquetas sanguíneas	15
Plasma sanguíneo	16
3.1.1. Vasos sanguíneos.....	17
Artérias	17

Veias	18
Capilares	18
3.2. Microcirculação.....	18
3.2.1. Efeito de Fahraeus-Lindqvist	19
3.2.2. Escoamento sanguíneo	20
3.3. Hemorreologia.....	22
3.3.1. Perfis de velocidade de escoamento em microcanais	23
3.3.2. Viscosidade do sangue.....	24
3.3.3. Deformação dos glóbulos vermelhos	26
3.4. Reometria	26
3.4.1. Reometria de corte.....	26
Lei de Newton da viscosidade	27
Geometrias de reometria.....	28
Capítulo 4	31
Produção de partículas de PDMS	31
4.1. Procedimento experimental para a obtenção das partículas.....	31
4.1.1. Setup para a produção de partículas de PDMS	31
4.1.2. Materiais e métodos.....	34
Produção de partículas em PDMS	34
Produção de partículas de cor	36
Processo de filtração das partículas de PDMS	38
4.2. Apresentação e discussão dos resultados	39
4.2.1. Análise da redução do tamanho das partículas de PDMS: variação do rácio	39
Rácio de [10:1]	40
Rácio de [8:2]	41
Rácio de [6:4]	42
Coeficiente de redução do tamanho das partículas com diferentes rácios	43
Gotas de maiores dimensões com rácio de [6:4]	44
Coeficiente de redução total das partículas produzidas com rácio de [6:4]	46
4.2.2. Testes efetuados com corantes/pigmentos.....	47
Partículas de PDMS produzidas com pigmento vermelho	49
Partículas produzidas com o PDMS cinzento	50
Capítulo 5	53

Microfabricação, escoamentos em microcanais e análise reológica das suspensões de partículas de PDMS	53
5.1. Procedimento experimental para escoamentos e análise reológica.....	53
5.1.1. Produção dos microcanais com PDMS	53
5.1.2 Produção do fluido de trabalho.....	56
5.1.3. Escoamento das partículas	56
5.1.4. Reologia.....	58
5.2. Índice de deformação e processamento de imagem	60
5.3. Apresentação e discussão dos resultados	62
5.3.1. Índice de deformação.....	62
Comparação com o ID obtido para glóbulos vermelhos humanos.....	65
Cálculo do número de Reynolds.....	66
5.3.2. Reologia.....	69
Curvas de viscosidade	69
Comparação com o sangue humano	69
5.3.3. Camada de plasma	70
Capítulo 6	73
Conclusões e trabalhos futuros	73
6.1. Conclusão	73
6.2. Trabalhos futuros.....	75
Referências	77
Anexo A.....	81
Anexo B.....	83
Anexo C.....	85
Anexo D.....	89

Índice de figuras

Figura 1 - Ilustração do processo para produzir microesferas de PDMS que podem ser usadas como sensores de oxigénio: a) geração microfluídica de gotas de PDMS por meio da técnica de focagem de fluxo num dispositivo microfluídico (PMMA); b) cura fora do chip das gotas de PDMS a 70° C; c) lavagem e colheita das micropartículas curadas; d) utilização destas microesferas para deteção de oxigénio (Jiang, et al. 2012).....	6
Figura 2 – Imagens SEM, à esquerda: capilar padrão e agulha; à direita: ponta da agulha utilizadas na técnica proposta por (Acero, et al. 2013; Muñoz-Sánchez, et al. 2016).....	7
Figura 3 - Representação do jato de PDMS formado na ponta da agulha e esquema da variação da posição Z da agulha (Muñoz-Sánchez, et al. 2016).	7
Figura 4 - Representação da camada de plasma num canal hiperbólico (Calejo 2013)...	8
Figura 5 - Etapas da xurografia para a microfabricação: 1) corte do molde do microcanal na película de vinil; 2) remoção da película excedente à volta do molde do microcanal; 3) colocação do papel de transferência (fita de remoção); 4) remoção do molde; 5) transferência do molde para o recipiente pretendido; 6) remoção do papel de transferência, ficando com o molde do microcanal colado ao recipiente o (Calejo 2013).	9
Figura 6 - Demonstração dos diferentes passos para a fabricação do molde dos microcanais por litografia suave (Novais, Pinho, et al. 2014).....	10
Figura 7 – Remoção e réplica do molde de PDMS (Tomaiuolo 2008).	10
Figura 8 - Representação de um vaso sanguíneo com os constituintes do sangue (Fidalgo 2010).....	13
Figura 9 - Glóbulos vermelhos (Orangesdms - Red Blood Cells - RG 2010).....	14
Figura 10 - Glóbulos brancos (Orangesdms - White Blood Cell - AB 2010).	15
Figura 11 - Plaquetas sanguíneas (George 2015).	16
Figura 12 - Demonstração da separação dos constituintes do sangue (Diário de Biologia 2010).....	16
Figura 13 - Representação de todos os tipos de vasos sanguíneos (Soares 2016).....	17

Figura 14 - Efeito Fahraeus-Lindqvist: variação da viscosidade com o diâmetro do capilar (Garcia, Dias e Lima 2012).	20
Figura 15 - Representação dos dois tipos de escoamento: A) escoamento laminar; B) escoamento turbulento (Soares 2016).....	21
Figura 16 - Diagrama esquemático da variação na pressão arterial e Re para as grandes artérias, capilares e veias (Lima, et al. 2012).	22
Figura 17 - Representação da variação da tensão de corte (τ) com a taxa de deformação (du/dy) para diferentes tipos de fluído (Msubbu 2014).	23
Figura 18 - Representação esquemática dos perfis de velocidade para glóbulos vermelhos em suspensões diluídas (<1% Hct) e concentradas (32% Hct). As velocidades locais ($u(r)$) são traçadas como proporções da velocidade da linha central (U_{avg}). R e r correspondem, respetivamente, ao raio do microcanal e à posição radial (r) a partir do eixo do canal (Lima, et al. 2012).	24
Figura 19 - Relação entre a taxa de deformação e a viscosidade para sangue normal (45% Hct) e o plasma (0% Hct) (Pinho e Lima 2016).	24
Figura 20 - Aglomerados de glóbulos vermelhos (Lopes 2012).	25
Figura 21 - Reómetro Bohlin Instruments CVO.	27
Figura 22 - Representação esquemática do escoamento de Couette entre duas placas paralelas (Santos 2009).	27
Figura 23 - Diferentes geometrias de cone-prato e prato paralelo.	29
Figura 24 - Representação da geometria cone-prato utilizada (Santos 2009).	29
Figura 25 - Representação esquemática de escoamentos secundários (Santos 2009). ...	30
Figura 26 - Representação esquemática do setup experimental: (A) agulha localizada no capilar de vidro; (B) sistemas de alta precisão de orientação-translação; (C) câmara digital; (D) lentes óticas; (E) fase triaxial de movimentação da câmara; (F) fibra ótica; (G) mesa ótica; (H) sistema pneumático de isolamento anti-vibração (Muñoz-Sánchez, et al. 2016).	32
Figura 27 - Capilar de vidro dentro da célula.	32
Figura 28 - Agulha hipodérmica.	33
Figura 29 – a) Bomba de injeção; b) bomba de sucção.	33
Figura 30 - Câmaras utilizadas para a captura das imagens das partículas.	34
Figura 31 - a) agulha hipodérmica (Becton Dickinson MICROLANCE 3 30G 1/2); b) fibra ótica.	34

Figura 32 - Material necessário para a preparação do PDMS: a) parte A (base); b) parte B (agente de cura); c) copo de plástico; d) espátula; e) balança; e do banho no qual o capilar de vidro é emergido: f) glicerina; g) surfactante Brij 30; h) goblé de vidro; i) agitador.	35
Figura 33 - Banho dentro da célula cobrindo o capilar de vidro.	36
Figura 34 - Partículas de PDMS no processo de cura a 70° / 80° C.	36
Figura 35 - Pigmento vermelho (PP SIL RO-1, Plastiform) utilizado para corar o PDMS; PDMS cinzento (Sylgard ® 170 silicone elastomer - Dow Corning).	37
Figura 36 - Demonstração da produção de partículas de cor, o qual é comum também na produção de partículas com PDMS normal: a) agulha inserida no capilar de vidro com o PDMS corado e visualização de um "fio" de gotas acumuladas no fundo do capilar; b) observação da nuvem de gotas cinzentas na seringa de sucção, as quais estão prontas para serem curadas.	38
Figura 37 - Capilar emergido em glicerina.	38
Figura 38 - Material utilizado na filtração das partículas: a) bomba de vácuo; b) filtros de fibra de vidro com poros de 1,2 µm; c) pinça; d) placas de Petri; e) água destilada; f) isopropanol.	39
Figura 39 - Representação dos valores da viscosidade para os diferentes rácios e para os PDMS corados.	40
Figura 40 - Resultados experimentais relativamente a gotas produzidas com PDMS com rácio de [10:1], com tamanho médio de: a) 7,37 µm; b) 11,16 µm; c) 21,54 µm, antes da cura.	41
Figura 41 - Resultados experimentais relativamente a gotas produzidas com PDMS com rácio de [8:2] com tamanho médio de; a) 7,89 µm; b) 10,60 µm; c) 20,30 µm, antes da cura.	42
Figura 42 - Representação dos resultados experimentais do fabrico de partículas antes e depois da cura, realizado com PDMS com rácio de [6:4] (Muñoz-Sánchez, et al. 2016).	43
Figura 43 - Coeficiente de redução de tamanho das partículas com diferentes rácios de produção, mostrando a linha de tendência da redução do tamanho, ou seja, $C_s = 103D_d$, com D_d a variar entre 0 µm e 30 µm.	44
Figura 44 - Resultados experimentais relativamente a partículas produzidas com PDMS com rácio de [6:4], com tamanho médio de: a) 32,42 µm e b) 56,23 µm, antes da cura.	45

Figura 45 - Coeficiente de redução do tamanho das partículas com rácio de [6:4], representando a linha de tendência de encolhimento para partículas de menor dimensão $C_s = 103Dd$, assim como a linha de tendência constante para as partículas de maior tamanho, que se situa nos 80 %.....	46
Figura 46 - Diferentes amostras obtidas após se misturar os corantes/pigmentos com o PDMS: corante alimentar (Dr. Oetker) (a) azul, (b) vermelho, (c) verde e (d) amarelo; (e) pigmento fluorescente rosa (pó solúvel em água de Rosa BTE. HISPACID B-250%, Robama); (f) pigmento azul (AZUL HISPALIT HL-HB PASTA – 170%, Robama); (g) pigmento branco (FINE WHITE 7006, Eastern Chemicals) e (h) pigmento vermelho para silicones (PP SIL RO-1, Plastiform).	47
Figura 47 - Imagens representativas das microestruturas resultantes da mistura dos corantes/pigmentos com o PDMS, obtidas através de um microscópio standard, após as amostras estarem curadas. Cada uma representa a amostra da Figura 46.	48
Figura 48 - Partículas fabricadas com (a) pigmento branco (FINE WHITE 7006, Eastern Chemicals), (b) pigmento vermelho para silicones (PP SIL RO-1, Plastiform) a 3 % wt e (c) com pigmento vermelho para silicones (PP SIL RO-1, Plastiform) a 20 % wt.	49
Figura 49 - Resultados experimentais relativamente a gotas produzidas com PDMS com rácio de [10:1] e com 20%, em massa, de corante vermelho PP SIL RO-1, Plastiform, com tamanho médio de 12,43 μm antes da cura.	49
Figura 50 - Partículas produzidas com o corante vermelho com 20 % em massa.	50
Figura 51 - Partículas produzidas com o PDMS Sylgard ® 170 silicone elastomer (Dow Corning): a) jato formado através da agulha hipodérmica durante o processo de fabrico; b) partículas formadas com diâmetro, aproximado, de 15 μm	51
Figura 52 - Coeficiente de redução do tamanho das partículas produzidas com o PDMS cinzento, representando também a linha de tendência de C_s	52
Figura 53 - Partículas produzidas com o PDMS cinzento.....	52
Figura 54 - Caixa de Petri com os moldes dos microcanais em destaque.	54
Figura 55 - Representação esquemática do microcanal com contração hiperbólica (profundidade de 15 μm) com as suas respetivas dimensões.	55
Figura 56 - a) Spin Coater; b) Exemplo de um dispositivo com os microcanais selado pela lamela de vidro.	55
Figura 57 - a) Balão de medição com a solução de Dextrano 40; b) Caixa de Petri com Dx 40 e as partículas.....	56

Figura 58 - Setup de visualização do escoamento do fluido: a) câmara de alta velocidade; b) bomba de seringa; c) microscópio invertido.	57
Figura 59 - Dispositivo dos microcanais colocado na platina do microscópio.	57
Figura 60 - Material para o estudo reológico: a) material de reometria; b) geometria cone.	58
Figura 61 - Temperatura a que os testes são realizados, 22° C, e respetiva geometria (Bohlin Software CVOD 100).	58
Figura 62 - Escolha dos parâmetros característicos para a medição da viscosidade (Bohlin Software CVOD 100).	59
Figura 63 - Prato do reómetro com a amostra a ser estudada.	59
Figura 64 - Demonstração dos eixos para o cálculo do ID e representação da possível forma que as partículas possam adquirir, respetivamente para cada valor de ID.	60
Figura 65 - Comandos do ImageJ que permitem ajustar a escala: Analyse>Set Scale. .	60
Figura 66 - Demonstração do cálculo do fundo das imagens do vídeo através do Z-Project.	61
Figura 67 - Subtração do fundo ao vídeo original: Process>Image Calculator.	61
Figura 68 - Microcanal hiperbólico: representação das zonas em estudo para o cálculo do índice de deformação.	62
Figura 69 - Comportamento previsto das partículas nas diferentes zonas do canal hiperbólico.	62
Figura 70 - Índice de deformação das partículas de todos os rácios estudados, inclusive, das partículas de cor, com um caudal de escoamento de: a) $Q = 5 \mu\text{L}/\text{min}$; b) $Q = 8 \mu\text{L}/\text{min}$; c) $Q = 10 \mu\text{L}/\text{min}$	63
Figura 71 - Exemplo da forma que as partículas produzidas com PDMS cinzento adquirem na zona 1 e zona 2 e 3, respetivamente.	64
Figura 72 - Índice de deformação para as partículas com rácio de [10:1] sem e com a adição do pigmento vermelho, com diferentes caudais de escoamento: a) $Q = 5 \mu\text{L}/\text{min}$; b) $Q = 8 \mu\text{L}/\text{min}$; c) $Q = 10 \mu\text{L}/\text{min}$	65
Figura 73 - Comparação entre os glóbulos vermelhos humanos e as partículas com rácio de [6:4], com velocidade de escoamento de: a) $Q = 5 \mu\text{L}/\text{min}$; b) $Q = 8 \mu\text{L}/\text{min}$; c) $Q = 10 \mu\text{L}/\text{min}$	66
Figura 74 - Comandos do ImageJ para ajustar o intervalo dos frames: Image>Properties.	67
Figura 75 - Representação do MTrackJ, o qual mede a velocidade das partículas.	67

Figura 76 - Representação da trajetória de duas partículas nas diferentes zonas: partícula 1 – cores vermelha, amarela e verde; partícula 2 – cores azul clara, azul escura e branca. Cada cor, em cada trajetória, representa cada zona.	68
Figura 77 - Representação da viscosidade do Dextrano 40 e de todas as partículas produzidas nos diferentes testes de variação de rácio, em função do shear rate, a 22° C.	69
Figura 78 - Comparação da viscosidade do Dextrano 40 com as partículas de todos os rácios e também com fluido com glóbulos vermelhos a 5%, a 22° C.	70
Figura 79 - Visualização da trajetória das partículas e da consequente formação da CLC.	71
Figura 80 - Representação da camada de plasma, em μm , a diferentes velocidades de escoamento.	72

Índice de tabelas

Tabela 1 - Dados das partículas com diferentes rácios: Dd - diâmetro antes da cura, Dp - diâmetro após a cura, Cs - coeficiente de redução do tamanho das partículas.....	44
Tabela 2 - Dimensões das partículas antes e depois da cura com tamanho de 30 μm e 50 μm , aproximadamente, e o seu coeficiente de redução respetivo, produzidas com rácio de [6:4].	47
Tabela 3 - Dados de comparação de partículas com tamanho médio de 11 μm , com rácio de [10:1], com e sem a utilização de corante PP SIL RO-1, Plastiform.....	50
Tabela 4 - Cálculo do número de Reynolds nas diferentes zonas com os diferentes caudais de escoamento.....	68

Lista de abreviaturas

CAD - *Computer Aided Design*

CLC - Camada livre de células

CP - Camada de Plasma

Cs - Coeficiente de encolhimento

cSt - centistoke

Dx 40 - Dextrano 40

D_d - Diâmetro da partícula antes da cura

D_p - Diâmetro d partícula depois da cura

GVs - Glóbulos Vermelhos

Hb - Hemoglobina

Hct - Hematócrito

ID - Índice de deformação

PDMS - Polidimetilsiloxano

PMMA - Polimetilmetacrilato

Re - número de *Reynolds*

rpm - Rotações por minuto

UV - Ultra-violeta

W/W - Percentagem em massa

ρ - Massa volúmica

$\dot{\gamma}$ - Taxa de deformação (*shear rate*)

τ - Tensão de corte (*shear stress*)

η - Viscosidade

ν - Viscosidade cinemática

Capítulo 1

Introdução

1.1. Enquadramento e motivação

O tema do presente trabalho com o título “Produção de partículas deformáveis para o desenvolvimento de análogos: análise reológica e cálculo do índice de deformação” está inserido no trabalho final de Mestrado em Tecnologia Biomédica, tendo como objetivo a obtenção do grau de mestre. Foi desenvolvido no Instituto Politécnico de Bragança e na Universidade de Extremadura, Espanha.

Na área da tecnologia biomédica a microfluídica tem um papel importante no desenvolvimento de várias atividades de investigação relacionadas com o estudo e análise do escoamento sanguíneo, para obtermos uma maior compreensão sobre o nosso sistema cardiovascular e em particular, patologias associadas. Estes estudos levaram também à necessidade de desenvolver novos dispositivos, sistemas em miniatura e novas aplicações relacionadas com o manuseamento de fluidos em microescala (Lee, et al. 2001). O desenvolvimento de fluidos análogos ao sangue é uma área interligada com o estudo do escoamento sanguíneo em microcanais e está a atrair a atenção de investigadores por todo o mundo, a fim de se conseguir mimetizar as características de escoamento das células e as propriedades reológicas do sangue humano.

Para ser possível obter um análogo capaz de reproduzir o comportamento total do sangue, o desenvolvimento de partículas deformáveis é de grande importância para se conseguir reproduzir os glóbulos vermelhos, pois são o elemento sanguíneo em maior quantidade na constituição do sangue e possuem grande influência nas propriedades não-Newtonianas. Têm também a importante função de trocas gasosas e nutrientes. Como tal neste trabalho efetuou-se um estudo sobre a produção de partículas de PDMS e a sua caracterização para possível utilização em futuros desenvolvimentos nos análogos ao sangue.

1.2. Objetivos do trabalho

O objetivo principal desta dissertação é a produção de partículas em polidimetilsiloxano (PDMS) capazes de mimetizarem as propriedades mecânicas dos glóbulos vermelhos humanos, nomeadamente, a deformação. A produção das partículas foi possível por intermédio do método da focagem de fluxo, fazendo-se variar as quantidades de base e agente de cura no processo de produção do PDMS, para se poder avaliar a melhor deformação apresentada pelas micropartículas.

Outro ponto importante neste estudo é a análise do escoamento das partículas em canais hiperbólicos, fabricados pela técnica da litografia suave, a fim de se obter o índice de deformação das mesmas, a diferentes rácios (base:agente de cura), possibilitando concluir quais as partículas com comportamento mais semelhante ao comportamento dos glóbulos vermelhos. Não menos importante, foi o estudo reológico das suspensões das partículas para se conseguir ter a perceção da sua viscosidade e se apresentavam ou não comportamento não-Newtoniano à semelhança de suspensões de eritrócitos.

Por fim, podendo considerar também um objetivo, e olhando às dificuldades de visualização das partículas aquando do seu escoamento nos microcanais, foram produzidas partículas coloridas, utilizando PDMS de cor cinzenta e também um corante específico para silicões.

1.3. Estrutura do relatório

Este trabalho está dividido em seis capítulos para proporcionar uma melhor compreensão dos objetivos propostos.

Neste primeiro capítulo é apresentada a motivação que levou à elaboração deste trabalho assim como uma pequena introdução ao tema de trabalho. É também descrita a estrutura do relatório.

No Capítulo 2 apresenta-se uma revisão da literatura, onde são referenciados os estudos mais recentes relacionados com os temas mais importantes para a realização deste trabalho, nomeadamente sobre a focagem de fluxo, o processo de fabrico dos microcanais e o desenvolvimento de análogos ao sangue.

No Capítulo 3 são abordados alguns conceitos teóricos sobre a reologia do sangue e as suas propriedades, nomeadamente, a sua viscosidade, deformação e o seu comportamento de escoamento em microcanais.

No Capítulo 4 está descrito todo o processo efetuado para a produção e filtração das partículas. São também apresentados os resultados experimentais da produção das partículas com os diferentes rácios e são explicados os diferentes testes realizados com corantes/pigmentos com o objetivo de corar o PDMS.

No Capítulo 5 é apresentado o escoamento das partículas e respectivos resultados, demonstrando todo o processo laboratorial, assim como os testes reológicos.

Para concluir, no Capítulo 6 são apresentadas todas as conclusões deste trabalho e sugeridos alguns temas como trabalhos futuros.

Capítulo 2

Revisão da literatura

O estudo do comportamento do escoamento sanguíneo através de microcanais é crucial para melhorar a compreensão sobre vários fenômenos fisiológicos e patológicos que possam ocorrer no sistema microcirculatório humano. No entanto, as dificuldades associadas ao uso de sangue *in vitro*, como o caso da coagulação e armazenamento de amostras, promoveram o interesse crescente em desenvolver fluidos com propriedades reológicas semelhantes ao sangue real, os chamados análogos do sangue. Idealmente, soluções com partículas flexíveis que imitem atributos-chave estruturais de glóbulos vermelhos (GVs), como o tamanho, a forma e as propriedades mecânicas, seriam excelentes candidatos para reproduzir os efeitos multifásicos do sangue (Pinho, Muñoz Sánchez, et al. 2016).

O polidimetilsiloxano (PDMS) é um elastómero inerte que serve como componente chave numa gama de lubrificantes, selantes e produtos médicos e é amplamente utilizado para o fabrico de sistemas microfluídicos utilizando técnicas como a litografia suave. É também um material atraente para a síntese de micropartículas por várias razões, os grupos de superfície de siloxano apresentados pelo PDMS podem servir como manipuladores químicos convenientes para a funcionalidade das partículas. Além disso, a elevada permeabilidade deste elastómero a vários solventes e gases permite que as micropartículas absorvam facilmente agentes selecionados do ambiente local e, deste modo, as partículas podem servir, também, como elementos de separação e de deteção (Jiang, et al. 2012). Assim, este elastómero tem sido utilizado para produzir microesferas de PDMS através de dispositivos microfluídicos. Jiang, *et al.* 2012 propuseram uma técnica de focagem de fluxo, onde um precursor de PDMS foi disperso em microgotas dentro de uma fase aquosa contínua, Figura 1 (Jiang, et al. 2012).

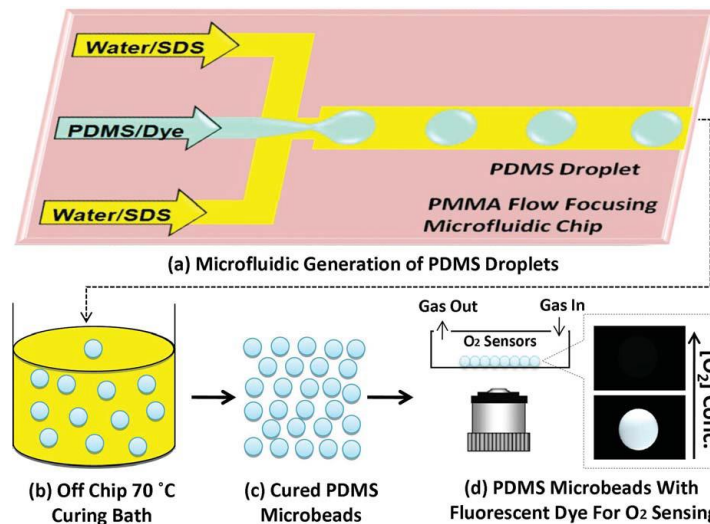


Figura 1 - Ilustração do processo para produzir microesferas de PDMS que podem ser usadas como sensores de oxigénio: a) geração microfluídica de gotas de PDMS por meio da técnica de focagem de fluxo num dispositivo microfluídico (PMMA); b) cura fora do chip das gotas de PDMS a 70° C; c) lavagem e colheita das micropartículas curadas; d) utilização destas microesferas para deteção de oxigénio (Jiang, et al. 2012).

Através deste método, o qual está representado na Figura 1, os autores conseguiram produzir micropartículas de PDMS de diâmetro médio de 80 μm para poderem ser utilizadas como sensores discretos de oxigénio.

Contudo, para desenvolver partículas com comportamento idêntico aos glóbulos vermelhos, é necessário produzir partículas com dimensões na ordem dos 6 μm a 10 μm .

Calejo, et al. 2016 usaram partículas rígidas de 6 μm suspensas num fluido viscoelástico para representar o comportamento do escoamento de glóbulos vermelhos ovinos, demonstrando assim a necessidade do desenvolvimento de microesferas deformáveis para uma representação mais aproximada do comportamento dos GVs em microcanais, como por exemplo a migração dos mesmos para o centro do dispositivo levando à formação de uma camada de plasma (camada livre de células) junto às paredes (Calejo, Pinho, et al. 2016; Pinho, et al. 2017).

Assim, Acero, et al. 2013 propuseram uma nova técnica de focagem de fluxo capaz de produzir partículas com dimensões mais pequenas e deformáveis. O capilar cilíndrico utilizado na clássica técnica de focagem de fluxo é substituído por uma agulha hipodérmica comum de dimensão similar (Figura 2). A agulha termina com uma ponta afiada através da qual o líquido injetado flui arrastado pela corrente externa criada por uma sucção. Desta forma, o menisco afunilado da configuração da focagem de fluxo padrão é substituído por um fluxo do tipo *Couette* direcionado pela ponta da agulha. Um

polímero líquido, neste caso PDMS, é ejetado pela ponta da agulha, que tem apenas alguns *microns* de tamanho (Acero, et al. 2013; Muñoz-Sánchez, et al. 2016).

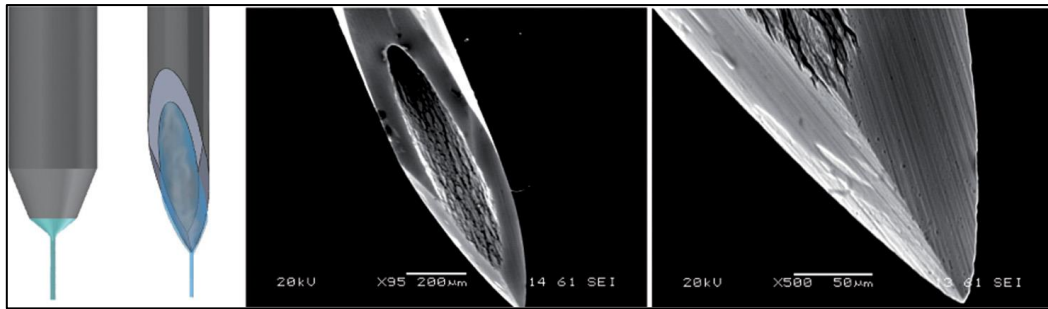


Figura 2 – Imagens SEM, à esquerda: capilar padrão e agulha; à direita: ponta da agulha utilizadas na técnica proposta por (Acero, et al. 2013; Muñoz-Sánchez, et al. 2016).

Através dos estudos feitos por Muñoz-Sánchez, et al. 2016, verifica-se que a técnica atual é muito sensível à posição da ponta da agulha no capilar de vidro, nas três direções espaciais. Quando se fixa no centro do orifício, o tamanho das gotas produzidas pode ser controlado com precisão deslizando a ponta da agulha ao longo do eixo do capilar de vidro cilíndrico sem variar o caudal (Muñoz-Sánchez, et al. 2016). A Figura 3 mostra o menisco da agulha inserido no capilar de vidro, assim como o jato de PDMS criado na ponta da agulha e posterior quebra do mesmo em pequenas gotas de PDMS.

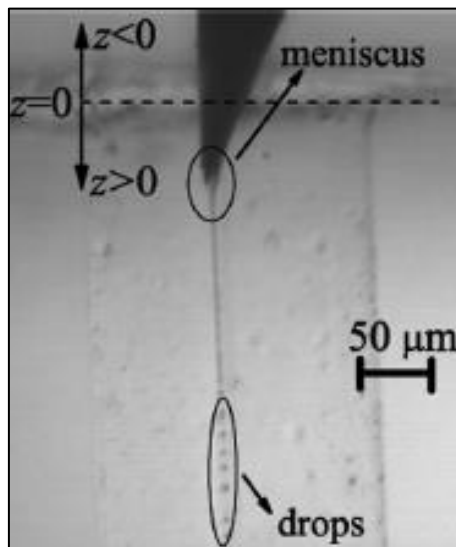


Figura 3 - Representação do jato de PDMS formado na ponta da agulha e esquema da variação da posição Z da agulha (Muñoz-Sánchez, et al. 2016).

Ainda Muñoz-Sánchez, et al. 2016 apresentaram resultados preliminares de comparação reológica entre uma suspensão de partículas de PDMS com uma suspensão

de glóbulos vermelhos ovinos (Muñoz-Sánchez, et al. 2016) demonstrando a viabilidade desta técnica na produção de partículas deformáveis.

A deformabilidade dos GVs pode ser descrita pela facilidade com que estes mudam de forma, dependendo das forças mecânicas aplicadas na sua superfície exterior. Na maioria das vezes a alteração da configuração globular é condicionada pela forma como estas forças mecânicas se distribuem na superfície dos eritrócitos. Assim, a deformação é considerada uma propriedade reológica dos GVs (Novais 2012).

Para além da capacidade de deformação dos glóbulos vermelhos, outro dos fenómenos hemodinâmicos também interessante e observado, tanto em estudos *in vivo* como *in vitro*, é conhecido como efeito *Fahraeus-Lindqvist*, no qual a viscosidade aparente do sangue diminui à medida que o diâmetro do vaso é reduzido, isto apenas para vasos com diâmetro inferior a 300 μm . A razão física por trás deste fenómeno é a criação de uma camada de plasma ou também conhecida como camada livre de células (CLC) em regiões adjacentes à parede do vaso (Fidalgo, et al. 2010), devido à migração dos glóbulos vermelhos para o centro do microcanal a qual também é influenciada pela sua capacidade de deformação. É extremamente importante entender o comportamento da camada livre de células na microcirculação, pois contribui para as propriedades reológicas do sangue em microvasos. A espessura da camada livre de células pode ser definida como a distância entre a parede do microcanal e a região limite do núcleo dos glóbulos vermelhos (Novais, Pinho, et al. 2014), a qual está representada na Figura 4.

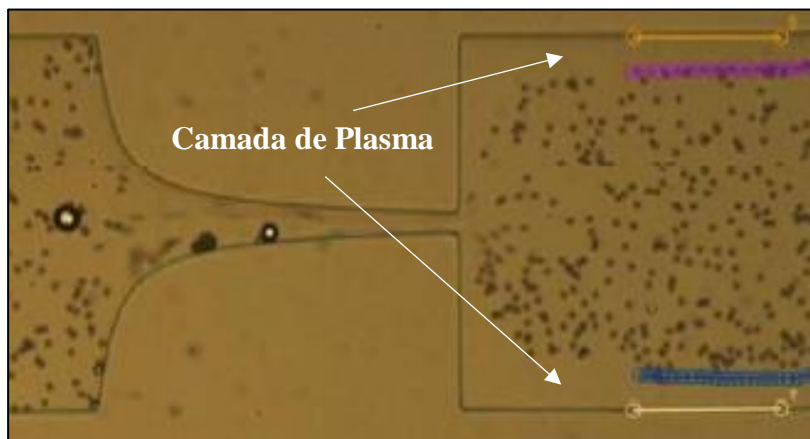


Figura 4 - Representação da camada de plasma num canal hiperbólico (Calejo 2013).

Assim, as visualizações através de microcanais de contração hiperbólica feitos de PDMS por meio de litografia suave, são utilizadas para observar a CLC originada pelos GVs (Calejo 2013; Rodrigues, et al. 2016) e por análogos ao sangue (Calejo 2013), assim como para visualizar a capacidade de deformação do GVs ou partículas (Faustino 2012;

Garcia, Dias e Lima 2012; Novais 2012). Contudo, para a fabricação destes dispositivos existem outras técnicas ditas *low-cost*, como a xurografia (Pinto, et al. 2013) ou como a fabricação proposta por Pinto, *et al.* 2014.

A xurografia tem como principal objetivo a diminuição dos custos de produção, considerando que todos os outros métodos existentes são mais dispendiosos. Nesta técnica é utilizada uma *plotter* de corte que corta no vinil, ou noutros possíveis materiais, o molde previamente desenhado em formato *CAD* para o fabrico do dispositivo. Depois de colocado o PDMS no molde, a este é retirado todo o ar formado com uma bomba de vácuo e posteriormente é efetuada a sua cura num forno ou outro equipamento equivalente (por exemplo uma estufa). Após a cura, o molde em PDMS é retirado, sendo que o molde em vinil pode ser reutilizado (Pinto, Pinho, et al. 2013). Na Figura 5 está representado, resumidamente, todo o processo da xurografia.

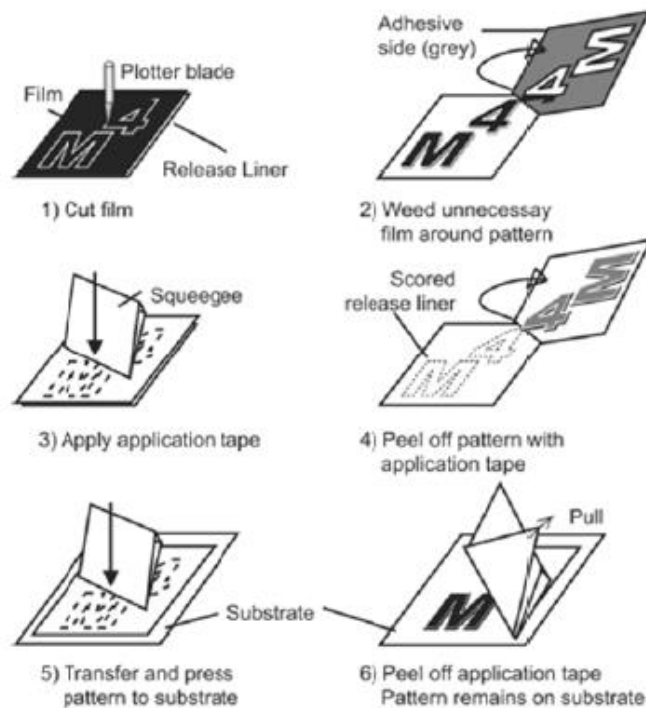


Figura 5 - Etapas da xurografia para a microfabricação: 1) corte do molde do microcanal na película de vinil; 2) remoção da película excedente à volta do molde do microcanal; 3) colocação do papel de transferência (fita de remoção); 4) remoção do molde; 5) transferência do molde para o recipiente pretendido; 6) remoção do papel de transferência, ficando com o molde do microcanal colado ao recipiente o (Calejo 2013).

Um dos métodos mais populares para fabricar dispositivos microfluídicos biomédicos é o uso da técnica de litografia suave (Faustino, Catarino, et al. 2016). A litografia suave é uma técnica que consiste na transferência de um padrão de uma

máscara, previamente desenhada num programa *CAD*, para um material fotossensível (*fotoresist*) sobre um substrato (*wafer*) por exposição seletiva a uma fonte de radiação, como por exemplo a luz UV. As etapas do processo de litografia têm uma sequência lógica para assegurar um molde ótimo. Este molde é coberto com um polímero gerando uma réplica negativa do molde. Na Figura 6 pode-se observar as diferentes etapas de microfabricação usando a litografia suave.

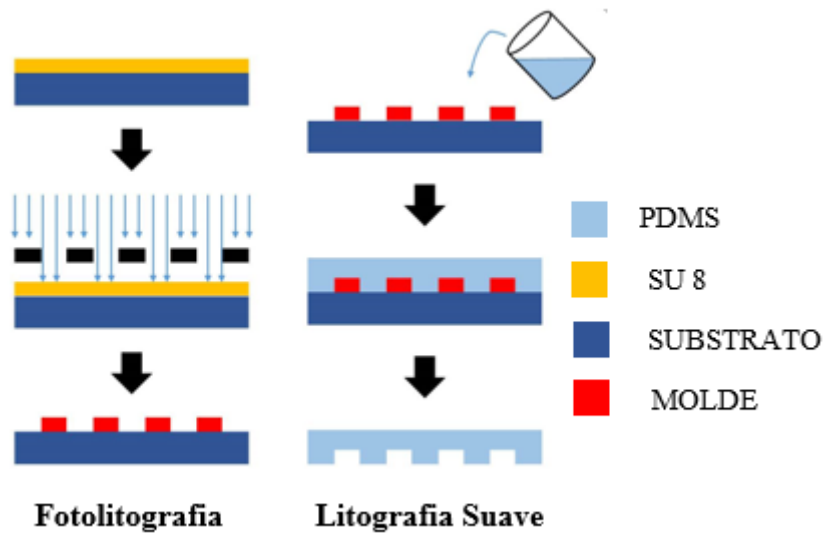


Figura 6 - Demonstração dos diferentes passos para a fabricação do molde dos microcanais por litografia suave (Novais, Pinho, et al. 2014).

Por fim, depois de o elastómero ou polímero ser derramado para cima do molde, neste caso o PDMS, procede-se à cura por temperatura permitindo remover-se uma réplica do molde. Este processo permite obter um grande número de réplicas do molde desenhado, como se pode ver na Figura 7 (Silva 2015).

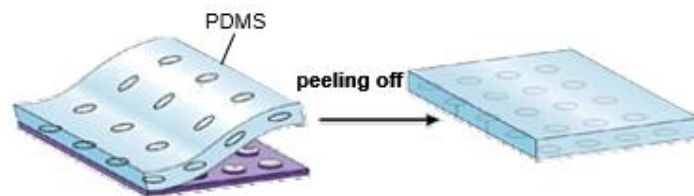


Figura 7 – Remoção e réplica do molde de PDMS (Tomaiuolo 2008).

Já a fabricação proposta por Pinto, et al. 2014 é uma adaptação mais económica da litografia suave comum, não recorrendo à utilização de câmaras limpas e a *wafer* utilizada é uma lâmina de vidro em vez de uma placa de sílica, a qual é muitas vezes usada na

litografia suave. Esta técnica foi a utilizada para fabricar os moldes utilizados neste estudo para medir o índice de deformação das partículas e a camada de plasma.

Capítulo 3

O sangue e as suas propriedades reológicas

Neste capítulo será feita uma breve abordagem à constituição do sangue e aos vasos sanguíneos. É também feita uma descrição das propriedades reológicas do sangue.

3.1. O sangue

O sangue é um tecido vivo que circula em vasos sanguíneos pelo organismo. Pode-se considerar como um fluido opaco, tendo uma viscosidade superior à da água e é também heterogêneo, pois é constituído por um líquido amarelado, o plasma, e por uma série de outros componentes (Fidalgo 2010), como os glóbulos vermelhos, os glóbulos brancos e as plaquetas. Na Figura 8 estão demonstrados todos estes constituintes.

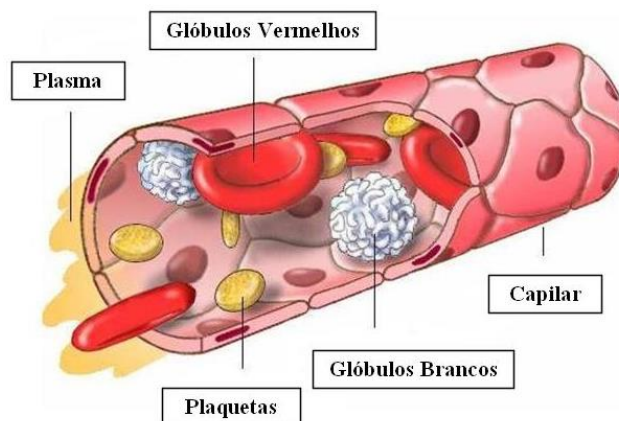


Figura 8 - Representação de um vaso sanguíneo com os constituintes do sangue (Fidalgo 2010).

No total, o sangue assegura a homeostasia corporal, na qual se inclui, também, o controlo do pH e da temperatura e o transporte de elementos constituintes do sistema imunitário (Silva 2012).

Glóbulos vermelhos

Os glóbulos vermelhos (Figura 9), também conhecidos por hemácias ou eritrócitos, são o elemento mais presente no sangue. A hemoglobina (Hb) é o seu principal componente, a qual lhes dá a sua cor avermelhada. A principal função desta substância é transportar o oxigénio pelos diferentes tecidos e órgãos do organismo humano (Pinho e Lima 2016).

O comportamento do escoamento sanguíneo na microcirculação é fortemente influenciado pelos glóbulos vermelhos, uma vez que ocupam quase metade do volume total do sangue. São formados na medula óssea e durante a sua maturação perdem os seus núcleos antes de entrarem no sistema circulatório. Quando suspensos num meio isotónico (tal como plasma ou soro fisiológico), a forma dos glóbulos vermelhos assemelha-se a um disco bicôncavo e, em geral, tem entre 6 μm a 9 μm de diâmetro e 2 μm a 3 μm de espessura (Garcia, Dias e Lima 2012; Pinho e Lima 2016; Lopes 2012).



Figura 9 - Glóbulos vermelhos (*Orangesdms - Red Blood Cells - RG 2010*).

A densidade dos GVs é de cerca de $1,08 \times 10^3 \text{ kg.m}^{-3}$ e os seus principais componentes celulares são o citoplasma, hemoglobina e uma membrana fina composta de bicamadas lipídicas e moléculas de proteínas. A viscosidade interna proporcionada pela hemoglobina intracelular contribui para as propriedades reológicas dos glóbulos vermelhos. A matriz proteica, usualmente conhecida como citoesqueleto, tem um papel importante nas suas propriedades mecânicas e na manutenção da sua forma de disco bicôncavo (Garcia, Dias e Lima 2012).

A capacidade dos GVs se deformarem é fortemente influenciada pela sua membrana celular e forma, e também pela concentração da hemoglobina (Pinho e Lima 2016).

Glóbulos brancos

Os glóbulos brancos (Figura 10), também denominados de leucócitos, são células com núcleo que representam o principal mecanismo de defesa contra infecções no nosso organismo. A sua forma é, geralmente, esférica, mas a sua superfície não é lisa. O diâmetro dos leucócitos varia entre 7 μm e 22 μm , dependendo do seu tipo. O sangue saudável contém normalmente menos de 1 % de glóbulos brancos do volume total de células sanguíneas. Estas células são menos deformáveis do que os glóbulos vermelhos, mas os glóbulos brancos podem passar pelas paredes dos capilares. Assim, as propriedades mecânicas dos glóbulos brancos não são claramente compreendidas e necessitam de mais investigação (Pinho e Lima 2016).

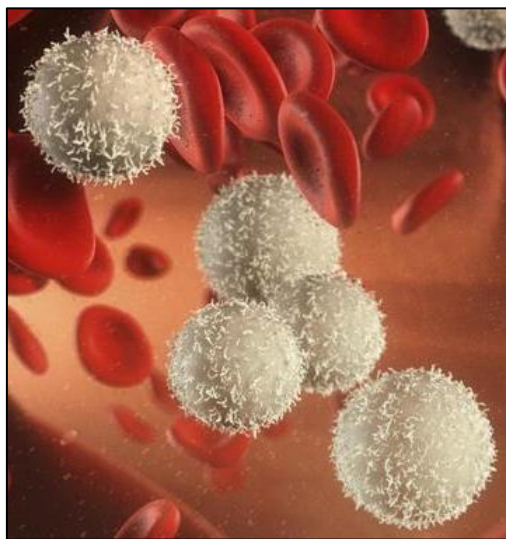


Figura 10 - Glóbulos brancos (*Orangesdms - White Blood Cell - AB 2010*).

Plaquetas sanguíneas

As plaquetas (Figura 11) são células sem núcleo, com forma redonda ou oval, em geral, e com diâmetros de cerca de 1 μm a 2 μm . O número destas células é geralmente menor do que o de glóbulos brancos e podem ter pouco efeito sobre o comportamento do escoamento sanguíneo (Pinho e Lima 2016). São responsáveis pelo fenómeno de coagulação, quando há estagnação sanguínea (Lopes 2012).

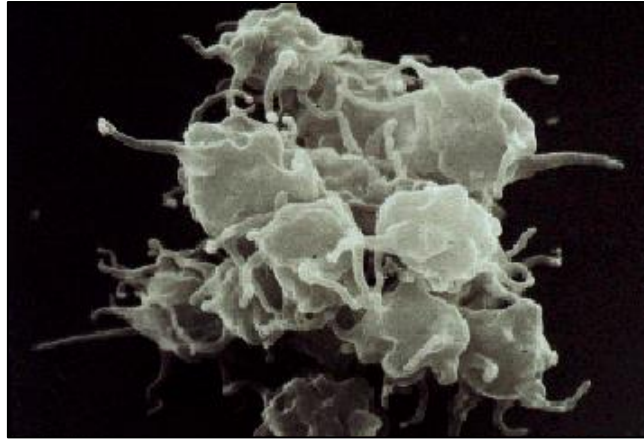


Figura 11 - Plaquetas sanguíneas (George 2015).

Plasma sanguíneo

O plasma é um fluido amarelado que contém 90 % de água, em volume, e 10 % de proteínas, substâncias inorgânicas, vitaminas, gases dissolvidos, entre outros. O fluxo plasmático, devido ao seu grande tamanho molecular, geralmente não passa através da parede capilar, gerando assim uma pressão osmótica.

Em testes *in vitro*, a pressão osmótica é um parâmetro importante que requer atenção especial. Por exemplo, quando os glóbulos vermelhos estão suspensos numa solução isotônica como o plasma, ou seja, a pressão osmótica é a mesma em ambos os lados, a sua forma não muda. No entanto, se os glóbulos vermelhos estão suspensos numa solução hipotônica, solução onde a pressão osmótica é menor do que o sangue, a água difunde no interior das células e como resultado, estas “incham” podendo ocorrer a hemólise, ou seja, a destruição do glóbulo vermelho e liberação de hemoglobina na corrente sanguínea (Pinho e Lima 2016).

Uma forma simples de obtermos o plasma sanguíneo separado dos outros componentes é através da centrifugação, como se observa na Figura 12.

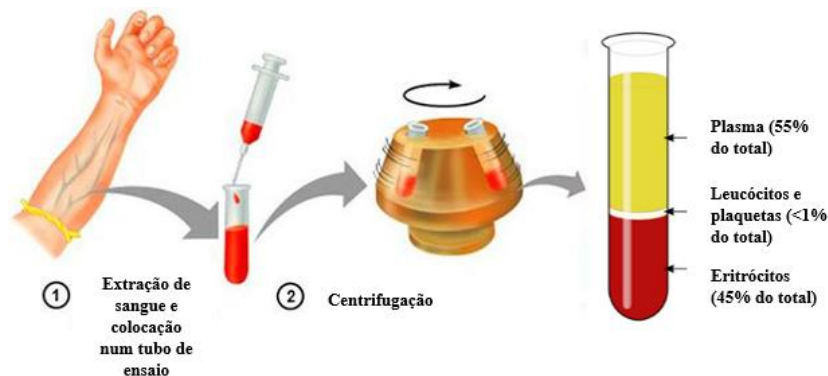


Figura 12 - Demonstração da separação dos constituintes do sangue (Diário de Biologia 2010).

3.1.1. Vasos sanguíneos

Tal como Martins Lopes 2012 afirmou no seu estudo, o escoamento sanguíneo tem uma grande dependência da geometria dos canais onde este se processa. No caso da circulação no interior do corpo humano, o sangue é forçado a escoar em vasos com diferentes diâmetros e geometrias (Lopes 2012).

Os vasos sanguíneos dividem-se em três tipos distintos: as artérias, as veias e os capilares (Figura 13).

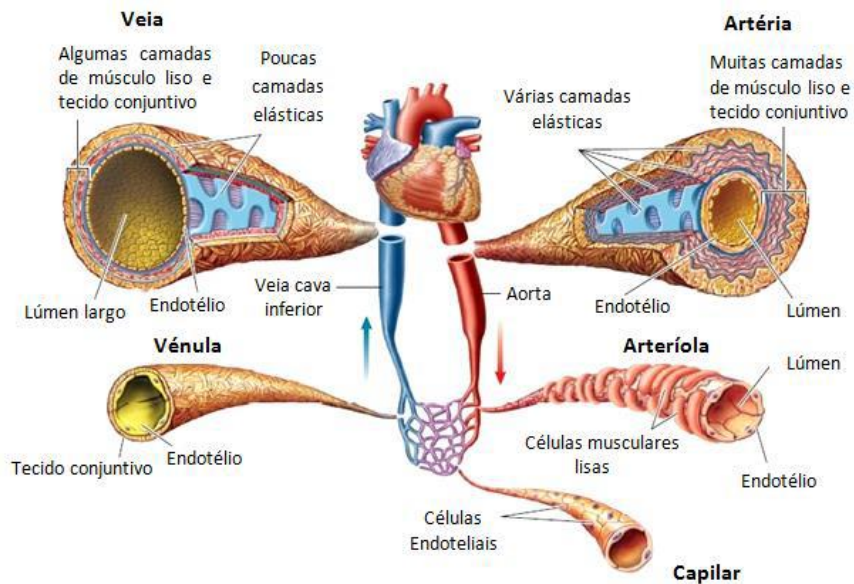


Figura 13 - Representação de todos os tipos de vasos sanguíneos (Soares 2016).

Sendo assim, o sangue oxigenado sai do coração, com alta pressão e velocidade (número de *Reynolds* (Re) > 2000), através da aorta e move-se para outras grandes artérias, seguindo para as arteríolas e capilares. No seu caminho de volta dos capilares, o sangue move-se das vénulas para as veias, a fim de retornar ao coração (Pinho e Lima 2016).

Artérias

A principal função das artérias é transportar o sangue, o oxigénio e os nutrientes para todas as partes periféricas do corpo humano. O seu diâmetro médio é cerca de 4 mm, com uma espessura de 1 mm. As artérias, no percurso do sangue, ramificam-se sucessivamente, passando a ser arteríolas, sendo que o seu diâmetro vai diminuindo, até à formação de capilares (Silva 2012).

Veias

As veias transportam o sangue sem oxigénio dos tecidos e órgãos até ao coração. Estas diferenciam-se das artérias na sua estrutura e função. As vénulas, ou seja, as veias mais estreitas, recebem o sangue dos capilares transferindo-o para as veias mais largas. Neste percurso, o tamanho destes vasos vai aumentando gradualmente, até chegar à periferia do coração. O diâmetro médio das veias é, em média, muito superior ao tamanho das artérias, sendo cerca de 30 mm, com uma espessura de 1,5 mm (Silva 2012).

Capilares

Nos capilares ocorre a passagem transmembranar de moléculas gasosas e lipofílicas por difusão simples e bidirecional, dependendo dos gradientes osmóticos, sem a intervenção de sistemas de transporte específicos. Estes vasos sanguíneos têm um diâmetro interno entre 5 μm a 10 μm . Resultam da ramificação final das artérias e organizam-se numa rede em todos os tecidos do corpo humano, sendo que são os responsáveis pelas trocas de substâncias e do oxigénio entre o sangue e os tecidos do organismo. Após as trocas entre os capilares, estes microvasos aumentam de diâmetro, acabando por convergir nas vénulas (Silva 2012).

3.2. Microcirculação

A microcirculação é constituída por uma rede vascular que recobre os tecidos do organismo, a qual é constituída pelos vasos sanguíneos mais estreitos da circulação sanguínea, como é o caso das arteríolas, das vénulas e dos capilares (Silva 2012).

As funções da microcirculação baseiam-se na irrigação e oxigenação dos tecidos, das trocas líquidas através dos capilares entre o sangue e os tecidos irrigados, no controlo da temperatura corporal e na proteção anti-inflamatória (Silva 2012). A microcirculação contrasta com a macrocirculação, a qual conduz o sangue entre os diversos órgãos, através das artérias e das veias (Calejo 2013).

Ao longo dos anos, vários métodos experimentais têm sido aplicados para compreender o comportamento do escoamento sanguíneo na microcirculação e os respetivos fenómenos, como por exemplo a formação da camada de plasma junto às paredes dos vasos sanguíneos com diâmetro inferior ou igual a 300 μm (Garcia, Dias e Lima 2012).

3.2.1. Efeito de *Fahraeus-Lindqvist*

Como foi mencionado por Garcia, Dias e Lima 2012, nas grandes artérias, nas quais o diâmetro dos vasos sanguíneos é suficientemente grande comparando com as células individuais, é adequado considerar que o sangue é um fluido monofásico e pode ser tratado como um fluido homogêneo no qual a sua natureza particulada é dispensada. À medida que o tamanho das artérias vai diminuindo, a área da secção transversal vascular aumenta. Assim a pressão e a velocidade diminuem à medida que o sangue flui para os vasos de menor tamanho. Nesta fase, consideram-se, então, os efeitos das propriedades multifásicas do sangue. Um destes efeitos é a formação da camada de plasma em microvasos com diâmetro inferior a 300 μm , efeito este conhecido como *Fahraeus-Lindqvist* (Garcia, Dias e Lima 2012). A camada livre de células ou camada de plasma ocorre entre a coluna de glóbulos vermelhos no microcanal e a sua parede, e forma-se devido à tendência dos GVs e dos seus aglomerados migrarem para o centro do microcanal formando uma camada isenta de células junto das paredes (Soares 2016).

Robin Fahraeus observou que o comportamento do escoamento do sangue e o seu hematócrito (Hct) (percentagem de volume de sangue ocupado pelos GVs (Silva 2015)) são fortemente afetados pelos diâmetros dos microvasos. Assim, *Fahraeus* observou que o hematócrito nos capilares de vidro (diâmetro $< 300 \mu\text{m}$) é menor do que o hematócrito de alimentação, o que sugere que este diminui à medida que o sangue prossegue através de microvasos mais estreitos. Este fenómeno resulta da migração dos glóbulos vermelhos para o centro do microvaso e conseqüentemente do movimento mais rápido das células quando comparado com o meio de suspensão, tal como plasma ou Dextrano (Garcia, Dias e Lima 2012, *Fahraeus e Lindqvist* 1931).

O efeito *Fahraeus-Lindqvist* está de alguma forma relacionado com o fenómeno descrito no parágrafo anterior. Considerando, ainda, microvasos com diâmetros inferiores a 300 μm , *Fahraeus e Lindqvist* observaram que a viscosidade aparente do sangue diminui à medida que o diâmetro do microvaso se torna menor (Garcia, Dias e Lima 2012, *Fahraeus e Lindqvist* 1931). No entanto, o efeito *Fahraeus-Lindqvist* é invertido em diâmetros de 5 μm a 7 μm (Figura 14) (Garcia, Dias e Lima 2012) .

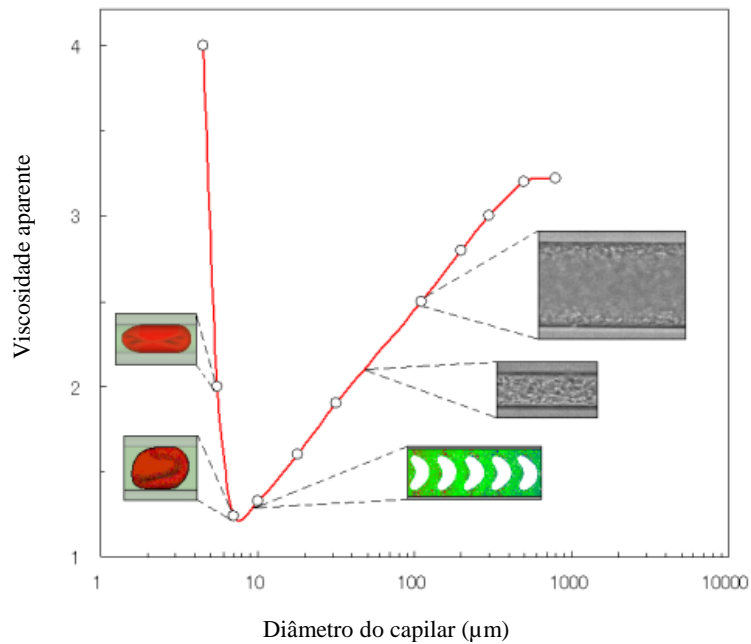


Figura 14 - Efeito *Fahraeus-Lindqvist*: variação da viscosidade com o diâmetro do capilar (Garcia, Dias e Lima 2012).

Pode-se então dizer que este fenômeno indica que o hematócrito não é o único parâmetro que afeta a viscosidade aparente do sangue. Assim, a camada de plasma e também os movimentos microscópicos dos glóbulos vermelhos e a sua deformabilidade desempenham um papel importante na viscosidade aparente do sangue (Pinho e Lima 2016).

3.2.2. Escoamento sanguíneo

Como Pinto 2012 referiu no seu estudo, o escoamento sanguíneo pode obedecer aos princípios físicos de escoamento no interior de condutas, no qual a massa, a energia e a quantidade de movimento são conservadas. O movimento do sangue nos vasos sanguíneos é provocado pelo gradiente de pressão que existe no seu interior, a qual esta constantemente a ser alterada no interior dos vasos, de ponto para ponto. Esta variação da pressão irá provocar o movimento do sangue. Porém, as forças tangenciais ao movimento do sangue (forças de corte), assim como as forças provocadas pela turbulência do escoamento opõem-se à circulação sanguínea (Pinto 2012).

Existem dois tipos de escoamento que podem ser considerados: o laminar e o turbulento (Figura 15). O primeiro ocorre quando a velocidade tem apenas uma componente ao longo do eixo, ou seja, o fluido move-se em camadas paralelas; por sua vez, o regime turbulento ocorre quando existem outras componentes não normais ao eixo, apesar da componente principal se encontrar ao longo do eixo, isto é, as partículas

apresentam um movimento irregular, existindo assim componentes transversais ao escoamento global do fluido (Pinto 2012; Soares 2016).

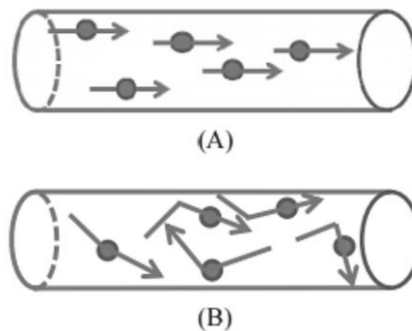


Figura 15 - Representação dos dois tipos de escoamento: A) escoamento laminar; B) escoamento turbulento (Soares 2016).

Em regime laminar, a viscosidade tende a moderar o aparecimento da turbulência, possuindo um *Reynolds* (Re) inferior a 2100, por sua vez os escoamentos turbulentos são caracterizados por possuir *Reynolds* superiores a 4000 (Santos 2009). Porém, o valor de Re pode ser muito inferior (por exemplo entre 10 e 100) quando o fluxo ocorre em vasos com geometria variável e/ou constrições (Soares 2016).

Podemos então dizer que o número de *Reynolds* representa a razão entre as forças de inércia e as forças da viscosidade de um escoamento, permitindo analisar se o escoamento é laminar ou turbulento. Este pode ser calculado tendo em conta as forças inerciais e as forças causadas pela viscosidade do fluido. Para condutas de secção circular é calculado por (Pinto 2012):

$$Re = \frac{\rho VD}{\eta} = \frac{VD}{\nu} \quad \text{Eq. (1)}$$

onde ρ é a massa volúmica do fluido, V é a velocidade média, D é o diâmetro da conduta, η é a viscosidade do fluido e ν é a viscosidade cinemática. Para condutas de secção não circular, o diâmetro D é substituído pelo diâmetro hidráulico, o qual é dado por $D_h = \frac{4 \times A}{p}$, onde A representa a área da secção e p o perímetro desta mesma secção.

No sistema circulatório, quando o sangue atinge as arteríolas e capilares, o Re torna-se menor que 1, onde a força viscosa domina sobre as forças inerciais, como se pode observar na Figura 16 (Lima, et al. 2012).

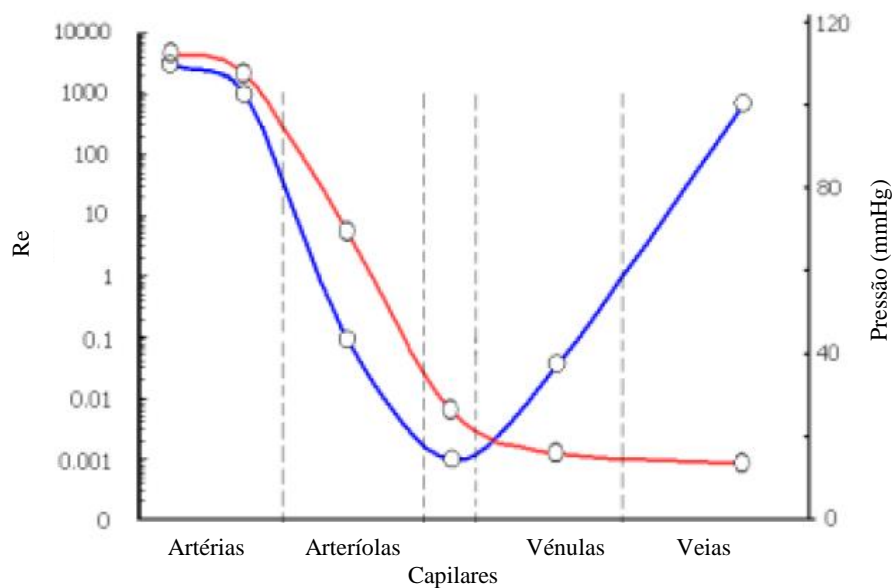


Figura 16 - Diagrama esquemático da variação na pressão arterial e Re para as grandes artérias, capilares e veias (Lima, et al. 2012).

3.3. Hemorreologia

A hemorreologia é a ciência que estuda a deformação e o escoamento do sangue e os seus componentes. Inclui, também, o estudo das propriedades mecânicas e reológicas do sangue (Soares 2016). Os sólidos, os líquidos e substâncias viscoelásticas são os tipos de matéria mais analisadas por esta ciência. Seja qual for o caso, quando a matéria é sujeita a forças externas tende a mudar de forma ou de dimensão. Estas alterações resultam de deslocações relativas dos componentes físicos, o que se entende por deformação (Silva 2012).

Como Silva 2012 refere, quando a matéria é sólida, a deformação tende a ser proporcional à força exercida, recuperando a forma original quando essa força deixa de atuar. Os fluidos, os quais se entendem como matérias com características viscosas, no estado líquido ou gasoso, quando são sujeitos a uma força incidente, tendem a deformar-se continuamente. Assim, há fluxo de matéria não só quando a deformação aumenta, mas também quando diminui. Se este fluxo for proporcional à força aplicada, os líquidos ou fluidos são classificados como Newtonianos ou lineares, como é o caso da água, do óleo, etc.; se não houver proporcionalidade, como no caso das emulsões, suspensões e polímeros, são designados por não-Newtonianos ou não-lineares (Silva 2012).

Existem vários tipos de fluidos não-Newtonianos, os quais podem ser classificados conforme a forma como ocorre a variação da tensão de corte com a taxa de deformação

em dilatantes, pseudoplásticos ou viscoplásticos, como se pode observar na Figura 17 (Lopes 2012).

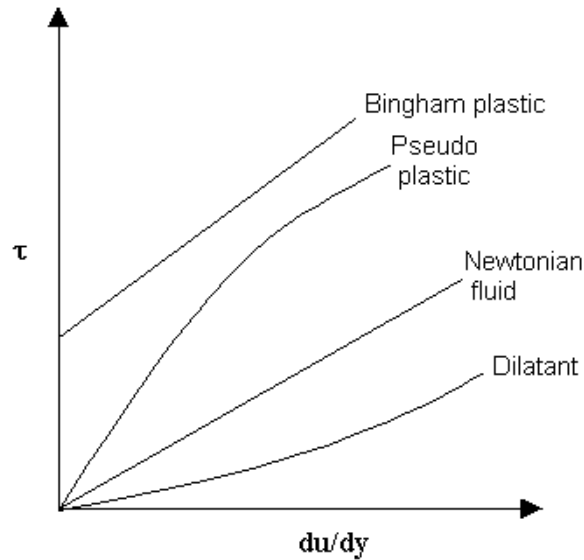


Figura 17 - Representação da variação da tensão de corte (τ) com a taxa de deformação (du/dy) para diferentes tipos de fluido (Msubbu 2014).

O sangue insere-se no grupo dos fluidos não-Newtonianos, mais precisamente no grupo dos pseudoplásticos, cuja viscosidade diminui com o aumento da taxa de deformação, apresentando também uma componente elástica (Silva 2012; Lopes 2012).

3.3.1. Perfis de velocidade de escoamento em microcanais

A velocidade do escoamento sanguíneo em microcanais tem sido medida ao longo dos anos por diversas técnicas de medição. De todas essas técnicas não há consenso geral sobre o perfil de velocidade real nos microvasos. A grande dispersão de resultados reflete a complexidade dos fenômenos que ocorrem na microcirculação (Lima, et al. 2012). No entanto, os perfis de velocidade de escoamento são fortemente afetados por vários parâmetros combinados tais como: hematócrito, diâmetro do microcanal, taxa de deformação, taxa de fluxo, fluido de suspensão (plasma, soro fisiológico ou Dextrano), erros experimentais, etc. Apesar da grande quantidade de pesquisas nesta área, a evidência experimental permanece escassa e as controvérsias ainda permanecem (Lima, et al. 2012).

Goldsmith e Turitto 1986 usaram suspensões de células fantasmas e obtiveram perfis de velocidade com base no comportamento de fluxo microscópico de glóbulos vermelhos. Os seus resultados sugerem que, em soluções diluídas ($\sim 1\%$ Hct), o perfil de velocidade tem forma parabólica. Com um hematócrito mais elevado, o perfil torna-se plano em torno do eixo do microcanal (ver Figura 18) (Goldsmith e Turitto 1986).

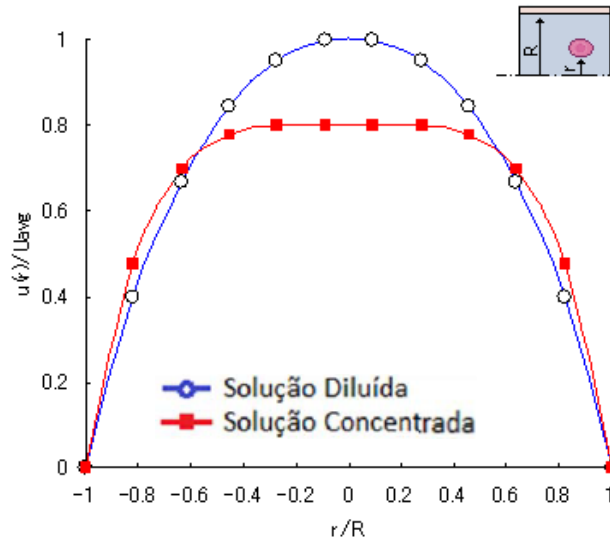


Figura 18 - Representação esquemática dos perfis de velocidade para glóbulos vermelhos em suspensões diluídas (<1% Hct) e concentradas (32% Hct). As velocidades locais ($u(r)$) são traçadas como proporções da velocidade da linha central (U_{avg}). R e r correspondem, respectivamente, ao raio do microcanal e à posição radial (r) a partir do eixo do canal (Lima, et al. 2012).

3.3.2. Viscosidade do sangue

A viscosidade do sangue é um parâmetro que depende de diversos fatores não assumindo os mesmos valores para as diferentes partes do sistema vascular. Os fatores que influenciam a viscosidade do sangue são o hematócrito, a temperatura e a velocidade de escoamento (Silva 2015; Silva 2011). Na Figura 19 está demonstrado a variação da viscosidade do sangue dependendo do hematócrito.

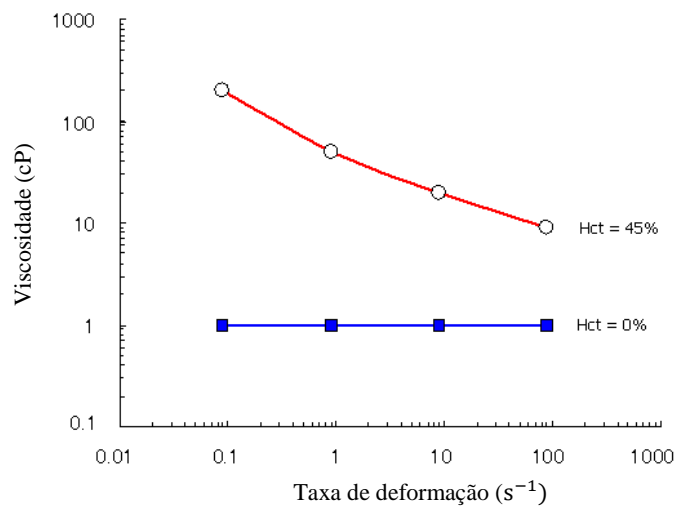


Figura 19 - Relação entre a taxa de deformação e a viscosidade para sangue normal (45% Hct) e o plasma (0% Hct) (Pinho e Lima 2016).

O comportamento pseudoplástico do sangue deve-se à presença de suspensões celulares e às interações com o plasma e entre si. Dadas as dimensões e concentração dos glóbulos vermelhos, estes são as células que mais contribuem para esse comportamento. Assim sendo, qualquer variação na estrutura ou concentração dos GVs, ou na forma como estes interagem com o meio de suspensão provocam uma variação na viscosidade do sangue (Lopes 2012).

Para taxas de deformação muito baixas, os glóbulos vermelhos tendem a formar agregados, normalmente designados por *rouleaux* (Figura 20), os quais são estruturas semelhantes a “moedas empilhadas”, podendo criar estruturas tridimensionais de dimensões globais que provocam uma resistência superior ao escoamento. Esta é a causa de a viscosidade ser superior para baixas taxas de deformação (Lopes 2012).



Figura 20 - Aglomerados de glóbulos vermelhos (Lopes 2012).

A formação de *rouleaux* depende também da concentração dos elementos presentes no plasma. Para maiores concentrações de fibrinogénio e globulinas (proteínas presentes no plasma) há um maior estímulo para a formação destes complexos. A ausência destas proteínas endurece os glóbulos vermelhos incapacitando-os de formar agregados. Contudo, a formação de *rouleaux* não é um fenómeno permanente, desagregando-se reversivelmente para maiores valores da taxa de deformação, até ao limite de deformação do eritrócito. Ao diminuir as dimensões dos aglomerados presentes no sangue, a resistência que estes oferecem ao escoamento passa a ser menor e, conseqüentemente, a viscosidade do sangue também diminui. Porém, na circulação do sangue no interior do corpo humano as taxas de deformação verificadas são demasiado elevadas para permitirem a formação de *rouleaux* de grandes dimensões (Soares 2016).

3.3.3. Deformação dos glóbulos vermelhos

Como já foi referido, os glóbulos vermelhos são células bicôncavas capazes de se deformar, dependendo das forças mecânicas a que são sujeitos. Mudam para uma forma elíptica quando submetidos a tensões de deformação e alongam-se significativamente para passar através dos menores capilares da microcirculação, mesmo quando as dimensões são inferiores às células (Rodrigues, et al. 2013).

O termo de deformação dos eritrócitos é, ainda, aplicado para representar a propriedade de adaptação destas células ao escoamento durante os 120 dias que normalmente permanecem na circulação. Este fenómeno da deformação depende de vários fatores, como por exemplo da geometria celular (dependendo da forma, volume e da relação superfície/volume dos GVs), da viscosidade interna, a qual depende da concentração de hemoglobina e de propriedades físico-químicas, e de propriedades viscoelásticas da membrana do glóbulo (Novais 2012).

3.4. Reometria

A reometria é um dos ramos da reologia na qual se mede, experimentalmente, as características reológicas dos materiais, tais como a viscosidade de corte e as diferenças de tensões normais. Para efetuar as medições experimentais podem ser utilizados reómetros e/ou viscosímetros (Calejo 2013).

A base da reometria inclui a reometria de corte e a reometria extensional, ou eletro-reológica. Na caracterização reológica de um fluido não-Newtoniano, frequentemente, adotam-se dois tipos de escoamento padrão: um escoamento de corte simples e um escoamento elongacional (Calejo 2013).

3.4.1. Reometria de corte

Os reómetros de corte são equipamentos que permitem medir determinadas funções materiais, nomeadamente, a viscosidade de corte (Calejo 2013).

Neste trabalho foi utilizado o reómetro rotacional *Bohlin Instruments CVO* (Figura 21) com resolução mínima de 0,0005 mN.m (5×10^{-7} N.m), para medir as propriedades reológicas dos fluidos utilizados.



Figura 21 - Reómetro Bohlin Instruments CVO.

Lei de Newton da viscosidade

Considerando um fluido entre duas placas planas paralelas, de área A , separadas por uma distância H , uma força \vec{F} é aplicada na placa superior fazendo com que esta placa entre em movimento, a uma velocidade \vec{u} constante em relação à placa inferior, a qual está fixa, conforme demonstrado na Figura 22 (Santos 2009).

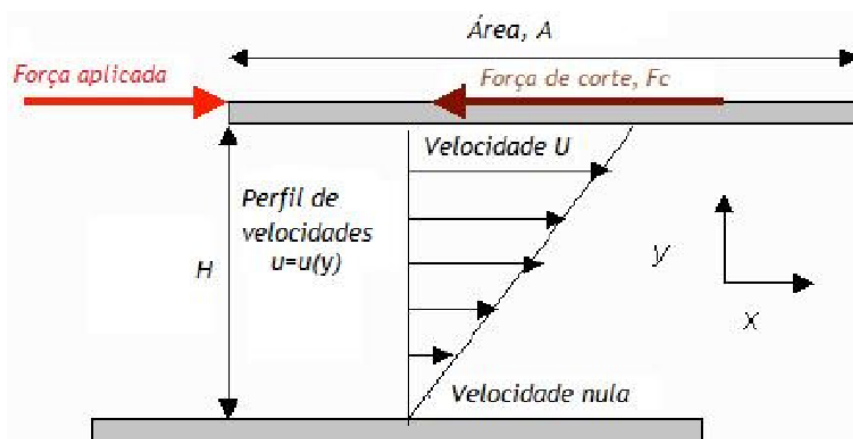


Figura 22 - Representação esquemática do escoamento de Couette entre duas placas paralelas (Santos 2009).

A força \vec{F} dá origem a uma outra força com a mesma intensidade, mas de sentido contrário, a força de corte, que se desenvolve devido às forças de coesão do fluido sobre as paredes da placa e entre as camadas de fluido, assumindo que o escoamento ocorre em

regime laminar. Este escoamento tangencial promovido pela movimentação da parede é designado por escoamento de *Couette* (Santos 2009).

A força de corte origina um gradiente de velocidade, $\frac{du}{dy}$, entre as placas que, no caso de o escoamento ser laminar, em regime estacionário – escoamento em que a velocidade não varia com o tempo, $\frac{\partial v}{\partial t} = 0$, só depende da ordenada do ponto que se está a estudar, y . A velocidade do fluido na placa inferior será nula e na placa superior terá o valor de U (condição de não-deslizamento) (Santos 2009).

O perfil de velocidades, segundo o eixo dos xx , u , é apenas em função da coordenada transversal y e varia linearmente na forma,

$$u = \frac{y}{H} U \quad \text{Eq. (2).}$$

A taxa de deformação, $\dot{\gamma}$, será constante em todo o domínio e dada pela seguinte equação:

$$\dot{\gamma} = \frac{du}{dy} = \frac{U}{H} \quad \text{Eq. (3).}$$

De notar que, o gradiente de velocidades na direção do eixo dos xx coincide com a taxa de deformação (Santos 2009).

A viscosidade dinâmica define-se, comparando com a lei de *Newton* para a viscosidade, como a razão entre a tensão de corte (*shear stress*) e a respetiva taxa de deformação (*shear rate*), ou seja:

$$\eta (\dot{\gamma}) = \frac{\tau_{xy}}{\frac{du}{dy}} = \frac{\tau_{xy}}{\dot{\gamma}} \quad \text{Eq. (4)}$$

onde η representa a viscosidade, com unidade de Nm^{-2}s , ou seja, $\text{Pa}\cdot\text{s}$; τ a tensão de corte, Pa , e $\dot{\gamma}$ a taxa de deformação, s^{-1} (Santos 2009).

Geometrias de reometria

No reómetro rotacional, as medições das propriedades reológicas são feitas a partir de uma tensão de corte imposta pela rotação ou oscilação de uma geometria (Calejo 2013). As geometrias que se podem usar neste reómetro são o prato paralelo ou cone-prato (Figura 23), entre outras (CVO 2010).

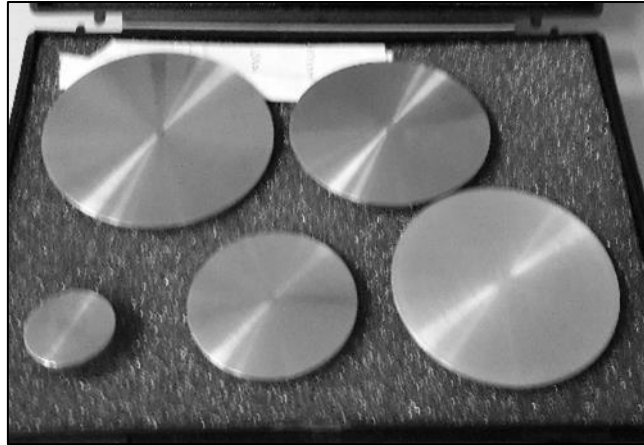


Figura 23 - Diferentes geometrias de cone-prato e prato paralelo.

Neste trabalho, a geometria utilizada foi a de cone-prato, (com diâmetro de 55 mm e ângulo de 1° - CP 1/55, com gap = $30 \mu\text{m}$), a qual consiste num cone superior rotativo e numa placa inferior fixa com uma amostra contida entre eles (CVO 2010). Esta geometria está representada na Figura 24.

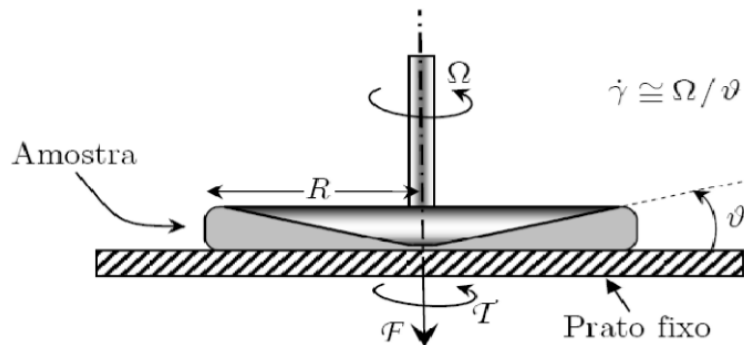


Figura 24 - Representação da geometria cone-prato utilizada (Santos 2009).

A tensão de corte relaciona-se com o binário, τ , através da seguinte equação:

$$\tau_{xy} = \eta(\dot{\gamma}) \cdot (\dot{\gamma}) = \frac{3\tau}{2\pi R^3} \quad \text{Eq. (5).}$$

Os gráficos que irão ser descritos no decorrer do trabalho aqui apresentado, relativos a ensaios de corte, estarão limitados à esquerda por uma fronteira devida ao momento torsor mínimo que o equipamento consegue medir e à direita por outra fronteira devida à ocorrência de instabilidades inerciais, ou seja, o surgimento de escoamentos secundários (vórtices de *Taylor*) (Figura 25).

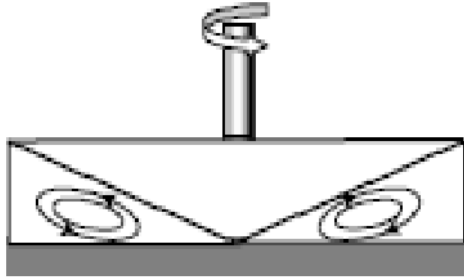


Figura 25 - Representação esquemática de escoamentos secundários (Santos 2009).

Assim, a equação que define o momento tursor mínimo é a seguinte:

$$\mu_{min} = \frac{3M_{min}}{2\pi R^3} \frac{1}{\dot{\gamma}} \quad \text{Eq. (6)}$$

onde M_{min} representa a resolução mínima do equipamento (5×10^{-7} Nm) e R o raio da geometria, em m .

A outra fronteira é calculada pela seguinte forma:

$$\mu_{max} = \rho \frac{R^2 \alpha^3}{6} \dot{\gamma} \quad \text{Eq. (7)}$$

onde ρ representa a massa volúmica e α o ângulo, em radianos, da geometria.

Capítulo 4

Produção de partículas de PDMS

Neste capítulo é descrita a produção de partículas de PDMS, assim como os diferentes parâmetros em estudo, nomeadamente o efeito do rácio [base:agente de cura] na redução do tamanho do diâmetro das gotas após a cura. O processo utilizado para a fabricação das partículas foi a técnica da focagem de fluxo que vem no seguimento do trabalho de Silva 2015 e de Muñoz-Sánchez, *et al.* 2016 os quais se basearam na técnica de Acero, *et al.* 2013 referida no Capítulo 2.

É também analisada a viscosidade das diferentes misturas de PDMS e o melhor corante a usar para a obtenção de partículas coradas. Foi ainda calculado o coeficiente de redução do tamanho das partículas com a variação do rácio da mistura de PDMS, com a adição de corante e ainda com o tamanho inicial das gotas de PDMS.

4.1. Procedimento experimental para a obtenção das partículas

4.1.1. *Setup* para a produção de partículas de PDMS

Na Figura 26 está representado esquematicamente o *setup* utilizado para a produção das partículas de PDMS. Este está montado sobre uma mesa pneumática (H) com uma pressão de 3,8 bar e sobre o mesmo está o extrator de ar.

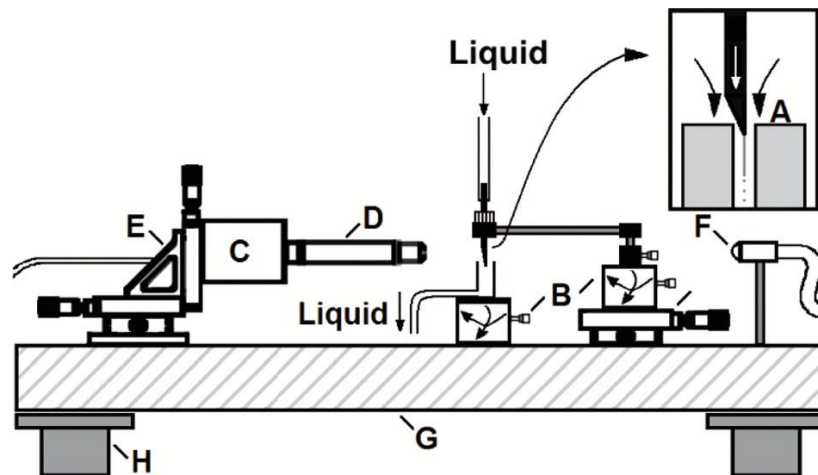


Figura 26 - Representação esquemática do *setup* experimental: (A) agulha localizada no capilar de vidro; (B) sistemas de alta precisão de orientação-translação; (C) câmara digital; (D) lentes óticas; (E) fase triaxial de movimentação da câmara; (F) fibra ótica; (G) mesa ótica; (H) sistema pneumático de isolamento anti-vibração (Muñoz-Sánchez, et al. 2016).

Através da Figura 26 - A) observa-se o capilar de vidro, ou seja, um pequeno tubo de vidro com um bocal de 200 μm e comprimento de aproximadamente 1 cm. Este é fixado dentro da célula de vidro, como se pode ver na Figura 27.

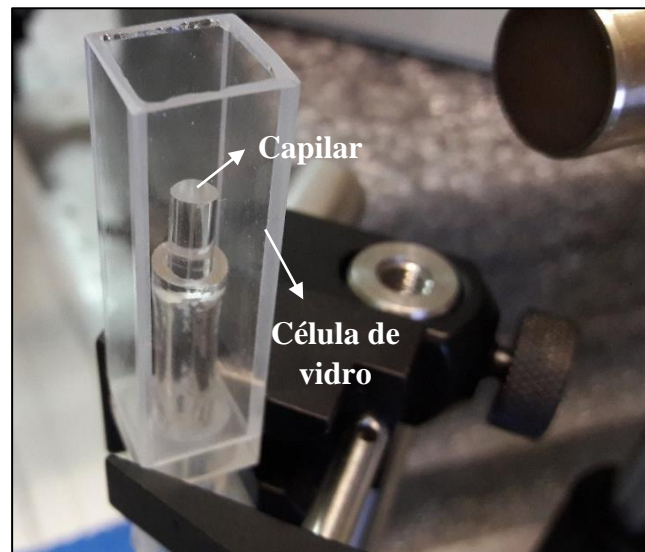


Figura 27 - Capilar de vidro dentro da célula.

A agulha hipodérmica utilizada (*Becton Dickinson MICROLANCE 3 30G 1/2*), com diâmetro interno de 160 μm e externo de 300 μm (Figura 28) é inserida dentro do capilar de vidro e cria um jato de PDMS, o qual se quebra em pequenas gotas. O PDMS utilizado (*Sylgard® 184, Dow Corning*) é constituído por duas partes: uma base de oligómeros de siloxano (Parte A) e um agente de cura de oligómeros de siloxano e catalisador (Parte B). A proporção da parte A:parte B da mistura foi variada durante os testes efetuados.



Figura 28 - Agulha hipodérmica.

Tanto o capilar de vidro como a agulha hipodérmica são imersos num banho de glicerina (*Panreac*), cuja viscosidade é 0,97 Pa.s, e surfactante *Brij 30* com viscosidade igual a 0,04 Pa.s, num rácio de [9:1], para evitar a coalescência das gotas a jusante do jato de PDMS formado na ponta da agulha. Esta solução é imiscível com o jato de PDMS.

O sistema de focagem de fluxo montado é ainda constituído por duas bombas de seringa: uma bomba de injeção (Figura 29 – a)) a qual injeta o PDMS através da agulha hipodérmica (Figura 26 – A) para dentro do capilar de vidro e uma segunda bomba de seringa, (Figura 29 – b)), a qual está ligada à célula de vidro e succiona o banho de glicerina com surfactante juntamente com as gotas produzidas no capilar de vidro (Figura 26 - A) para uma seringa de vidro *Hamilton*.

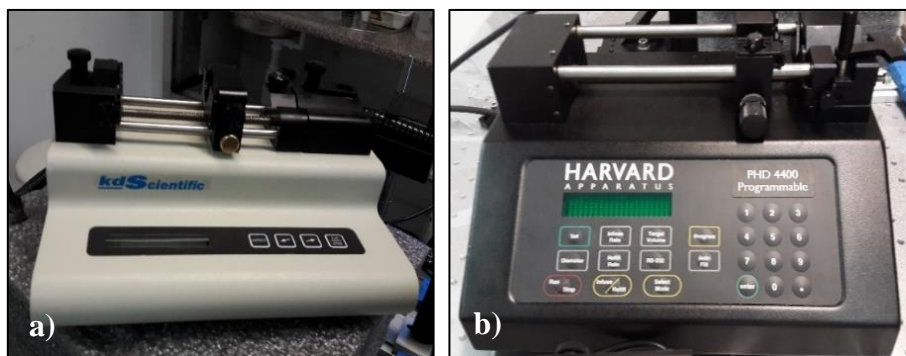


Figura 29 – a) Bomba de injeção; b) bomba de sucção.

Foram utilizadas duas câmaras de alta resolução (*Photron, FASTCAM SA5*), as quais estão representadas na Figura 30, para a visualização das gotas de PDMS formadas dentro do capilar de vidro no computador. Na Figura 26 a câmara está esquematizada pela letra C, a qual representa a câmara da Figura 30 - a).

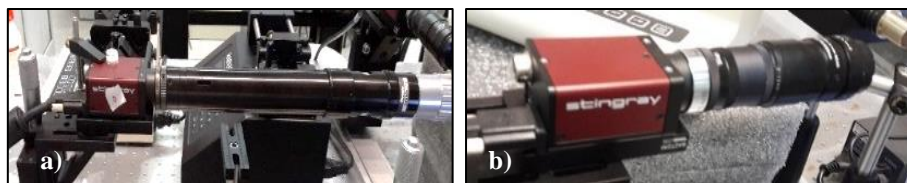


Figura 30 - Câmaras utilizadas para a captura das imagens das partículas.

Com a ajuda destas câmaras de alta velocidade é então possível a visualização, no computador, do capilar de vidro, recorrendo também a essa imagem para se conseguir colocar a agulha no orifício do mesmo. O sistema de três eixos, Figura 26 – B, facilita também a deslocação correta da agulha e o posicionamento Z, o qual determina o tamanho da gota (Figura 3).

A letra F na Figura 26 representa a fibra ótica a qual fazia a iluminação da câmara maior (C). Esta fonte está também representada na Figura 31.



Figura 31 - a) agulha hipodérmica (*Becton Dickinson MICROLANCE 3 30G 1/2*); b) fibra ótica.

Todo o processo de produção das gotas de PDMS ocorreu aproximadamente, durante 3 horas.

De referir que a técnica de fluxo de focagem usada já tinha sido previamente otimizada, ou seja, a melhor posição da agulha dentro do capilar e a razão entre os caudais de injeção e sucção, num trabalho desenvolvido anteriormente. Mais informação sobre esses pormenores podem ser encontrados em (Silva 2015).

4.1.2. Materiais e métodos

Produção de partículas em PDMS

Para a produção das partículas começou-se por preparar o banho de glicerina, que é colocado na célula de vidro. Esta mistura foi colocada no agitador (*Agimatic-E, P-Selecta*) a 60 rpm, com $T < 50^{\circ} C$, aproximadamente 30 min, para que os componentes,

glicerina e surfactante, ficassem bem misturados. O banho necessita ficar a repousar para que todo o ar saia da mistura e o mesmo fique completamente transparente.

Na elaboração do PDMS, a parte A (base) e a parte B (agente de cura) foram misturados, [A:B], num copo de plástico com a ajuda de uma espátula aos rácios de [6:4], [10:1] e [8:2]. Utilizou-se, também, uma balança para saber as quantidades a usar, em gramas. O material utilizado pode ser observado na Figura 32.

O PDMS, com o respetivo rácio, é colocado dentro da seringa de vidro de 5 mL, que está conectada à agulha hipodérmica por meio de tubos e injetado com um caudal constante de $Q = 0,04 \text{ mL/h}$.

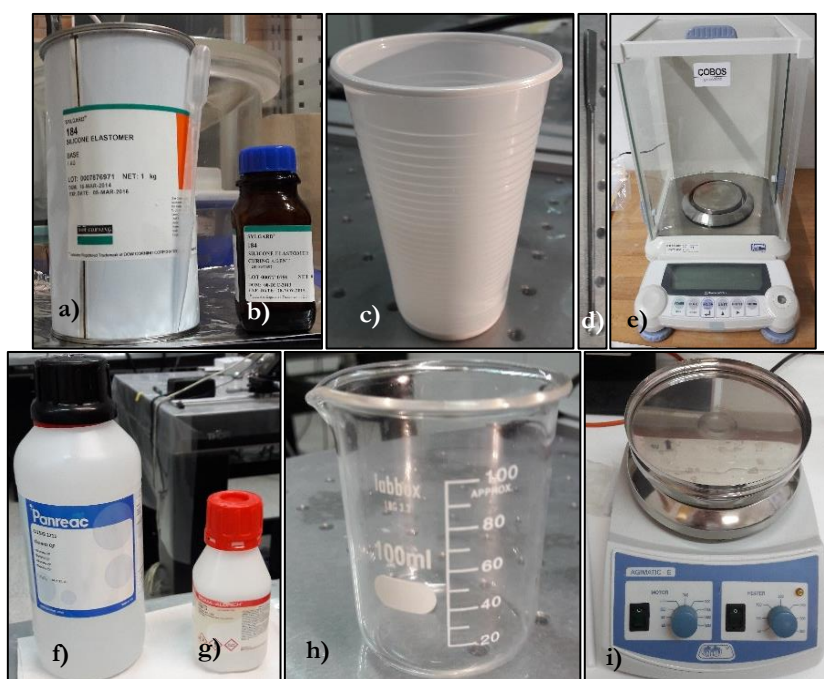


Figura 32 - Material necessário para a preparação do PDMS: a) parte A (base); b) parte B (agente de cura); c) copo de plástico; d) espátula; e) balança; e do banho no qual o capilar de vidro é emergido: f) glicerina; g) surfactante *Brij 30*; h) goblé de vidro; i) agitador.

Dentro da célula colocou-se o banho de glicerina e surfactante, cobrindo o capilar de vidro (Figura 33) o qual está conectado a uma seringa de vidro *Hamilton* que se encontra na bomba de sucção, que succionava o banho juntamente com as gotas produzidas com um caudal de $Q = 2 \text{ mL/h}$.

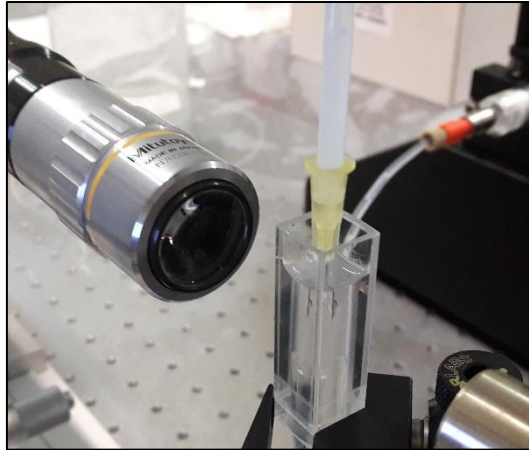


Figura 33 - Banho dentro da célula cobrindo o capilar de vidro.

Para terminar o processo, a amostra obtida com as gotas produzidas foi transferida para um goblé que se colocou numa placa de aquecimento, a uma temperatura aproximada de 70° / 80° C (Figura 34) durante 18 horas, aproximadamente, para se obter as partículas em estado sólido, ou seja, procedeu-se à cura por temperatura das gotas de PDMS produzidas.



Figura 34 - Partículas de PDMS no processo de cura a 70° / 80° C.

Produção de partículas de cor

Para a produção de partículas de cor, o material utilizado foi o mesmo anteriormente descrito na produção de partículas de PDMS. Relativamente às partículas de cor vermelha, adicionou-se um pigmento vermelho apropriado para silicones (*PP SIL RO-1, Plastiform*) cuja viscosidade é 0,15 Pa.s. Para fabricar as partículas cinzentas utilizou-se um PDMS *Sylgard® 170 silicone elastomer (Dow Corning)* já com cor cinzenta, sendo

a parte A de cor preta e a parte B de cor bege, com valores de viscosidade na ordem de 3,56 Pa.s (Figura 35).

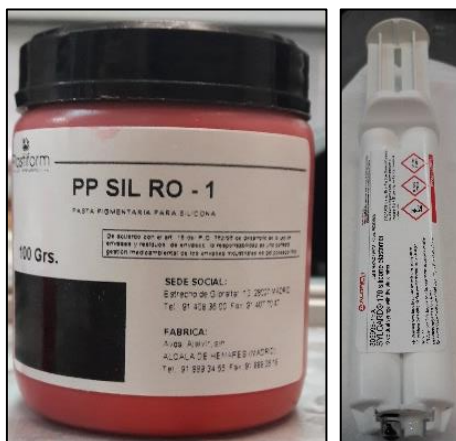


Figura 35 - Pigmento vermelho (*PP SIL RO-1, Plastiform*) utilizado para corar o PDMS; PDMS cinzento (*Sylgard® 170 silicone elastomer - Dow Corning*).

Para a produção das partículas de cor vermelha, o corante/pigmento foi misturado, primeiramente, com a parte A do PDMS e só depois se adicionou a parte B, misturando tudo até ficar um fluido homogêneo. A razão de proporção utilizada foi, no PDMS, [10:1] com 20%, em massa (w/w), de corante. Em relação às partículas cinzentas, o rácio utilizado no PDMS foi de [1:1], uma vez que este vinha numa seringa que, ao pressionar o embolo, administrava a mesma quantidade quer de parte A quer de parte B. Todo o restante processo foi igual ao procedimento descrito anteriormente.

Na Figura 36 pode-se observar duas fases do procedimento comum em todos os testes, ou seja, a produção das gotas dentro do capilar bem como a nuvem formada após a sucção destas gotas para a seringa de vidro.

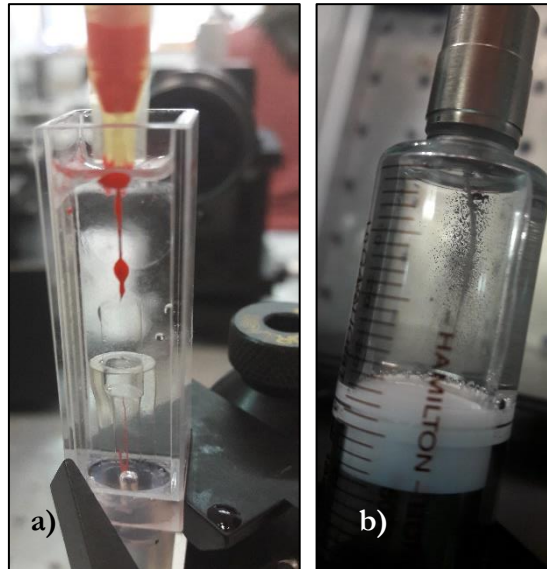


Figura 36 - Demonstração da produção de partículas de cor, o qual é comum também na produção de partículas com PDMS normal: a) agulha inserida no capilar de vidro com o PDMS corado e visualização de um "fio" de gotas acumuladas no fundo do capilar; b) observação da nuvem de gotas cinzentas na seringa de sucção, as quais estão prontas para serem curadas.

Processo de filtração das partículas de PDMS

Depois da cura das gotas de PDMS na solução de glicerina, estas foram transferidas, novamente, para o capilar de vidro (Figura 37), para se poderem visualizar no computador, a fim de se medir o seu diâmetro depois da cura, como demonstrado no Anexo A.

Em seguida procedeu-se ao processo de separação das partículas do banho de glicerina.



Figura 37 - Capilar emergido em glicerina.

Para a separação das partículas foi utilizada uma bomba de vácuo a qual estava ligada a um depósito com um funil de cerâmica onde se colocou filtros de fibra de vidro com poros de 1,2 μm , através dos quais se faz a sucção do fluido por vácuo, ficando as

partículas na parte superior do filtro. Foi ainda efetuada uma segunda passagem de água destilada para uma melhor limpeza das partículas. O filtro com as partículas depositadas sobre o mesmo, é lavado com isopropanol fazendo escorrer para uma placa de *Petri* as partículas. Estas ficam depositadas na placa de *Petri* podendo ser raspadas e suspensas em outros meios. Todo este material está representado na Figura 38.

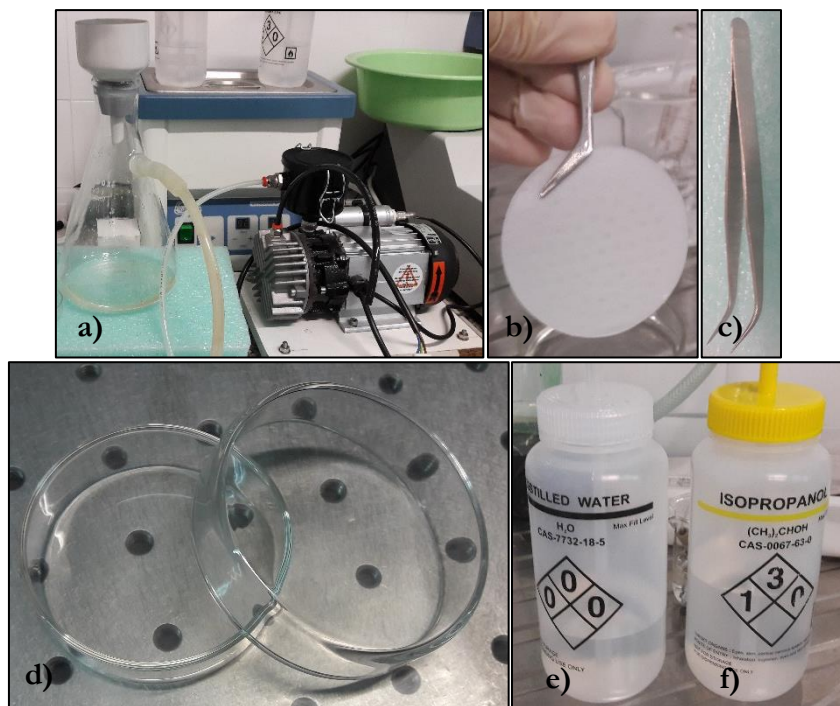


Figura 38 - Material utilizado na filtração das partículas: a) bomba de vácuo; b) filtros de fibra de vidro com poros de 1,2 μm ; c) pinça; d) placas de *Petri*; e) água destilada; f) isopropanol.

4.2. Apresentação e discussão dos resultados

4.2.1. Análise da redução do tamanho das partículas de PDMS: variação do rácio

Foram feitos vários estudos a fim de se analisar a redução do diâmetro das micropartículas fabricadas, ou seja, compreender o que mais afeta a redução do tamanho do diâmetro, após a cura, das gotas de PDMS. Para isso efetuaram-se diversos testes variando o rácio do PDMS. Utilizou-se o rácio de [10:1], cuja viscosidade ronda os 3,02 Pa.s e o rácio de [8:2] com uma viscosidade aproximada de 1,64 Pa.s. Em cada rácio variou-se, também, o tamanho da gota (D_d), para se poder efetuar uma comparação com estudos anteriormente realizados por Muñoz-Sánchez, *et al.* 2016, manipulando a posição

Z da agulha: D_d aumenta à medida que Z também aumenta, isto é, à medida que a agulha é movida a jusante dentro do capilar de vidro o tamanho da gota também aumenta.

Estes estudos anteriores foram efetuados com rácio de PDMS de [6:4], o qual apresenta uma viscosidade de 0,62 Pa.s, onde foram produzidas gotas de, aproximadamente, 6, 10 e 21 μm (Muñoz-Sánchez, et al. 2016).

Os valores da viscosidade dos diferentes rácios estão apresentados na figura seguinte (Figura 39), os quais foram estimados através do reómetro utilizado para obter as curvas reológicas das suspensões das partículas.

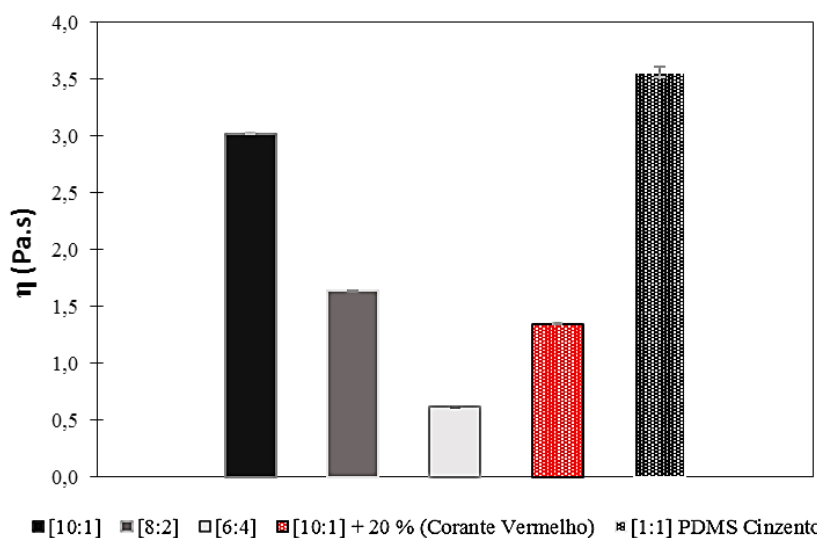


Figura 39 - Representação dos valores da viscosidade para os diferentes rácios e para os PDMS corados.

Rácio de [10:1]

Com o rácio de [10:1] foram efetuados três testes para se obterem três tamanhos de partícula. Foram então produzidas gotas de tamanho aproximado de 7,37 μm , 11,16 μm e 21,54 μm , as quais foram curadas, filtradas e colocadas em caixas de *Petri*, devidamente identificadas. Este rácio é, de todos os estudados, o mais viscoso.

A Figura 40 mostra a probabilidade do tamanho do diâmetro das gotas fabricadas e das partículas depois da cura, para os três tamanhos. Através da Figura 40 - a), observa-se que a média de tamanho das gotas era de 7,37 μm , passando a ser, após a cura, de 5,73 μm ; na Figura b) verifica-se uma média de tamanho de 11,16 μm e após estas gotas terem sido sujeitas à cura, verifica-se uma diminuição de tamanho, para 8,02 μm ; na Figura c) a média de tamanho das gotas era de 21,54 μm passando a ser, depois da cura, de 6,67 μm .

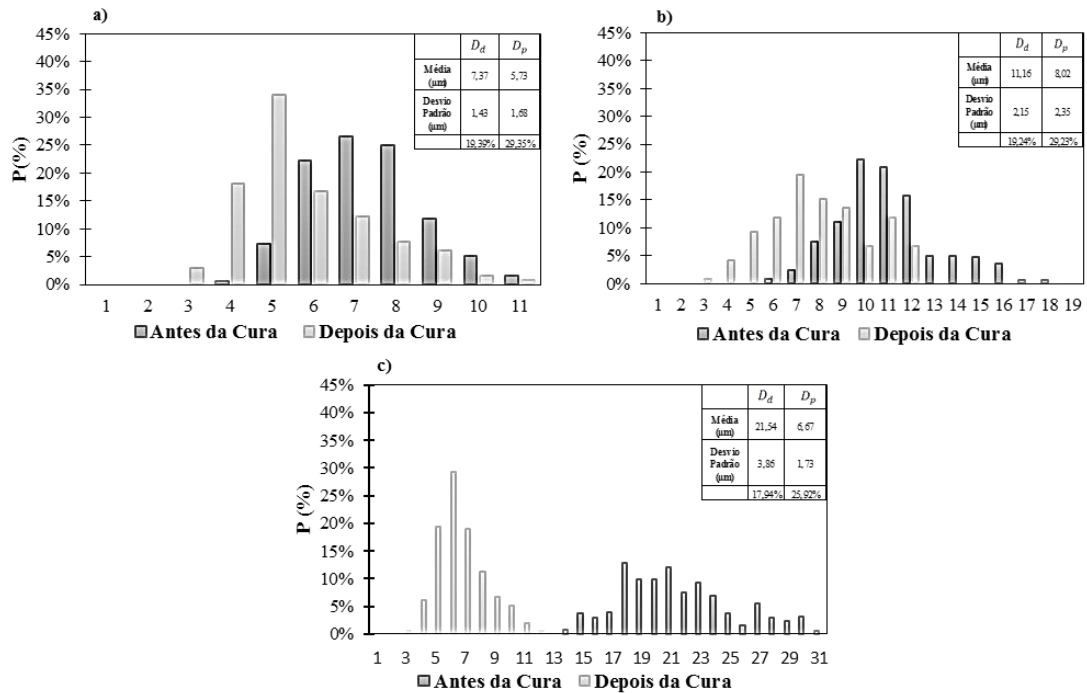


Figura 40 - Resultados experimentais relativamente a gotas produzidas com PDMS com rácio de [10:1], com tamanho médio de: a) 7,37 μm ; b) 11,16 μm ; c) 21,54 μm , antes da cura.

Ainda na Figura 40 – c), verifica-se que há uma maior descida da média do tamanho das partículas, ou seja, quanto maior o tamanho inicial da gota, maior é a sua redução do diâmetro após o tratamento com temperatura.

Rácio de [8:2]

Para este rácio, [8:2], procedeu-se de igual forma que para o rácio anterior. As gotas foram igualmente produzidas em três testes diferentes para obter os tamanhos aproximados de 7,89 μm , 10,60 μm e 20,30 μm .

Na Figura 41 é representado o resultado do tamanho das partículas produzidas, verificando-se, de igual forma ao caso do rácio [10:1], que ocorre um decréscimo da média de tamanho das gotas, após serem sujeitas à cura com temperatura. Verifica-se, também, que as gotas com maior tamanho, 20,30 μm , sofreram maior redução do seu diâmetro, atingindo a dimensão média de 5,06 μm .

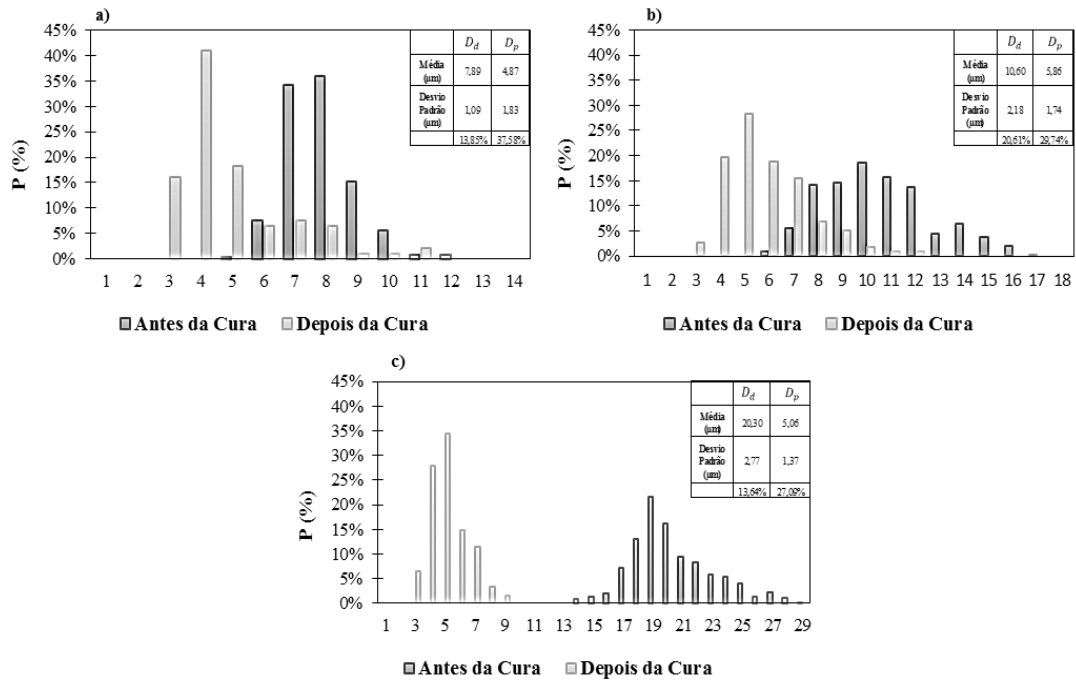


Figura 41 - Resultados experimentais relativamente a gotas produzidas com PDMS com rácio de [8:2] com tamanho médio de; a) 7,89 µm; b) 10,60 µm; c) 20,30 µm, antes da cura.

Rácio de [6:4]

Os resultados apresentados na Figura 42 foram utilizados como termo de comparação com os estudos efetuados anteriormente por Muñoz-Sánchez, *et al.* 2016, sendo que as conclusões são as mesmas obtidas pelos testes realizados no decorrer deste trabalho para os rácios de [10:1] e [8:2], ou seja, há uma redução de tamanho das gotas depois de serem sujeitas à cura para os três tamanhos diferentes, sendo que, também para as gotas de maior dimensão, a redução é mais significativa.

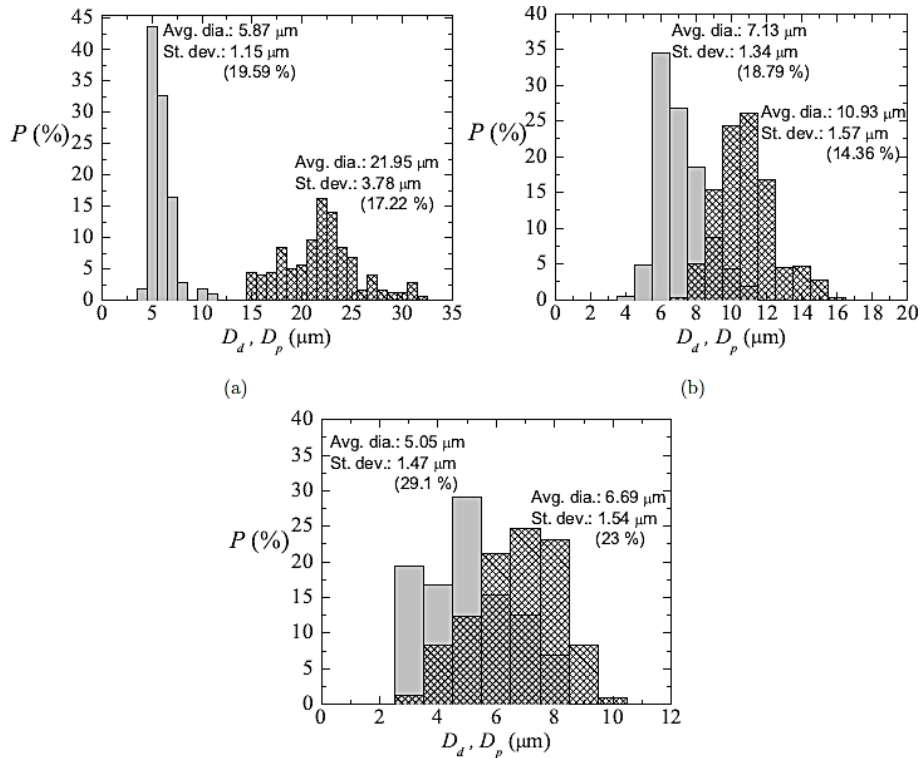


Figura 42 - Representação dos resultados experimentais do fabrico de partículas antes e depois da cura, realizado com PDMS com rácio de [6:4] (Muñoz-Sánchez, et al. 2016).

Coefficiente de redução do tamanho das partículas com diferentes rácios

A redução do tamanho das gotas quando passam do estado líquido (D_d) para o estado sólido (D_p) foi então calculada através do coeficiente de redução (C_s), o qual é dado pela fórmula seguinte:

$$C_s = \frac{D_d - D_p}{D_d} \times 100, \quad \text{Eq. (8)}$$

onde D_d é a média de tamanho da gota antes da cura e D_p é a média de tamanho da partícula após a cura.

Através da análise do Figura 43 conclui-se que há uma tendência comum no que diz respeito ao coeficiente de redução de tamanho, sendo que, as partículas produzidas com rácio de [8:2] têm uma pequena variação em relação à linha de tendência de redução de tamanho dos outros rácios.

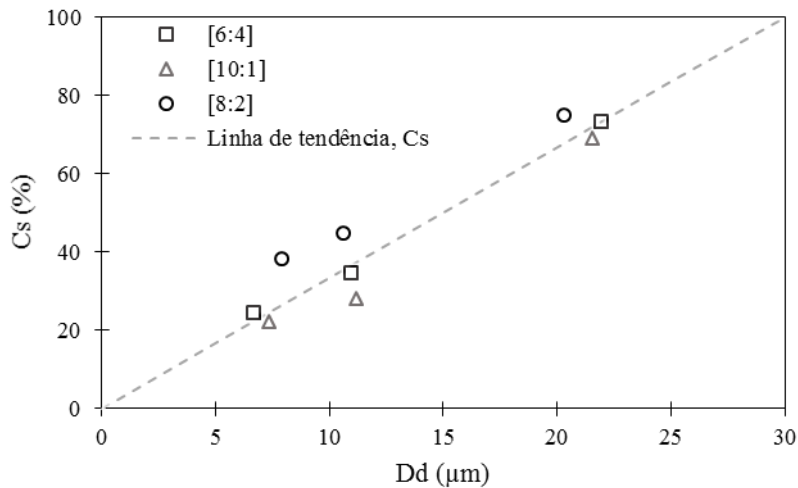


Figura 43 - Coeficiente de redução de tamanho das partículas com diferentes raios de produção, mostrando a linha de tendência da redução do tamanho, ou seja, $C_s = \frac{10}{3}D_d$, com D_d a variar entre 0 μm e 30 μm .

Pode-se concluir que a existência de maior ou menor quantidade de agente de cura na solução final de PDMS não tem uma influência significativa na redução do tamanho das partículas, ou seja, na redução do seu tamanho após a cura. A redução foi sempre maior para as partículas de maior dimensão independente do rácio do PDMS utilizado. Na Tabela 1 estão discriminados todos os valores para se ter uma melhor percepção.

Tabela 1 - Dados das partículas com diferentes raios: D_d - diâmetro antes da cura, D_p - diâmetro após a cura, C_s - coeficiente de redução do tamanho das partículas.

Rácio	D_d (μm) (antes da cura)	D_p (μm) (depois da cura)	C_s (%)
[10:1]	7,37	5,73	22
	11,16	8,02	28
	21,54	6,67	69
[8:2]	7,89	4,87	38
	10,60	5,86	45
	20,30	5,06	75
[6:4]	6,69	5,05	25
	10,93	7,13	35
	21,95	5,87	73

Gotas de maiores dimensões com rácio de [6:4]

Foram produzidas gotas de PDMS de maior tamanho, nomeadamente de 32 μm e 56 μm , para se poder verificar a influência do tamanho destas na redução do tamanho após a cura. As condições de produção foram iguais às anteriores já descritas, ou seja, um

banho de glicerina com surfactante (rácio [9:1]), caudal de injeção do PDMS igual a 0,04 mL/h e caudal de sucção igual a 2 mL/h. Para termos um termo de comparação mais fiável, foi utilizado um rácio de [6:4] na preparação do PDMS.

Assim, a Figura 44 mostra o resultado antes e após a cura destas partículas.

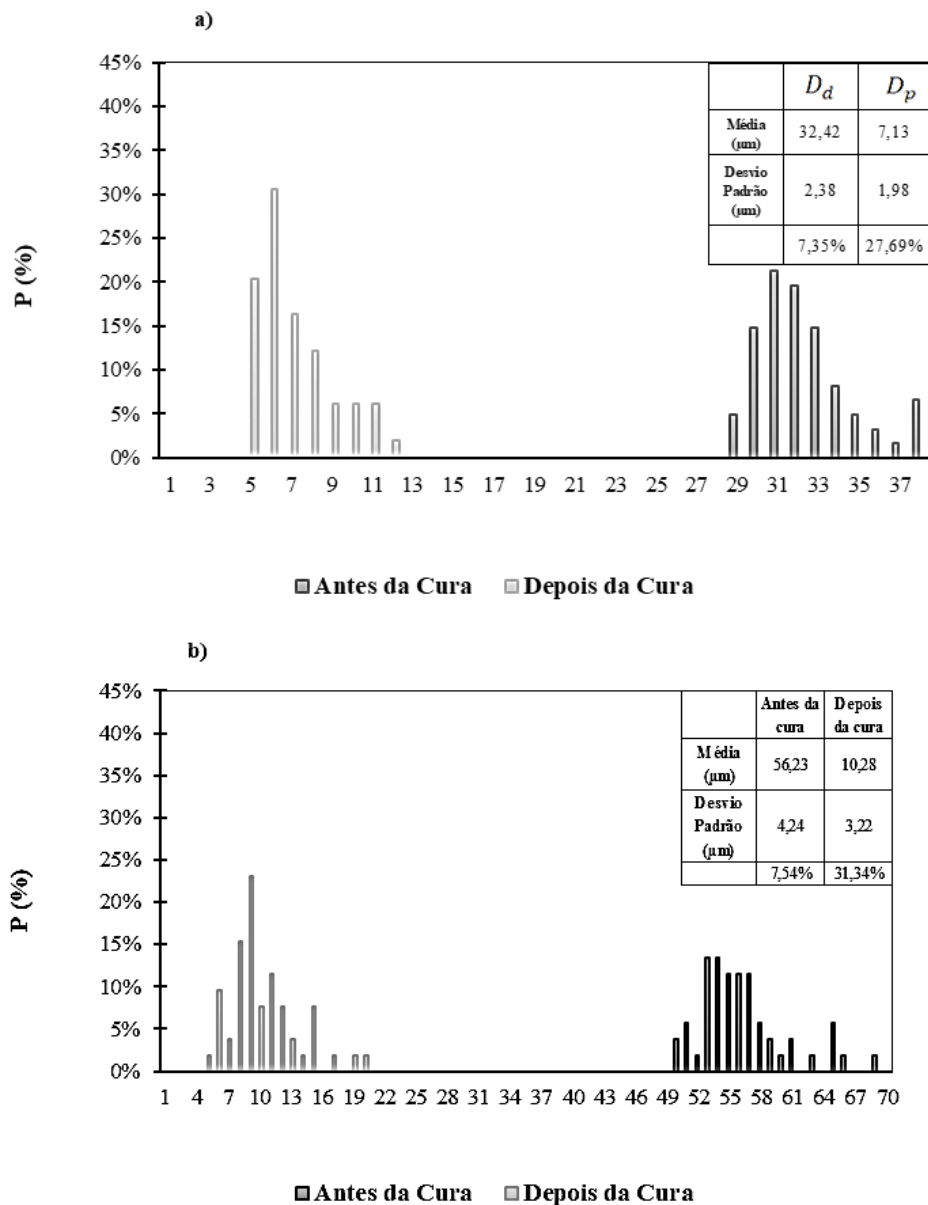


Figura 44 - Resultados experimentais relativamente a partículas produzidas com PDMS com rácio de [6:4], com tamanho médio de: a) 32,42 µm e b) 56,23 µm, antes da cura.

Tal como se verificou anteriormente para as partículas de maior tamanho de, aproximadamente, 21 µm, verifica-se também que as partículas reduzem em dimensão, para valores relativamente pequenos. Na Figura 44 - a) pode-se observar que o tamanho das gotas de 32 µm, aproximadamente, reduziram para valores médios de 7 µm; assim

como na Figura 44 - b) se verifica que o tamanho das gotas de 56 μm reduziram até 10 μm , aproximadamente.

Coefficiente de redução total das partículas produzidas com rácio de [6:4]

Assim como se calculou o coeficiente de redução para os diferentes rácios de produção, também se calculou para as partículas de maior tamanho com rácio de [6:4] para se poder concluir se este coeficiente continuaria a aumentar com o aumento de tamanho das gotas de PDMS ou se atinge um valor estável.

Através da Figura 45 podemos verificar que, a partir de um certo tamanho de gota ocorre uma estabilização no coeficiente de redução, ou seja, para gotas grandes o coeficiente de redução ronda os 80 %.

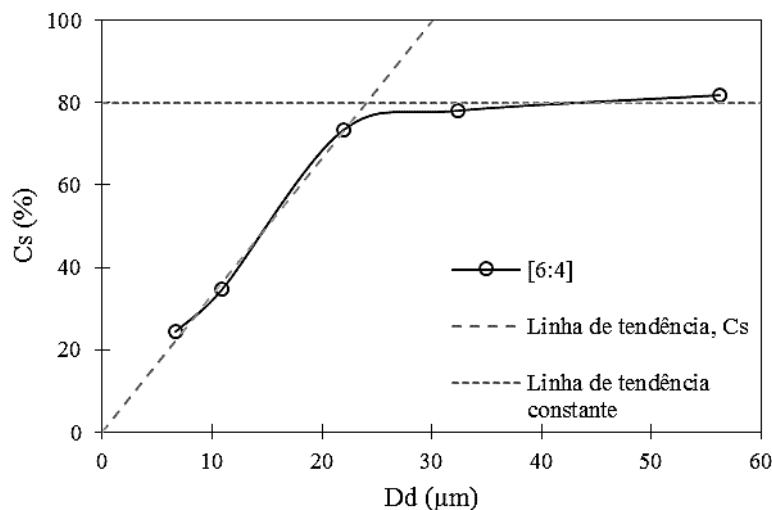


Figura 45 - Coeficiente de redução do tamanho das partículas com rácio de [6:4], representando a linha de tendência de encolhimento para partículas de menor dimensão $C_s = \frac{10}{3} D_d$, assim como a linha de tendência constante para as partículas de maior tamanho, que se situa nos 80 %.

As gotas com tamanho médio de 6,69 μm têm um $C_s = 24,51$ %, as de 10,93 μm , um $C_s = 34,77$ % e as de 21,95 μm um $C_s = 73,26$ %. Nesta fase há uma transição, em que gotas com tamanho médio de 32,42 μm têm um $C_s = 78,01$ % e as de 56,23 μm um $C_s = 81,71$ %. Estes dados podem ser verificados na Tabela 1 e Tabela 2.

Tabela 2 - Dimensões das partículas antes e depois da cura com tamanho de 30 μm e 50 μm , aproximadamente, e o seu coeficiente de redução respectivo, produzidas com rácio de [6:4].

Rácio	Dd (μm) (antes da cura)	Dp (μm) (depois da cura)	Cs (%)
[6:4]	32,42	7,13	78
	56,23	10,28	82

Pode-se, então, dizer que a lei $C_s = \frac{10}{3} \overline{D_d}$, demonstrada recentemente por Muñoz-Sánchez, *et al.* 2016, se cumpre com gotas de tamanho até 25 μm , aproximadamente. A partir deste tamanho, o coeficiente de redução tende a ficar constante.

4.2.2. Testes efetuados com corantes/pigmentos

Para se conseguir perceber qual ou quais os corantes viáveis a utilizar para a fabricação de partículas coradas realizaram-se alguns testes. A produção de partículas com cor poderá facilitar a visualização das mesmas em microscopia.

A Figura 46 mostra as diferentes amostras de PDMS obtidas, assim como a Figura 47 mostra o porquê de os corantes/pigmentos não servirem para o pretendido.

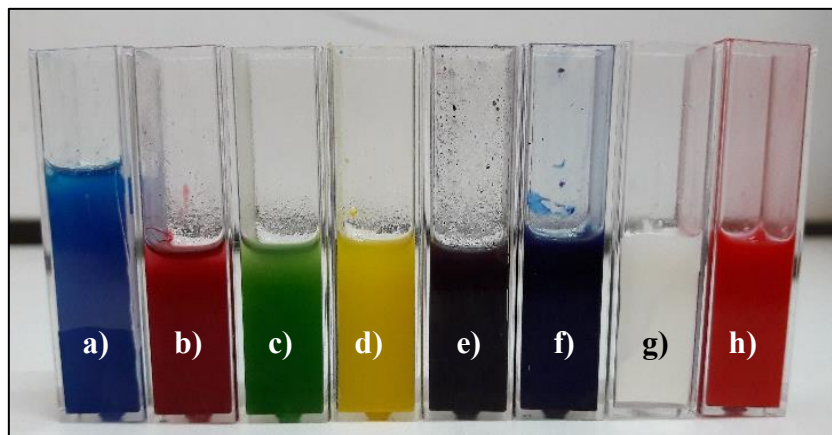


Figura 46 - Diferentes amostras obtidas após se misturar os corantes/pigmentos com o PDMS: corante alimentar (*Dr. Oetker*) (a) azul, (b) vermelho, (c) verde e (d) amarelo; (e) pigmento fluorescente rosa (pó solúvel em água de *Rosa BTE. HISPACID B-250%, Robama*); (f) pigmento azul (*AZUL HISPALIT HL-HB PASTA – 170%, Robama*); (g) pigmento branco (*FINE WHITE 7006, Eastern Chemicals*) e (h) pigmento vermelho para silicões (*PP SIL RO-1, Plastiform*).

O corante/pigmento foi misturado, primeiramente, com a parte A do PDMS e só depois se adicionou a parte B, misturando tudo até ficar um fluido homogêneo. A razão de proporção utilizada foi [10:1] com 4% em massa de corante.

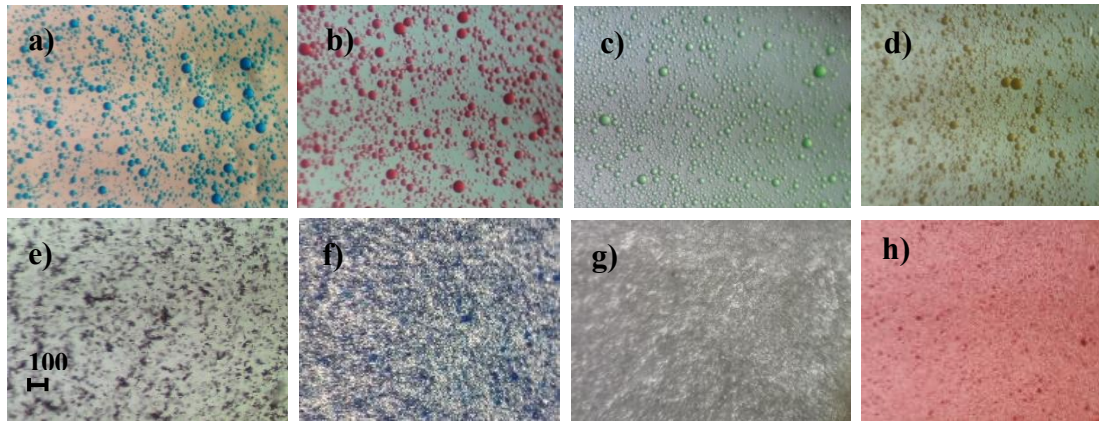


Figura 47 - Imagens representativas das microestruturas resultantes da mistura dos corantes/pigmentos com o PDMS, obtidas através de um microscópio standard, após as amostras estarem curadas. Cada uma representa a amostra da Figura 46.

Os resultados obtidos (Figura 47) mostram que, de um modo geral, estes corantes/pigmentos não são viáveis pois não são solúveis no PDMS, uma vez que formam partículas maiores que as partículas pretendidas de PDMS. As duas hipóteses mais suscetíveis são as hipóteses (g) e (h) uma vez que a mistura parece mais homogénea.

Procedeu-se então à produção de partículas com estes dois pigmentos ((g) pigmento branco (*FINE WHITE 7006, Eastern Chemicals*) e (h) pigmento vermelho para silicones (*PP SIL RO-1, Plastiform*)) e verificou-se que, também estes, não são viáveis, pois o que acontece é um encapsulamento dos pigmentos dentro das gotas de PDMS, não ficando estas totalmente coradas.

A Figura 48 - a) mostra gotas de PDMS corado com o pigmento branco com 3%, em massa; a Figura 48 - b) e c) mostra gotas coradas com o pigmento vermelho, a primeira com 3% e a segunda com 20% de corante, em massa. Em ambos os casos, observa-se o encapsulamento de pigmentos dentro das próprias gotas, concluindo-se que o PDMS não fica totalmente corado.

Produziram-se, no entanto, partículas coradas, utilizando apenas o pigmento vermelho *PP SIL RO-1, Plastiform* com 20% em massa com PDMS de rácio [10:1], e outras com o PDMS cinzento *Sylgard® 170 silicone elastomer (Dow Corning)*.

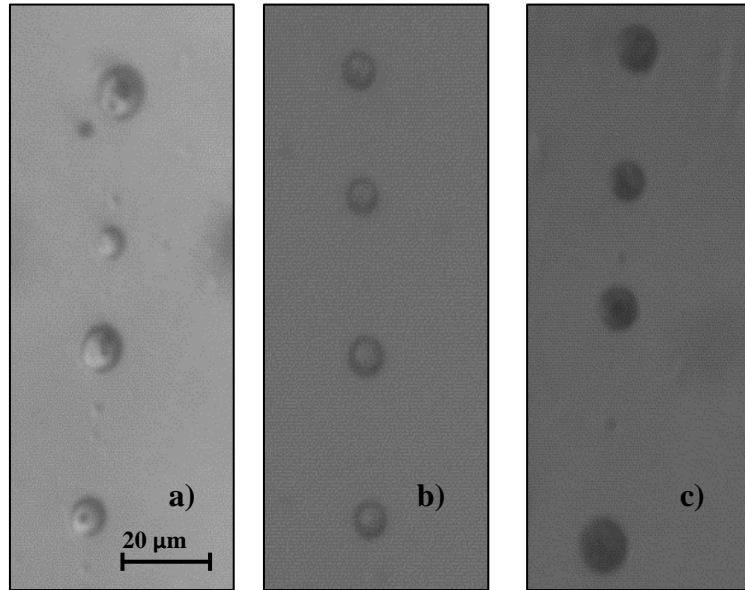


Figura 48 - Partículas fabricadas com (a) pigmento branco (*FINE WHITE 7006, Eastern Chemicals*), (b) pigmento vermelho para silicones (*PP SIL RO-1, Plastiform*) a 3 % wt e (c) com pigmento vermelho para silicones (*PP SIL RO-1, Plastiform*) a 20 % wt.

Partículas de PDMS produzidas com pigmento vermelho

A Figura 49 representa a percentagem média do tamanho das partículas fabricadas com PDMS numa razão de [10:1] ao qual foi adicionado corante vermelho numa percentagem de 20%, em massa. Tal como aconteceu nos testes efetuados anteriormente, verifica-se que também há uma redução do tamanho das gotas após a sua cura, sendo que o tamanho médio das partículas passou de 12,43 µm para 7,70 µm.

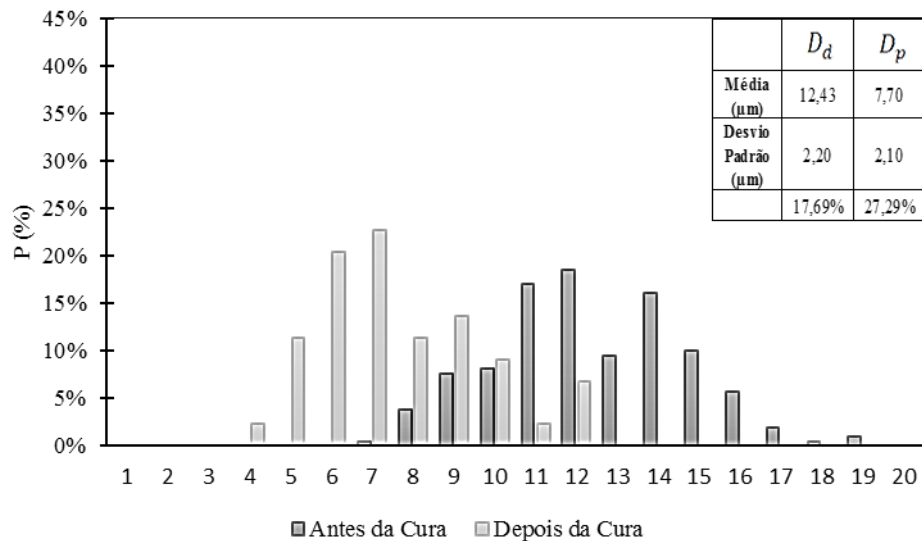


Figura 49 - Resultados experimentais relativamente a gotas produzidas com PDMS com rácio de [10:1] e com 20%, em massa, de corante vermelho *PP SIL RO-1, Plastiform*, com tamanho médio de 12,43 µm antes da cura.

Através da Tabela 3 pode-se comparar o tamanho das partículas com e sem corante. Verifica-se que o coeficiente de redução tem uma diferença de 10 %, sendo que para partículas sem corante o seu valor é de 28 % enquanto que para partículas com corante é 38 %. No Anexo B encontram-se mais dados sobre a redução de tamanho das partículas de cor.

Tabela 3 - Dados de comparação de partículas com tamanho médio de 11 μm , com rácio de [10:1], com e sem a utilização de corante *PP SIL RO-1, Plastiform*.

Rácio	Dd (μm) (antes da cura)	Dp (μm) (depois da cura)	Cs (%)
[10:1] sem corante	11,16	8,02	28
[10:1] com corante	12,43	7,70	38

Contudo, esta diferença não é significativa, o que leva a concluir que também o corante não influencia na redução de tamanho das partículas.

De maneira a comprovar que as partículas teriam algum tipo de cor, fez-se um teste estático com a ajuda de um microscópio com uma câmara a cores, observando-se uma certa pigmentação, como é demonstrado Figura 50.

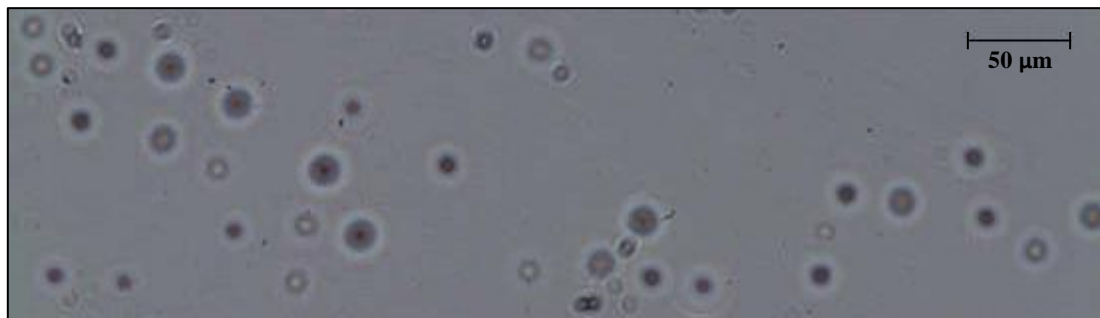


Figura 50 - Partículas produzidas com o corante vermelho com 20 % em massa.

Partículas produzidas com o PDMS cinzento

Como já referido, também foram fabricadas partículas com o PDMS cinzento *Sylgard® 170 silicone elastomer (Dow Corning)*. Mas tal como já foi demonstrado anteriormente com os outros corantes/pigmentos estudados, este PDMS também não fica totalmente preenchido com cor, como se pode verificar através do jato formado quando

da produção, observando-se pequenos pigmentos dispersos, o qual esta representado na Figura 51.

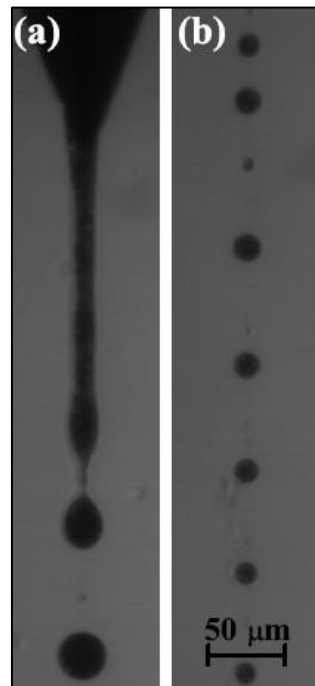


Figura 51 - Partículas produzidas com o PDMS Sylgard® 170 silicone elastomer (Dow Corning): a) jato formado através da agulha hipodérmica durante o processo de fabrico; b) partículas formadas com diâmetro, aproximado, de 15 μm.

Contudo, procedeu-se à produção de partículas com este PDMS, uma vez que se tratava de um material aparentemente diferente. Foram então obtidas gotas de dois tamanhos diferentes: 12 μm e 22 μm, aproximadamente.

Analisando a Figura 52, pode-se concluir que o coeficiente de redução de tamanho destas partículas segue, também, a tendência anteriormente abordada, o que significa que também este tipo de PDMS não interfere na redução de tamanho das partículas.

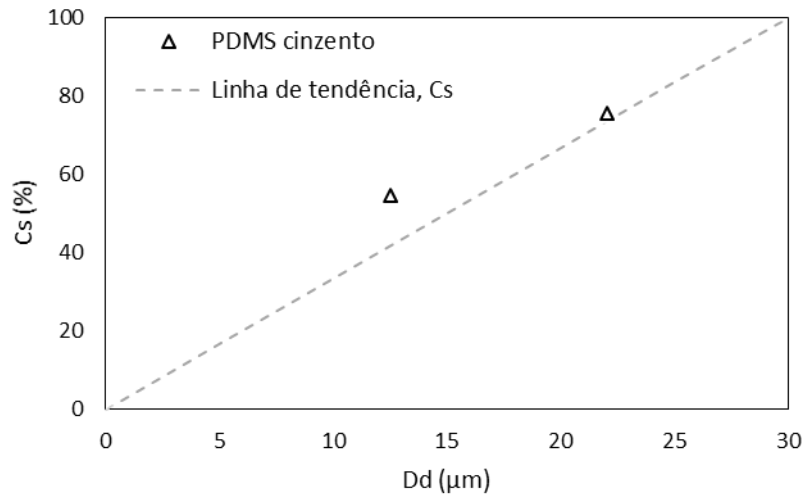


Figura 52 - Coeficiente de redução do tamanho das partículas produzidas com o PDMS cinzento, representando também a linha de tendência de Cs.

Assim como nas partículas vermelhas, também com estas partículas se fez um teste estático que serviu para mostrar a tonalidade da cor, como mostra a Figura 53. Uma característica que se verificou nestas partículas, é que se encontravam em aglomerados.



Figura 53 - Partículas produzidas com o PDMS cinzento.

Capítulo 5

Microfabricação, escoamentos em microcanais e análise reológica das suspensões de partículas de PDMS

Para se fazer a análise do comportamento das partículas de PDMS em escoamento, fabricaram-se microcanais em PDMS, ou seja, um microcanal com uma contração hiperbólica, podendo-se assim visualizar a deformação sofrida pelas micropartículas. Foram ainda efetuados testes de reologia com o objetivo de se obter as curvas de viscosidade das suspensões das micropartículas. Todos os dados foram ainda comparados com resultados obtidos para suspensões de glóbulos vermelhos humanos.

Como tal, neste capítulo, é descrito o método utilizado para a fabricação dos canais, assim como o procedimento utilizado para o estudo reológico e para as visualizações do escoamento das micropartículas. São apresentados e discutidos os resultados obtidos. São ainda apresentados dados preliminares da camada livre de partículas (CP) formada junto à parede dos microcanais.

5.1. Procedimento experimental para escoamentos e análise reológica

Neste estudo, a técnica utilizada para o fabrico dos microcanais com contração hiperbólica é a litografia suave proposta por Pinto, *et al.* 2014, sendo que, para a fabricação dos moldes dos microcanais são utilizados materiais e equipamentos mais económicos em relação à litografia suave comum, contudo, com igual viabilidade como já referido, por Pinto, *et al.* 2014.

5.1.1. Produção dos microcanais com PDMS

Para a fabricação dos microcanais, começou-se por preparar o PDMS, com um rácio de [10:1]. À semelhança do que se procedeu no fabrico das micropartículas, misturou-se

ambas as partes do PDMS até ficarem homogêneas e colocou-se no exsiccador para retirar todo o ar formado durante a mistura.

O passo seguinte foi colocar o PDMS [10:1] dentro da placa de *Petri* onde estavam os moldes dos microcanais, como se podem observar na Figura 54, e levar à estufa com uma temperatura de 80° C durante 20 minutos. Terminado este tempo, o PDMS torna-se sólido e é removido com a ajuda de um x-ato de cima do molde, obtendo-se assim uma cópia dos microcanais. Este passo foi repetido até obter dispositivos suficientes para os testes a efetuar.

Uma outra vantagem desta técnica de litografia suave proposta por Pinto, *et al.* 2014 é que não é necessário efectuar a silanização do molde dos microcanais com triclorosilano (o qual é um químico tóxico) para facilitar o desmolde, à vista do que acontece com os moldes obtidos pela litografia suave comum.

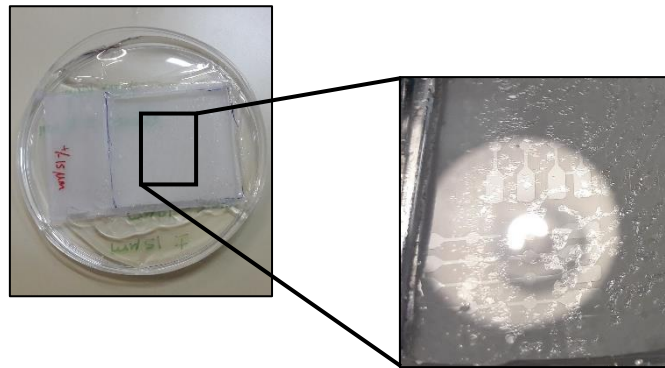


Figura 54 - Caixa de *Petri* com os moldes dos microcanais em destaque.

O molde utilizado possui uma sequência de microcanais cujas dimensões estão representadas na Figura 55: uma entrada de 400 μm seguida de uma contração hiperbólica com a dimensão mais pequena de 12 μm seguida de uma expansão com 400 μm . Estas dimensões proporcionam um *Hencky Strain* de 3.5 ($\epsilon_H = \ln(400/12)$), tendo sido demonstrado por vários autores (Rodrigues, *et al.* 2016, Faustino, Pinho, *et al.* 2014, Faustino, Pinho, *et al.* 2014) que um valor ideal para se efetuar uma análise eficaz e precisa da deformabilidade dos GVs, sendo que neste trabalho também é efetuado a análise de deformação das micropartículas de PDMS produzidas.

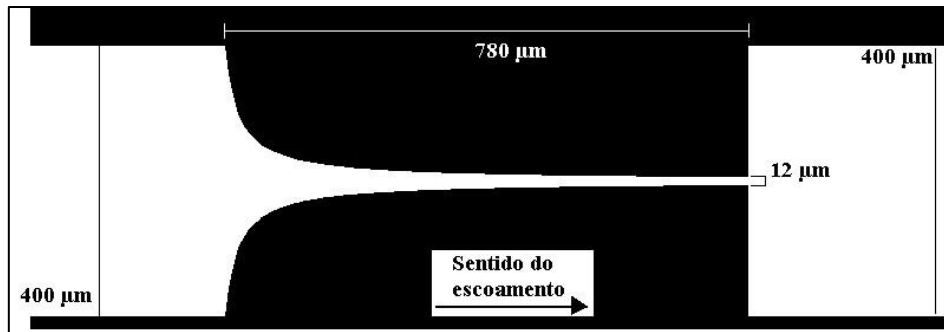


Figura 55 - Representação esquemática do microcanal com contração hiperbólica (profundidade de 15 µm) com as suas respetivas dimensões.

Com as réplicas dos moldes em PDMS obtidos, foi efetuado o furo de entrada e saída com recurso a uma ponta. Posteriormente foram guardados em fita-cola para retirar e proteger da sujidade.

Para a selagem dos microcanais foi necessário preparar lamelas de vidro, as quais foram lavadas e colocadas no *Spin Coater* (Figura 56 – a)). Ao ligar a bomba de vácuo, as lamelas de vidro fixam-se ao rotor do equipamento. Uma pequena colher de PDMS, a rácio de [20:1], é depositado sobre a lamela de vidro e o *Spin Coater* gira com um programa tipo rampa, ou seja, um minuto a 4000 rpm mais um minuto a 5000 rpm. Ao girar a estas velocidades o PDMS é espalhado uniformemente sobre a lamela obtendo-se uma fina camada. Esta lâmina é levada também à estufa a 80° C durante 20 min.

Decorrido este tempo, colocaram-se as réplicas dos microcanais sobre as lâminas e foram levados novamente para a estufa a 80° C, durante, aproximadamente, 18 horas para que os dispositivos fabricados ficassem totalmente curados e selados. Um exemplo de um dispositivo pronto pode ver-se na Figura 56 – b).

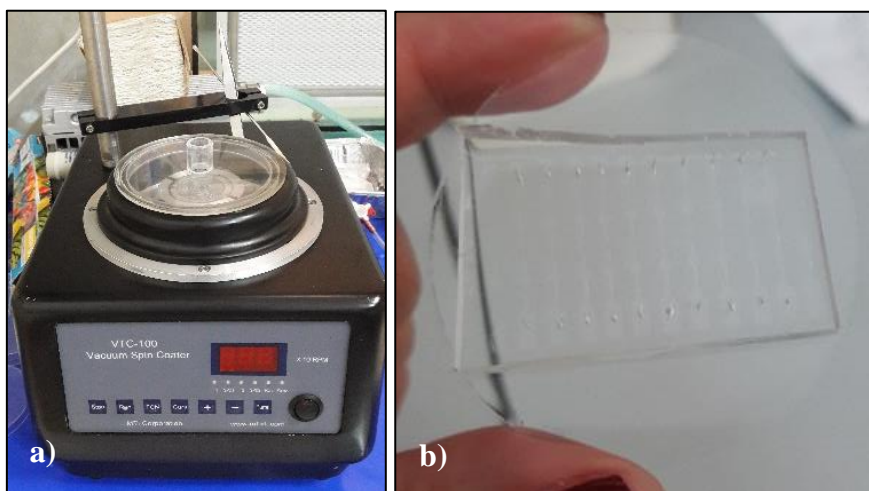


Figura 56 - a) *Spin Coater*; b) Exemplo de um dispositivo com os microcanais selado pela lamela de vidro.

5.1.2 Produção do fluido de trabalho

Para o estudo do escoamento e análise reológica das suspensões das micropartículas foi necessário criar um fluido de trabalho análogo às suspensões de glóbulos vermelhos.

Este fluido de trabalho consiste em Dextrano 40 (Dx 40) com as partículas de PDMS produzidas em suspensão. Para isso começou-se por preparar uma solução de 50 mL de Dx 40: num goblé pesou-se 5 g de Dx 40 (em pó), pois a quantidade desta substância na solução final é de 10 %, e dissolveu-se em água destilada. Num balão volumétrico colocou-se a mistura e adicionou-se mais água destilada até perfazer o volume pretendido (50 mL), como mostra a Figura 57 – a).

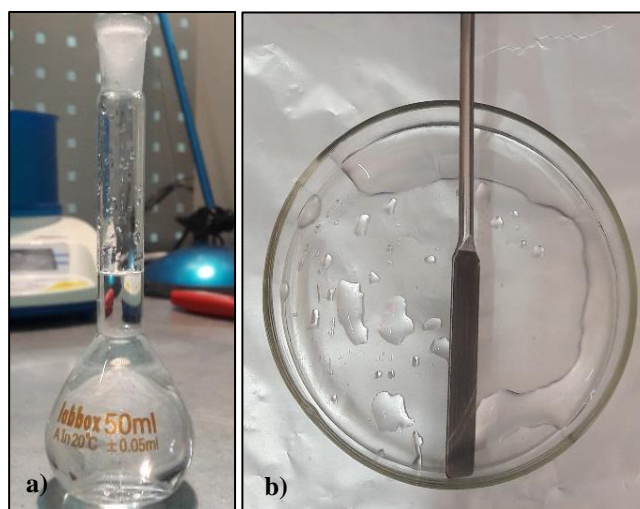


Figura 57 - a) Balão de medição com a solução de Dextrano 40; b) Caixa de Petri com Dx 40 e as partículas.

Consoante as partículas de PDMS, ou seja, segundo a sua dimensão, que se queriam analisar foi adicionado à respetiva caixa de *Petri*, 2 mL de Dx 40. Raspou-se as partículas com uma espátula (Figura 57 – b)) e recolheu-se o fluido, o qual já possuía as partículas em suspensão.

5.1.3. Escoamento das partículas

As visualizações dos escoamentos das partículas foram efetuadas nos dispositivos fabricados utilizando um sistema de microscopia. Esse sistema de microscopia é constituído por um microscópio invertido, uma bomba de injeção (*PHD Ultra, Harvard Apparatus, USA*) e uma câmara de alta velocidade. Os componentes descritos estão representados na Figura 58.



Figura 58 - *Setup* de visualização do escoamento do fluido: a) câmara de alta velocidade; b) bomba de seringa; c) microscópio invertido.

O dispositivo é colocado na platina do microscópio e fixado com fita-cola para não se mover (Figura 59). A objetiva escolhida foi de 20x com zoom de 1,6x.

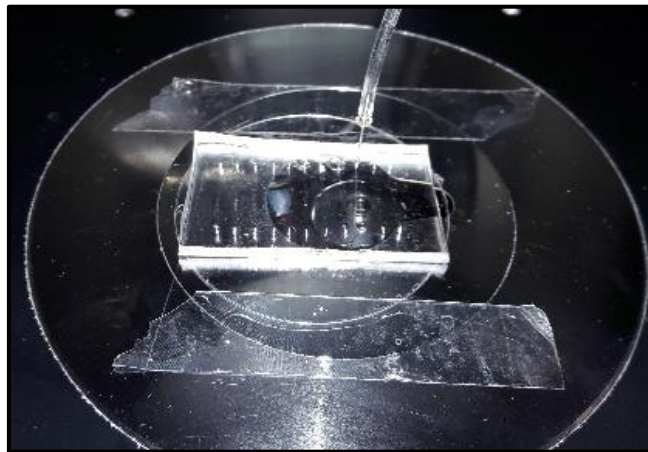


Figura 59 - Dispositivo dos microcanais colocado na platina do microscópio.

Ao fluido de trabalho, foi ainda adicionado uma pequena quantidade de corante vermelho para ajudar na visualização das partículas. Com uma seringa (*Terumo, Japan*) de 1 mL, recolheu-se a amostra e conectou-se, através de tubos de ligação, o dispositivo à bomba de injeção.

No *software Photron FASTCAM VIEWER* escolheram-se os parâmetros pretendidos, nomeadamente 2000 *frames/s*, um *shutter* de 1/75000 com uma janela de resolução 1024×1024 pixels.

Ligou-se a bomba e capturam-se vídeos, a diferentes velocidades de escoamento (5 $\mu\text{L}/\text{min}$, 8 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 10 $\mu\text{L}/\text{min}$) com a câmara de alta velocidade.

5.1.4. Reologia

Para o estudo dos parâmetros reológicos dos fluidos de trabalho utilizou-se, como se pode ver na Figura 60, o reómetro *Bohlin Instruments CVO*, equipado com um geometria cone-prato com diâmetro de 55 mm.

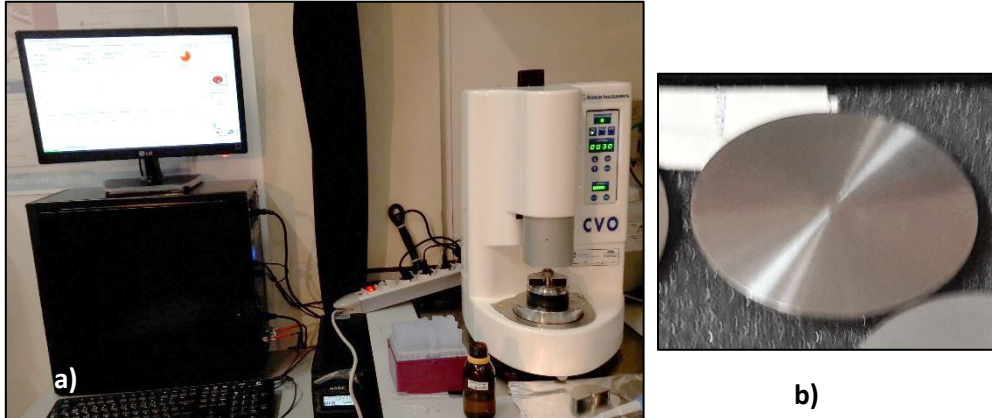


Figura 60 - Material para o estudo reológico: a) material de reometria; b) geometria cone.

Começou-se por preparar e calibrar o equipamento para se proceder à medição da viscosidade das amostras. Primeiramente colocou-se a geometria pretendida, cone de 1°/55 mm com um gap de 30 μm , e no *software* utilizado (*Bohlin Software CVOD 100*) acertaram-se os parâmetros, os quais é possível observar na Figura 61 e na Figura 62. Todos os testes foram efetuados a uma temperatura de 22° C.

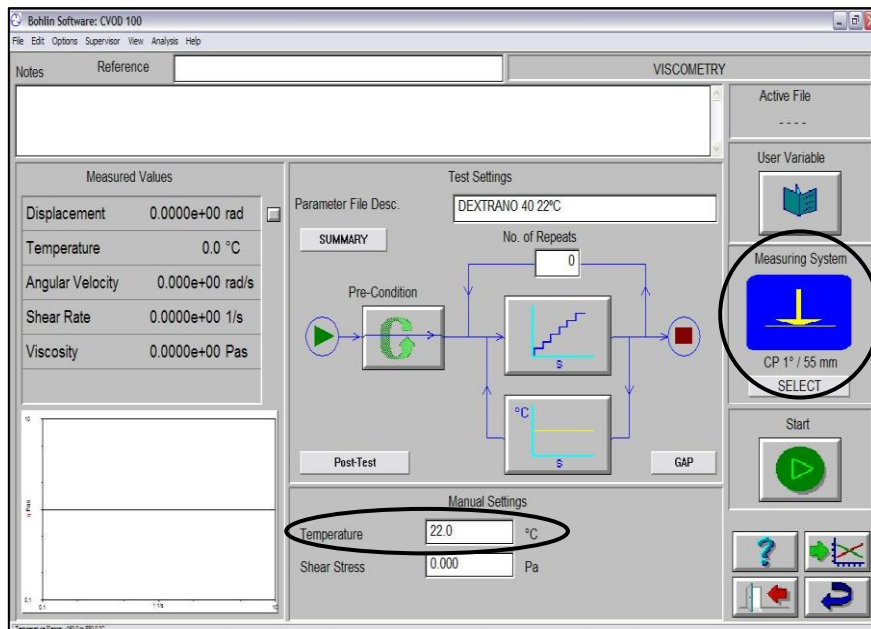


Figura 61 - Temperatura a que os testes são realizados, 22° C, e respetiva geometria (Bohlin Software CVOD 100).

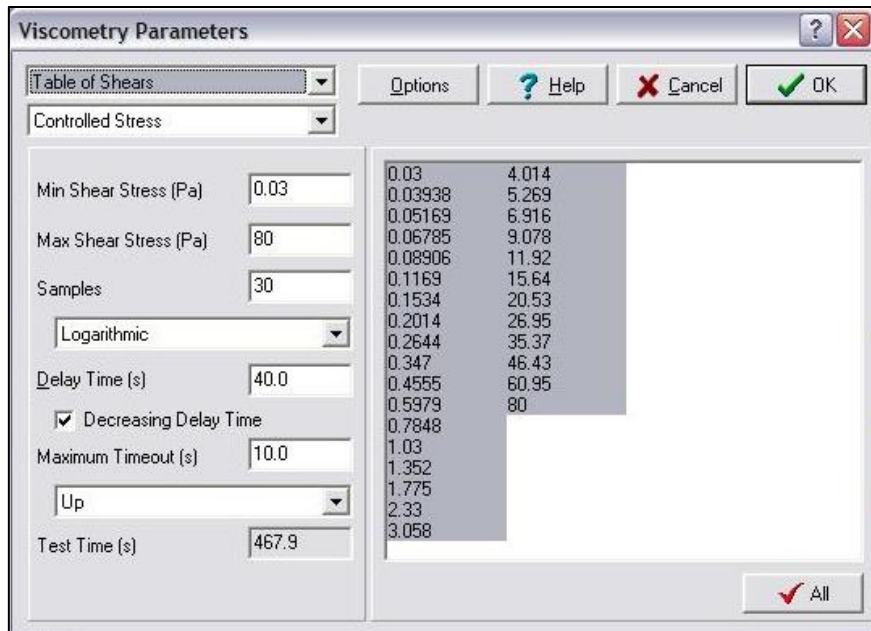


Figura 62 - Escolha dos parâmetros característicos para a medição da viscosidade (*Bohlin Software CVOD 100*).

Sendo o equipamento de tensão controlada, os testes foram realizados num intervalo de tensão de 0,03 a 80 (Pa) obtendo-se um total de 30 pontos.

O passo seguinte é a colocação do fluido de trabalho que, como já foi referido anteriormente, é composto pelo Dx 40 e pelas partículas de PDMS. Com a micropipeta, retirou-se 0,8 mL de amostra do fluido e colocou-se no prato do reómetro (Figura 63). A geometria desce sobre a amostra comprimindo a mesma, ficando o espaço do gap corretamente preenchido. Os testes foram repetidos duas vezes para todas as amostras.

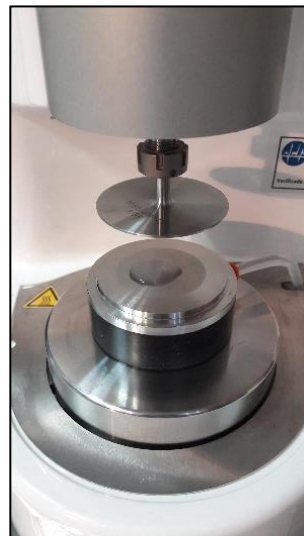


Figura 63 - Prato do reómetro com a amostra a ser estudada.

5.2. Índice de deformação e processamento de imagem

Através das visualizações efetuadas nos microcanais é possível observar o comportamento das partículas as quais vão alongando, ou seja, sofrendo deformação aquando da passagem pela contração hiperbólica. A deformação sofrida pode ser calculada através do índice de deformação, ID, o qual é dado pela seguinte equação:

$$ID = \frac{X-Y}{X+Y} \quad \text{Eq. (9)}$$

onde X representa o eixo maior e Y o eixo menor da partícula.

Quando este ID é igual a zero, estamos perante uma deformação nula, ou seja, a partícula mantém-se esférica. Se o ID tiver valores próximos de 0,5 significa que a partícula pode atingir forma elíptica (Figura 64).

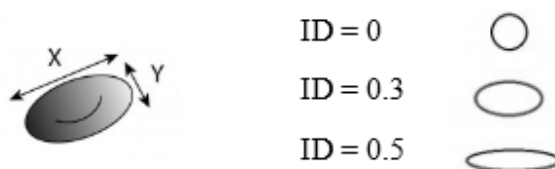


Figura 64 - Demonstração dos eixos para o cálculo do ID e representação da possível forma que as partículas possam adquirir, respetivamente para cada valor de ID.

Para se efetuar a análise dos vídeos e se obter as medições do ID das partículas utilizou-se o *software ImageJ*. De seguida serão descritos os passos efetuados para o processamento de imagens e obtenção das medições.

Começou-se por abrir o vídeo e, através dos comandos *Analyse>Set Scale* ajustou-se a escala pretendida (Figura 65).

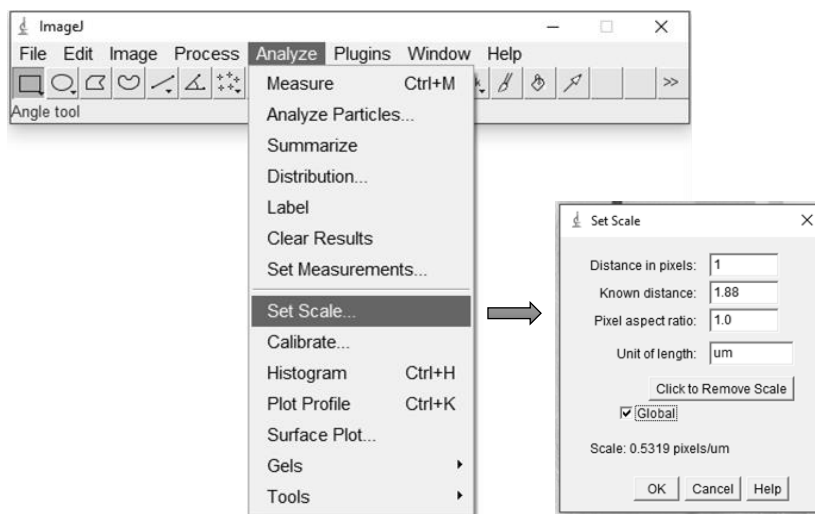


Figura 65 - Comandos do *ImageJ* que permitem ajustar a escala: *Analyse>Set Sacle*.

Para melhorar a visualização, ajustou-se o contraste da imagem e só depois se gerou o fundo do vídeo através de *Image>Stacks>Z-Project* (Figura 66).

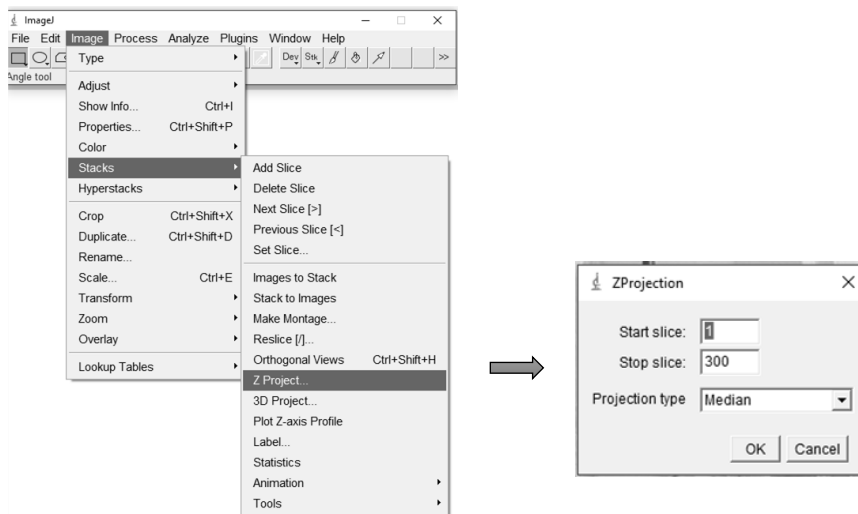


Figura 66 - Demonstração do cálculo do fundo das imagens do vídeo através do Z-Project.

O passo seguinte foi subtrair o fundo ao vídeo inicial para obtermos, apenas, as partículas. Para isso *Process>Image Calculator* foram os comandos utilizados (Figura 67).

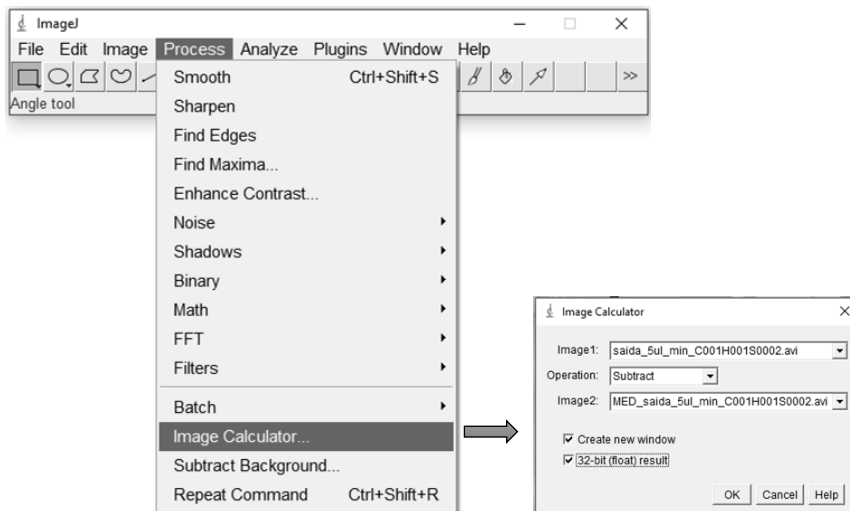


Figura 67 - Subtração do fundo ao vídeo original: *Process>Image Calculator*.

Por fim, para se medir os eixos das partículas, os quais foram medidos manualmente, utilizaram-se os comandos *Analyse>Measure*.

Foram selecionadas três zonas diferentes para se medir o índice de deformação das partículas: a zona 1 a qual corresponde à medida mais pequena da contração, a zona 2, a qual se encontra logo a seguir à contração correspondendo a uma expansão, e a zona 3, uma zona mais distante da contração onde se pode chamar zona de recuperação, pois as

partículas irão recuperar a sua forma original. Estas três zonas estão representadas na Figura 68.

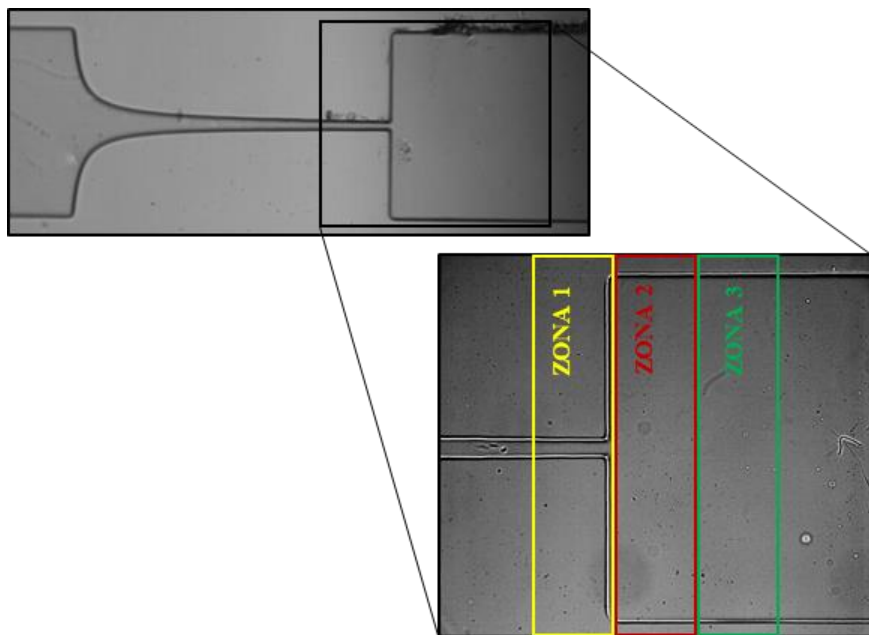


Figura 68 - Microcanal hiperbólico: representação das zonas em estudo para o cálculo do índice de deformação.

5.3. Apresentação e discussão dos resultados

5.3.1. Índice de deformação

Após todo o processamento de imagem e aquisição dos dados, obtiveram-se os resultados.

Através da Figura 69, pode-se verificar o comportamento das partículas nas três zonas selecionadas.

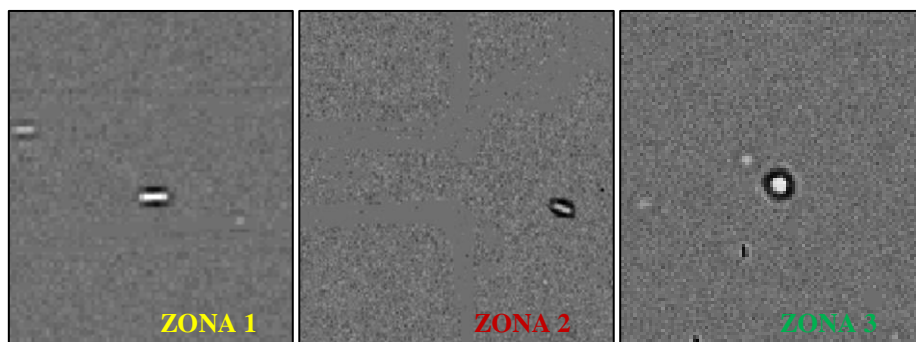


Figura 69 - Comportamento previsto das partículas nas diferentes zonas do canal hiperbólico.

O índice de deformação foi, então, calculado através da equação (9) referida anteriormente. Os resultados estão representados na Figura 70.

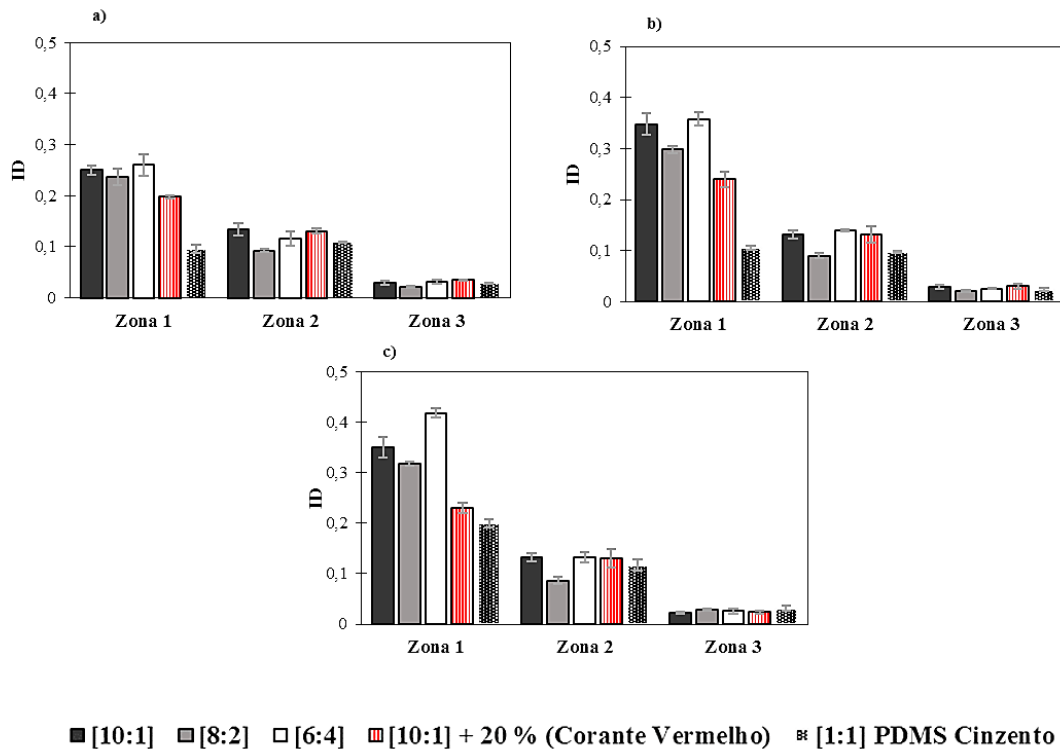


Figura 70 - Índice de deformação das partículas de todos os rácios estudados, inclusive, das partículas de cor, com um caudal de escoamento de: a) $Q = 5 \mu\text{L}/\text{min}$; b) $Q = 8 \mu\text{L}/\text{min}$; c) $Q = 10 \mu\text{L}/\text{min}$.

Pela análise dos três gráficos representados na Figura 70, pode-se verificar que, tal como previsto, a zona 1 é a zona de maior deformação, sendo que, à medida que o caudal de escoamento vai aumentando, o valor do índice de deformação também aumenta. Isto foi verificado para todos os rácios analisados.

Excluindo desta primeira análise as partículas de cor, pode-se observar que as partículas com rácio de [8:2] e com uma viscosidade de 1,64 Pa.s, são as que têm um ID mais baixo tanto na zona 1 como na zona 2. Em contrapartida, as partículas produzidas com um rácio de [6:4], cuja viscosidade é de 0,62 Pa.s, são as que apresentam um índice de deformação mais elevado nestas mesmas zonas. As partículas cujo rácio é de [10:1] apresentam valores de deformabilidade intermédios em relação aos dois outros rácios.

Assim, de um modo geral, pode-se concluir que as partículas com maior viscosidade (3,02 Pa.s), ou seja, as de razão [10:1], apresentam também menor quantidade de agente de cura, o que implica um menor número de ligações nos componentes do polímero, tornando-as mais elásticas e, conseqüentemente, mais deformáveis. Contudo, quando a viscosidade diminui, ou seja, quando a quantidade de agente de cura aumenta

em relação à base, a capacidade de deformação também aumenta, o que se verifica nas partículas com rácio de [6:4].

Em relação à zona 3, zona na qual as partículas já recuperaram a sua forma inicial, todos os rácios apresentam valores de deformação muito semelhantes entre si.

Relativamente às partículas de cor, verifica-se que as de cor cinzenta, com viscosidade igual a 3,56 Pa.s, tanto na zona 1 como na zona 2, apresentam sempre valores de ID inferiores às restantes partículas de cor. Isto deve-se à diferença de rácio que tem em relação às outras partículas, o qual é de [1:1]. Esta razão de proporção faz com que as partículas fiquem mais rígidas e tenham menos elasticidade em relação às outras.

A pouca deformabilidade pode ser observada na Figura 71.

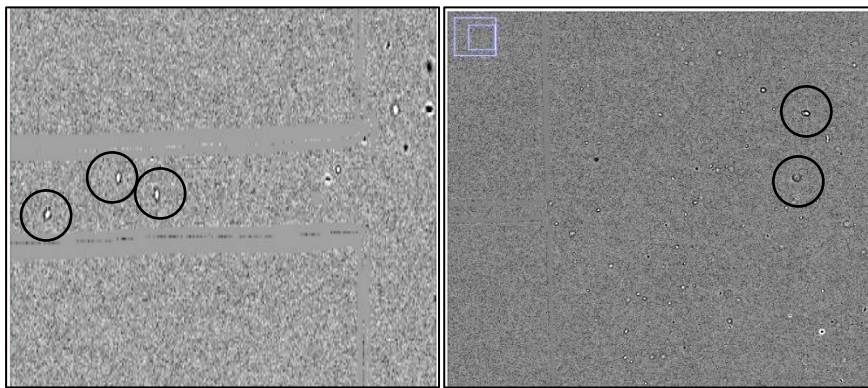


Figura 71 - Exemplo da forma que as partículas produzidas com PDMS cinzento adquirem na zona 1 e zona 2 e 3, respetivamente.

Analisando os resultados obtidos para as partículas coradas com o pigmento vermelho, cuja viscosidade é 1,35 Pa.s, e comparando-as com as partículas produzidas com igual rácio, ou seja [10:1], verifica-se que há uma diferença no valor do índice de deformação principalmente na zona 1, o qual se acentua à medida que o caudal de escoamento aumenta. Assim, as partículas coradas apresentam um ID inferior às partículas com rácio [10:1]. Esta diferença prevê-se que seja devido à adição do corante/pigmento, o qual modificou a elasticidade da partícula, tornando-a mais rígida.

Relativamente às outras zonas, a diferença não é tão notória. Analisando a Figura 72 podemos concluir melhor o anteriormente referido, uma vez que a diferença entre os ID das partículas com rácio [10:1] ainda é significativa.

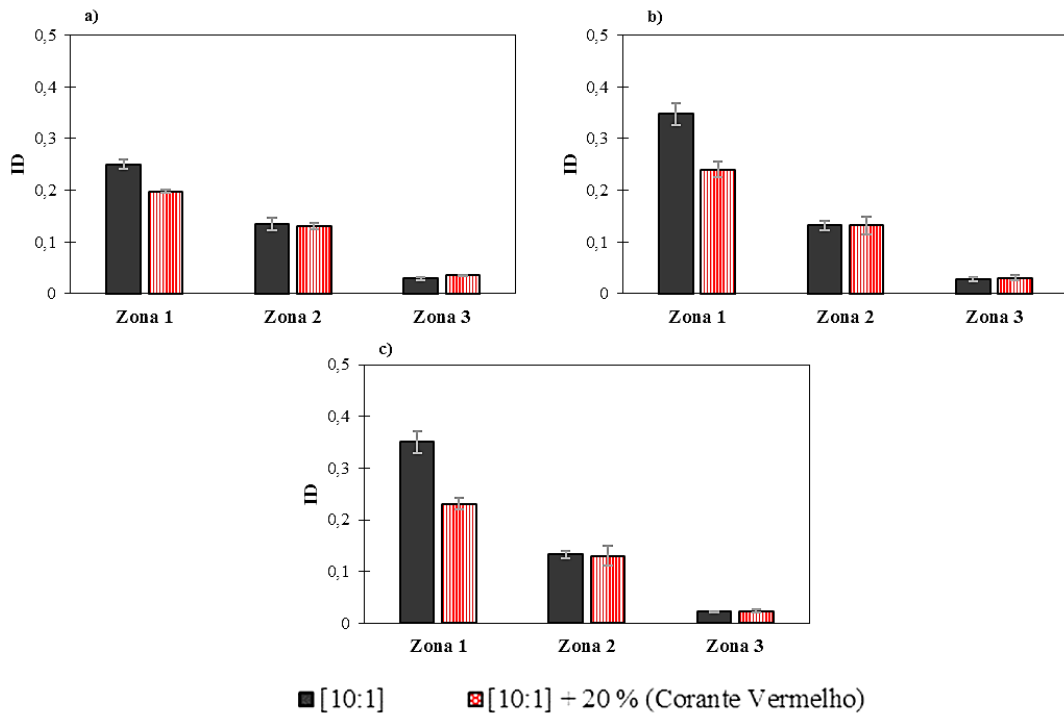


Figura 72 - Índice de deformação para as partículas com rácio de [10:1] sem e com a adição do pigmento vermelho, com diferentes caudais de escoamento: a) $Q = 5 \mu\text{L}/\text{min}$; b) $Q = 8 \mu\text{L}/\text{min}$; c) $Q = 10 \mu\text{L}/\text{min}$.

Comparação com o ID obtido para glóbulos vermelhos humanos

Como já se sabe, os glóbulos vermelhos são os componentes do sangue que apresentam maior capacidade de deformação e são os elementos em maior concentração.

Na Figura 73 pode-se observar a analogia entre a deformação dos GVs humanos, suspensão de glóbulos vermelhos em Dx 40, e as partículas produzidas com um rácio de [6:4], com escoamentos de $5 \mu\text{L}/\text{min}$, $8 \mu\text{L}/\text{min}$ e $10 \mu\text{L}/\text{min}$, respetivamente.

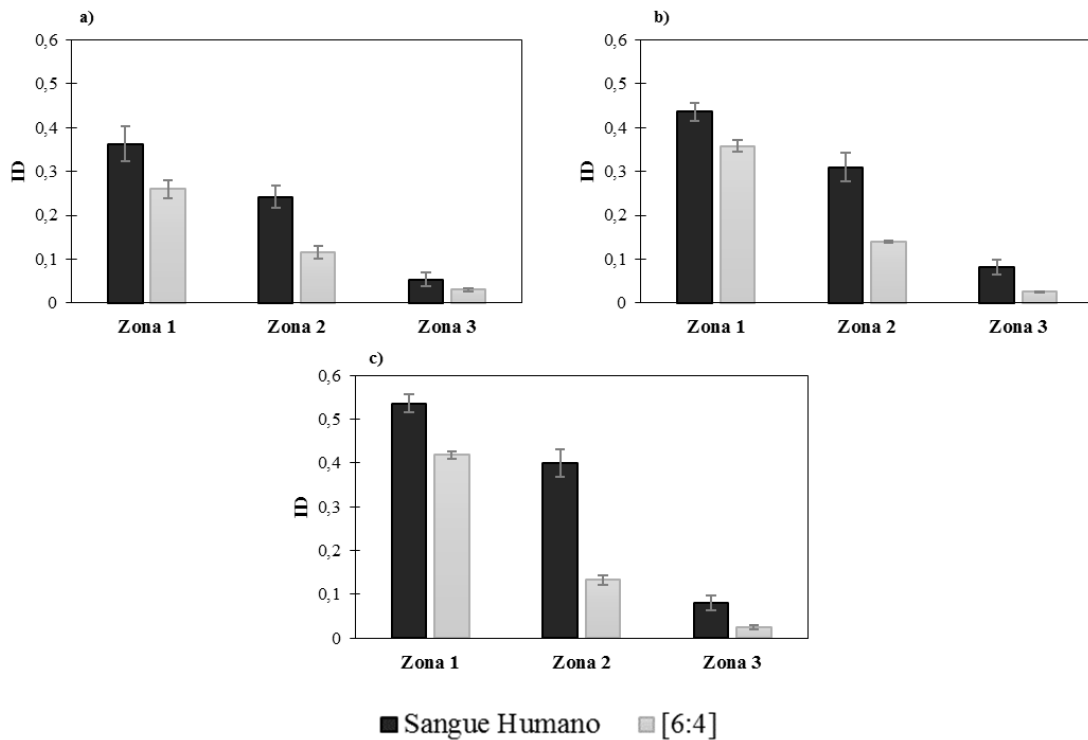


Figura 73 - Comparação entre os glóbulos vermelhos humanos e as partículas com rácio de [6:4], com velocidade de escoamento de: a) $Q = 5 \mu\text{L}/\text{min}$; b) $Q = 8 \mu\text{L}/\text{min}$; c) $Q = 10 \mu\text{L}/\text{min}$.

A comparação foi efetuada com o rácio de [6:4] uma vez que foi o que apresentou maior deformação. Contudo, verifica-se que os glóbulos vermelhos têm maior deformabilidade que as partículas produzidas, embora se possa considerar que os resultados são qualitativamente próximos. A maior diferença que se verifica é na zona 2, ou seja, na zona logo a seguir à contração do microcanal. Esta diferença verifica-se devido à própria geometria das partículas em relação às hemácias, pois a geometria esférica atribui uma mais rápida recuperação em relação à geometria discoide dos GVs. Essa diferença na geometria dos dois elementos está também a influenciar as diferenças obtidas para a zona 3. No entanto podemos dizer que obtemos uma boa aproximação, qualitativamente, das partículas com rácio [6:4] em relação ao ID dos GVs.

Cálculo do número de Reynolds

Foi ainda calculado o número *Reynolds* (Re) para os escoamentos realizados. O número de *Reynolds* é calculado através da equação (1) anteriormente descrita, para os diferentes caudais de escoamento utilizados, substituindo D por D_h , uma vez que estamos a analisar canais não circulares. A massa volúmica, ρ , do Dx 40 tem um valor de 1042 e a viscosidade, η , deste mesmo fluido é de 0,0052 Pa.s. As velocidades das partículas, em

cada caudal de escoamento, estão representadas na tabela que se encontra no Anexo D, as quais foram calculadas através do *ImageJ*.

Para tal, abriram-se os vídeos calibrando a escala, de igual modo que já foi referido na Figura 65. Através dos comandos *Image>Properties* colocou-se o intervalo de *frames*, que é dado por $1/2000$, ou seja, 0,0005 (Figura 74).

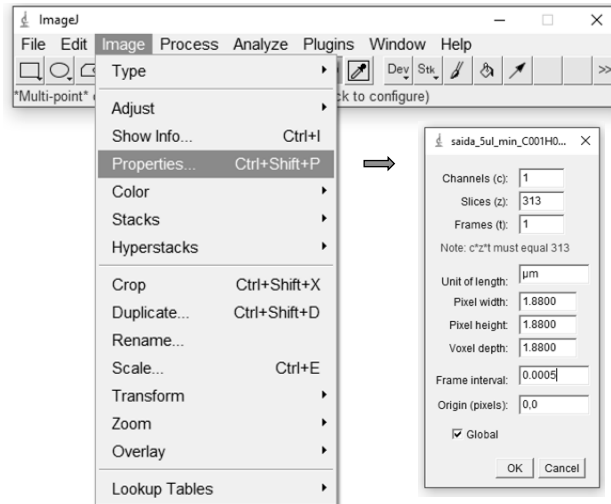


Figura 74 - Comandos do *ImageJ* para ajustar o intervalo dos *frames*: *Image>Properties*.

Para se conseguir medir a velocidade das partículas, utilizou-se os comandos *Plugins>MTrackJ*, selecionando-se a opção *add* para conseguir seguir a partícula. Por fim, o comando que dá a velocidade é o *Measure*. Estes comandos estão representados na Figura 75.

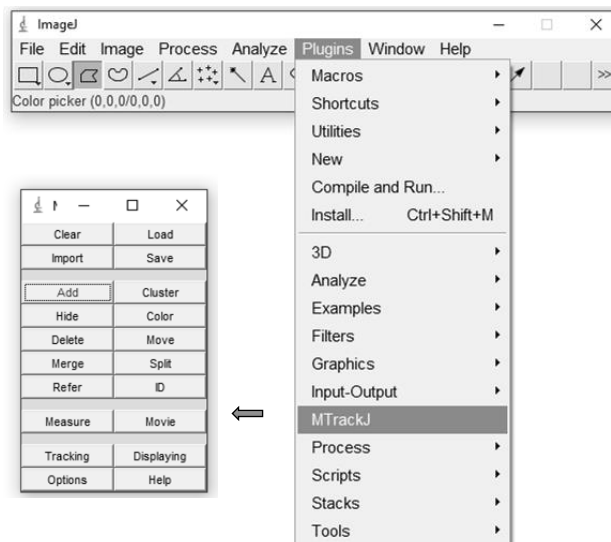


Figura 75 - Representação do *MTrackJ*, o qual mede a velocidade das partículas.

A Figura 76 mostra a trajetória de duas partículas diferentes nas três diferentes zonas.

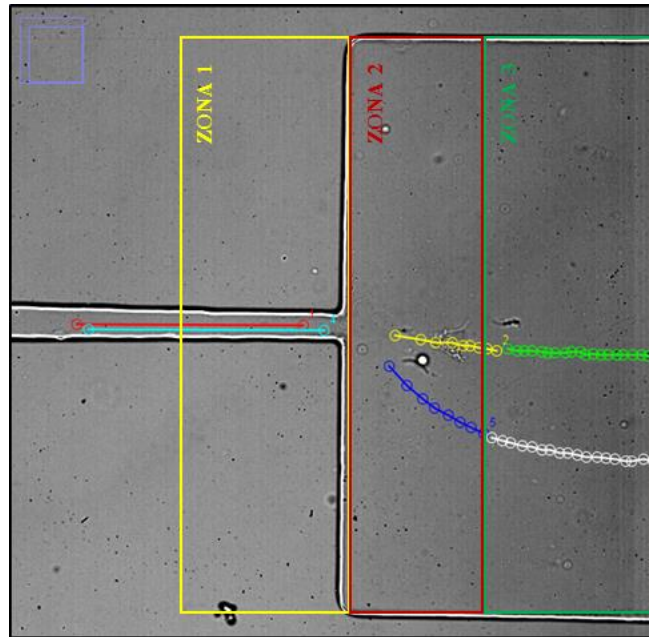


Figura 76 - Representação da trajetória de duas partículas nas diferentes zonas: partícula 1 – cores vermelha, amarela e verde; partícula 2 – cores azul clara, azul escura e branca. Cada cor, em cada trajetória, representa cada zona.

Na Tabela 4 mostram-se os resultados do cálculo do número de *Re*, podendo-se concluir que à medida que o caudal de escoamento aumenta, o número de *Reynolds* também aumenta. Na zona 1 obtêm-se sempre o maior valor de *Re* sendo que é a zona mais estreita da contração. Na zona 2, a qual possui uma secção maior e ocorre uma redução da velocidade das partículas, apresenta um *Re* menor e para todos os caudais um valor menor que 1. Na zona 3, e apesar de ter a mesma secção que a zona 2, as partículas continuam a reduzir a sua velocidade resultando num menor valor de *Reynolds*.

Tabela 4 - Cálculo do número de *Reynolds* nas diferentes zonas com os diferentes caudais de escoamento.

$$Re = \frac{\rho V D_h}{\eta}$$

Q (μL/min)	Zona 1	Zona 2	Zona 3
5	0,35	0,26	0,15
8	2,91	0,39	0,25
10	3,99	0,73	0,40

Com esta análise podemos concluir que estamos a trabalhar com valores de *Reynolds* próximos aos encontrados *in vivo* na microcirculação.

5.3.2. Reologia

Curvas de viscosidade

Com os testes realizados no reômetro foi possível obter as curvas de viscosidade para cada fluido de trabalho. Através do gráfico seguinte, assim como através dos gráficos representados no Anexo C, pode ser observado o comportamento da viscosidade para um intervalo de deformação de $[4 - 10000] \text{ s}^{-1}$.

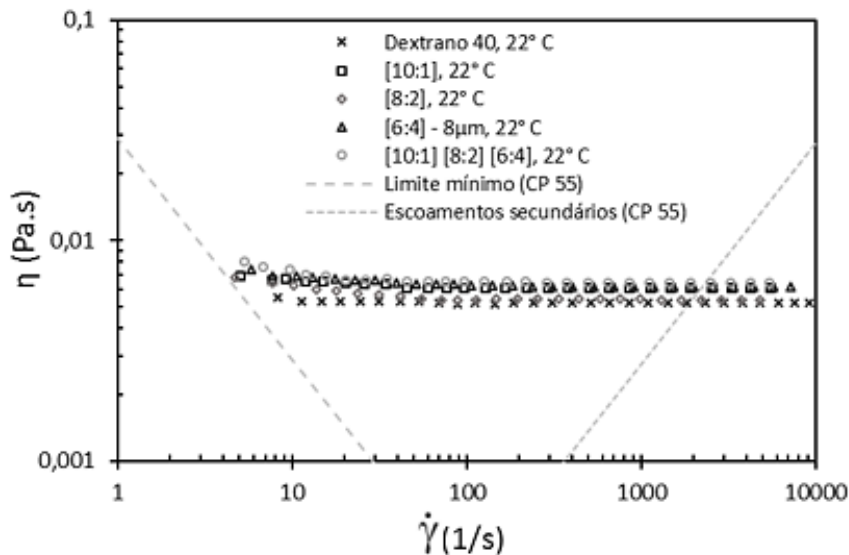


Figura 77 - Representação da viscosidade do Dextrano 40 e de todas as partículas produzidas nos diferentes testes de variação de rácio, em função do *shear rate*, a 22° C.

Analisando a Figura 77 consegue-se perceber que o Dextrano 40 apresenta um comportamento Newtoniano, sendo que a sua viscosidade ronda os 0,005 Pa.s.

Em relação aos fluidos que contêm as partículas com diferentes rácios, vê-se que há um aumento da viscosidade em relação ao Dextrano 40. Pode-se concluir também, e complementando com a análise dos gráficos presentes em Anexos B, que para baixas deformações há um suave comportamento não-Newtoniano, ou seja, há medida que o valor das deformações aumenta, a viscosidade vai diminuindo até atingir um comportamento Newtoniano, mantendo-se a viscosidade com valores constantes.

Comparação com o sangue humano

Como se verificou que os fluidos constituídos pelas suspensões de partículas apresentavam apenas um ligeiro incremento da viscosidade a baixas taxas de deformação e que tal podia dever-se à reduzida concentração de partículas, foi decidido juntar todos os fluidos de trabalho a diferentes rácios e diferentes tamanhos de partículas para vermos

se o comportamento não-Newtoniano ficava mais acentuado. Como podemos observar pela Figura 78, o fluido com todos os rácios apresenta, em relação ao Dx 40, um incremento da viscosidade, e apresenta também, a baixas deformações, um claro comportamento não-Newtoniano. É visível que a baixas deformações temos um incremento da viscosidade o qual vai diminuindo com o aumento das taxas de deformação.

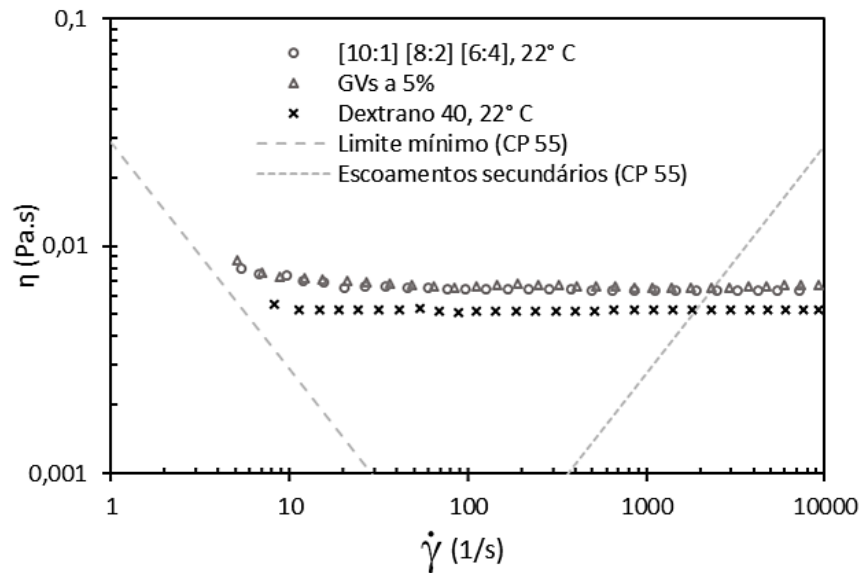


Figura 78 - Comparação da viscosidade do Dextrano 40 com as partículas de todos os rácios e também com fluido com glóbulos vermelhos a 5%, a 22° C.

Com a obtenção desta curva de viscosidade foi ainda possível efetuar uma comparação entre o fluido que continha as partículas com os três tipos de rácios estudados e o fluido com 5 % de glóbulos vermelhos em Dx40.

Pode-se, então, dizer que ambos os fluidos têm um comportamento não-Newtoniano, obtendo-se uma boa similaridade entre as curvas de viscosidade dos GVs e das partículas, ambas suspensas em Dx 40.

5.3.3. Camada de plasma

A camada de plasma é uma camada livre de células que se forma junto à parede dos microcanais, devido à capacidade dos GVs mirarem para o centro. Essa camada de plasma é intensivamente estudada quando se realizam estudos do escoamento e análise do comportamento das células em microcanais, sendo também um fenômeno visualizado em condições *in vivo*.

Visto que o fluido de trabalho com todos os raios apresentou um comportamento de viscosidade próximo à suspensão dos GVs e que, em relação ao ID, existem partículas com valores próximos à deformação dos GVs, decidiu-se verificar se ocorria a formação dessa camada de plasma

Na Figura 79 pode ser observada a trajetória das partículas e a formação desta camada de plasma para o escoamento que foi feito com todas as partículas. Apesar de a camada de plasma ser de pequena dimensão e de difícil medição, usando a função *Z-project* do *ImageJ*, foi possível obter algumas medições para quatro caudais.

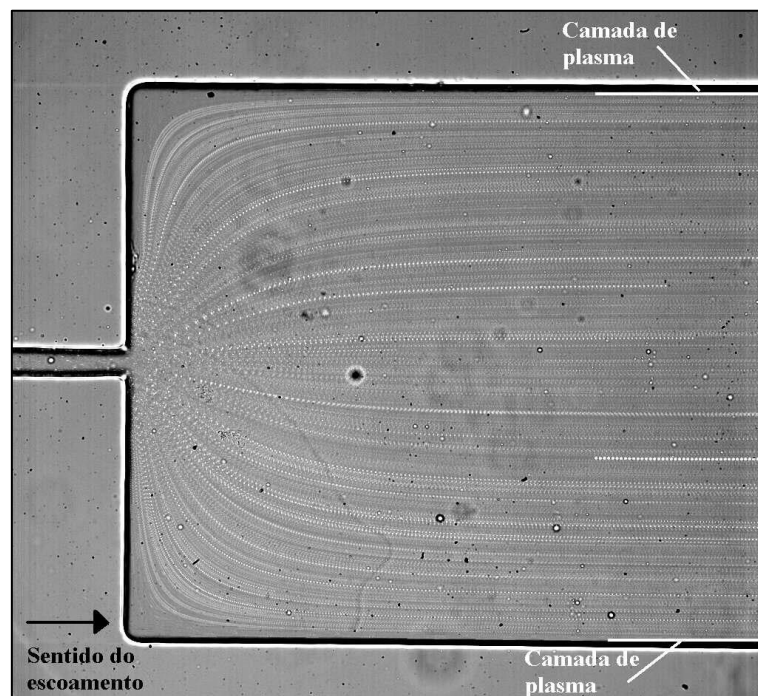


Figura 79 - Visualização da trajetória das partículas e da consequente formação da CLC.

Assim sendo, ainda na Figura 79, verifica-se uma zona na qual apenas flui o meio de suspensão, Dx 40, não se observando qualquer partícula. Na Figura 80 representou-se os valores obtidos para a espessura da camada de plasma, verificando-se que vai aumentando de espessura à medida que a velocidade de escoamento também aumenta, pois as partículas, tal como os glóbulos vermelhos também tendem a migrar para o centro do microcanal.

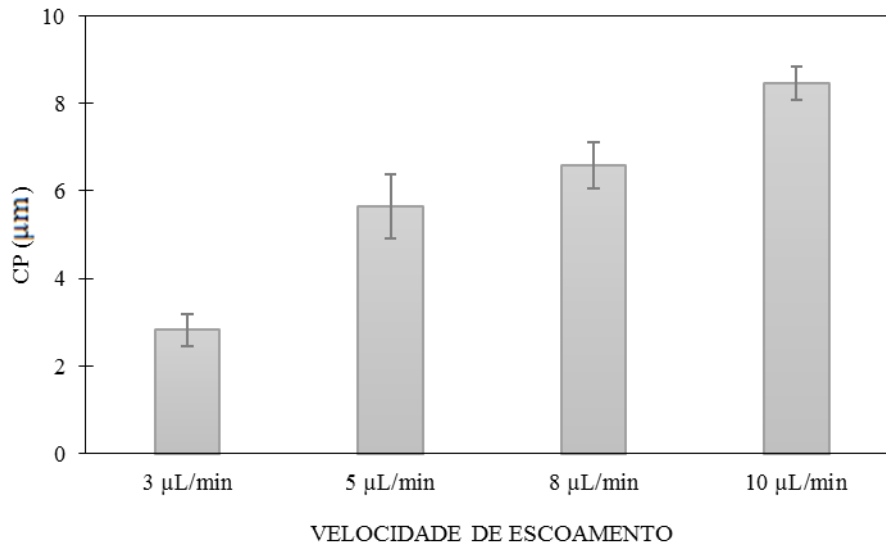


Figura 80 - Representação da camada de plasma, em μm , a diferentes velocidades de escoamento.

Apesar de se verificar essa camada de plasma, comparando com dados da literatura (Rodrigues, et al. 2016), em que canais hiperbólicos com *Hencky Strain* equivalente ao utilizado, suspensões de GVs a 5 % em Dx 40 formam uma camada de plasma com espessura de cerca de 60 μm . Esta discrepância de valores pode ser atribuída a vários fatores. A diferente geometria das partículas (esferas) e a menor deformabilidade pode criar maior resistência à migração para o centro do microcanal. Também, e apesar de se ter juntado todos os rácios das partículas produzidas para aumentar a concentração das mesmas, o volume final continua a ser pequeno para podermos efetuar uma análise mais correta da camada de plasma.

Capítulo 6

Conclusões e trabalhos futuros

O objetivo deste trabalho é demonstrar que as micropartículas de PDMS produzidas pela inovadora e precisa técnica de focagem de fluxo podem ser usadas no desenvolvimento de fluidos análogos ao sangue em que as micropartículas obtidas possuem propriedades mecânicas equivalentes aos glóbulos vermelhos humanos e comportamento reológico equivalente a suspensões de GVs em Dx 40.

6.1. Conclusão

No que diz respeito à produção das micropartículas de PDMS, através da técnica de focagem de fluxo, pode-se concluir que é uma técnica que permite a obtenção de estabilidade do fluido em estudo, neste caso o PDMS, permitindo assim, que o jato formado se quebre em pequenas gotas com o tamanho pretendido, sendo este tamanho controlado através do deslocamento da agulha hipodérmica.

Foi também possível mostrar que nem a variação da quantidade do agente de cura na produção do PDMS nem a adição de um corante/pigmento a este polímero afetam a redução do tamanho da partícula após a cura, isto é, verificou-se que a tendência do coeficiente de redução era aproximadamente a mesma para os diferentes raios de PDMS, variando apenas com o diâmetro inicial da gota de PDMS formada. Verificou-se ainda que, a partir de um tamanho aproximado de 25 μm de diâmetro da gota de PDMS, o coeficiente de redução após a cura tende a estabilizar contrariando a tendência mostrada por outros estudos (Muñoz-Sánchez, et al. 2016) que mostravam que à medida que o diâmetro inicial da gota aumentava o coeficiente de redução tendia para 100 %, sendo que a partícula, depois de curada, acabaria por desaparecer. Com este trabalho é possível concluir que as gotas produzidas com diâmetros inferiores a 25 μm com os três raios de

PDMS ([10:1], [8:2] e [6:4]), seguem uma linha de tendência de redução de tamanho de $C_s = \frac{10}{3} D_d$, enquanto que para tamanho superiores, o coeficiente de redução de tamanho tende a ser constante, ou seja, estabiliza nos 80 %, aproximadamente.

Em relação à produção de partículas de cor, quer na adição de um corante/pigmento quer com o PDMS de cor (cinzento), verificou-se que o PDMS resultante não fica totalmente preenchido, pois ocorreu encapsulamento dos pigmentos do corante. Contudo, foi possível a produção de micropartículas de cor vermelha e cinzenta, sendo que a adição de corante também não influenciou o coeficiente de redução do tamanho da partícula.

Relativamente ao escoamento das micropartículas, foi feito um estudo da sua deformação e da formação da camada de plasma. No primeiro caso, ou seja, na deformação das partículas, verificou-se uma tendência evidente para os três caudais escolhidos. Na zona 1 do microcanal, ou seja, na zona mais estreita da contração, o índice de deformação é maior, estando compreendido entre 0,2 e 0,3 ($Q = 5 \mu\text{L}/\text{min}$), 0,3 e 0,4 ($Q = 8 \mu\text{L}/\text{min}$) e 0,4 e 0,5 ($Q = 10 \mu\text{L}/\text{min}$), sendo que, à medida que o caudal aumenta, também o índice de deformação aumenta. Este fenómeno verifica-se para todas as partículas estudadas.

Pode-se ainda concluir que as partículas com rácio de [6:4], cuja viscosidade da mistura do PDMS é a mais baixa de todas as estudadas, apresentam um índice de deformação, mais elevado, tendo-se efetuado uma comparação com a deformação de GVs às mesmas condições, apresentando valores similares, qualitativamente. Em relação às partículas de cor, verifica-se que, também que estas, sofrem deformação na passagem da contração, no entanto com valor de ID mais baixo.

Assim, com a análise do índice de deformação das partículas a diferentes rácios pode-se concluir que a variação do rácio [base:agente de cura] na produção do PDMS ou a adição de um corante interferem na deformação das micropartículas, sendo que, a variação da quantidade de agente de cura pode ser a propriedade que mais influencia a deformação, visto que é o que mais influencia a viscosidade do PDMS.

Relativamente à viscosidade das suspensões das micropartículas em Dx 40, a uma temperatura de 22° C, primeiramente, podemos concluir que o Dextrano 40 apresenta um comportamento Newtoniano, com uma viscosidade de 0,005 Pa.s; com a adição das micropartículas ocorre um aumento da viscosidade, verificando-se um suave comportamento não-Newtoniano a baixas deformações. Esse comportamento não-Newtoniano pode ser explicado pela existência de pequenos aglomerados de partículas

que fazem aumentar a viscosidade e os quais se vão quebrando com o aumento da taxa de deformação, levando a uma redução da viscosidade até atingir um patamar Newtoniano (a altas taxas de deformação). Este comportamento foi de igual forma obtido para a suspensão de GVs humanos a 5 % em Dx 40, obtendo-se uma boa concordância entre as duas curvas.

Em relação à camada de plasma e apesar de não ter sido feita uma comparação com o escoamento dos glóbulos vermelhos podemos concluir que as suspensões de micropartículas tendem a migrar para o centro do microcanal, formando uma camada de plasma com tendência a aumentar à medida que o caudal de escoamento também aumenta, no entanto a CP formada tem uma espessura muito pequena em relação a dados encontrados na literatura para escoamentos de 5 % de GVs humanos.

Em termos gerais, é possível concluir que a variação do agente de cura não afeta na redução de tamanho das micropartículas produzidas a partir da técnica da focagem de fluxo, assim como quando são produzidas com PDMS corado, também não se observa variação no coeficiente de redução de tamanho. Variando apenas com o diâmetro de produção da gota de PDMS, que quanto maior for a gota maior é a redução do diâmetro da mesma. Acima de diâmetros de 25 μm esse coeficiente tende a estabilizar, não causando o desaparecimento da partícula após a cura. Relativamente ao escoamento das micropartículas nota-se um comportamento muito semelhante com os GVs, sendo uma boa alternativa para serem usadas no desenvolvimento de fluidos análogos ao sangue, capazes de reproduzir também o comportamento das células, GVs, em escoamento dentro de microcanais hiperbólicos. Assim, com este avanço no estudo das micropartículas de PDMS, o estudo *in vitro* do sangue é melhorado, evitando assim problemas de natureza ética e de segurança.

6.2. Trabalhos futuros

Como trabalhos futuros é importante aprofundar o estudo da produção de partículas coloridas, uma vez que pode facilitar a sua visualização dentro dos microcanais e, por conseguinte, melhorar o seu estudo.

Outro ponto que se poderia melhorar no processo da produção de partículas, é o uso do surfactante, o qual é utilizado para evitar a coalescência das micropartículas aquando da sua formação. No entanto este elemento tende a criar cristais, o que acaba por

contaminar a amostra. Testar outros surfactantes seria uma boa forma de melhorar as amostras finais.

A quantidade e a qualidade de amostra final obtida também é algo a ter em conta e a otimizar, uma vez que a fabricação é um processo lento resultando apenas uma baixa concentração de partículas. O processo de filtração e secagem da amostra também introduz bastante sujidade sendo que deveria ser efetuado numa câmara limpa ou encontrar outro meio de filtragem mais eficiente para que também não ocorra muita perda de quantidade da amostra de micropartículas.

Referências

- Acero, A.J., N. Rebollo-Muñoz, J. M. Montanero, A. M. Gañán-Calvo, e E. J. Vega. “A new flow focusing technique to produce very thin jets.” *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2013: Vol. 23, 065009.
- Calejo, Joana. *Desenvolvimento de fluidos bifásicos análogos ao sangue: estudo reológico, escoamento em microcanais e simulações numéricas*. Tese de Mestrado, Bragança: IPB, 2013.
- Calejo, Joana, Diana Pinho, Francisco J. Galindo-Rosales, Rui Lima, e Laura Campo-Deaño. “Particulate Blood Analogues Reproducing the Erythrocytes Cell Free Layer in a Microfluidic Device Containing a Hyperbolic Contraction.” *Micromachines*, 2016: 7 (1), 4.
- CVO, Bohlin Gemini &. “Accessories manual.” Malvern, Novembro de 2010.
- Diário de Biologia*. 30 de Janeiro de 2010. <http://diariodebiologia.com/2010/01/qual-a-diferenca-entre-transfusao-de-plasma-e-transfusao-de-sangue/> (acedido em 25 de Abril de 2017).
- Fahraeus, Robin, e Torsten Lindqvist. “The viscosity of the blood in narrow capillae tubes.” *American Journal of Physiology*, 1931: 562-568.
- Faustino, V., D. Pinho, T. Yaginuma, Ricardo C. Calhella, Isabel C.F.R. Ferreira, e R. Lima. “Extensional flow-based microfluidic device: deformability assessment of red blood cells in contact with tumor cells.” *BioChip Journal*, 2014: 42-47.
- Faustino, V., et al. “Flow of red blood cells suspensions through hyperbolic microcontractions.” Em *Visualization and Simulation of Complex Flows in Biomedical Engineering*, de R. Lima, Y. Imai, T. Ishikawa e M. S. N. Oliveira, Vol. 12, pp. 151-163. Springer Netherlands, 2014.
- Faustino, Vera. *The Study of Cell Behaviour using Biomedical Microdevices*. Dissertação de mestrado, Bragança: IPB, 2012.
- Faustino, Vera, Susana O. Catarino, Rui Lima, e Graça Minas. “Biomedical microfluidic devices by using low-cost fabrication techniques: A review.” *Journal of Biomechanics*, 2016: 2280-2292.
- Fidalgo, C., Rui Lima, M. Oliveira, T. Ishikawa, Y. Imai, e T. Yamaguchi. “Measuring the cell-free layer in circular microchannels.” *6th World Congress of Biomechanics*. Singapore, 2010.

Referências

- Fidalgo, Cátia. *Estudo da camada de plasma em microcanais*. Bolsa de Integração na Investigação, IPB, 2010.
- Garcia, Valdemar, Ricardo Dias, e Rui Lima. “In vitro blood flow behaviour in microchannels with simple and complex geometries.” Em *Applied Biological Engineering - Principles and Practice*, 393-416. InTech, 2012.
- George, James N. *Platelets on the Web*. 4 de Junho de 2015.
<https://www.ouhsc.edu/platelets/platelets/platelets%20intro.html> (acedido em 25 de Abril de 2017).
- Goldsmith, H., e V. Turitto . “Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications.” *ICTH - Report-Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Haemostasis*. Thromb Haemostasis 55 (3), 1986. 415-435.
- Instruments, Bohlin. “A basic intridution to rheology.” Great Britain: Copyright, 1994.
- Jiang, Kunqiang, Peter C. Thomas, Samuel P. Forry, Don L. DeVoe, e Srinivasa R. Raghavan. “Microfluidic synthesis of monodisperse PDMS microbeads as discrete oxygen sensors.” *Soft Matter*, 2012: 8.
- Lee, A.L., et al. “A review of laminar single-phase flow in microchannels.” *International Mechanical Engineering Congress and Exposition*. New York: American Society of Mechanical Engineers, Micro-Electromechanical Systems Division Publication (MEMS), 2001. 495-503.
- Lima, R., T. Ishikawa, Y. Imai, e T. Yamaguchi. “Blood flow behavior in microchannels: past, current and future trends .” Em *Single and two-Phase Flows on Chemical and Biomedical Engineering*, 513-547. Bentham Science, 2012.
- Lopes, David A. M. *Caracterização experimental da dinâmica e da organização celular de escoamentos estacionários de sangue animal em microcanais rectos*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica, Lisboa: Técnico de Lisboa, 2012.
- Matemática, Viva. *Constituição do Sangue*. 23 de Fevereiro de 2010.
<http://vivaciencias.blogs.sapo.pt/2626.html> (acedido em 25 de Abril de 2017).
- Msubbu, Chemical Engineering Learning Resources -. *Newtonian and non-Newtonian Fluids*. 14 de Setembro de 2014. <http://www.msubbu.in> (acedido em 26 de Abril de 2017).
- Muñoz-Sánchez, B. N., S.F. Silva, D. Pinho, E.J. Vega, e R. Lima. “Generation of micro-sized PDMS particles by a flow focusing technique for biomicrofluidics applications.” *AIP Biomicrofluidics*, 2016: 12.
- Novais, Susana. *Desenvolvimento de um microdispositivo biomédico para a separação e deformação de eritrócitos*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Biomédica, Bragança: IPB, 2012.

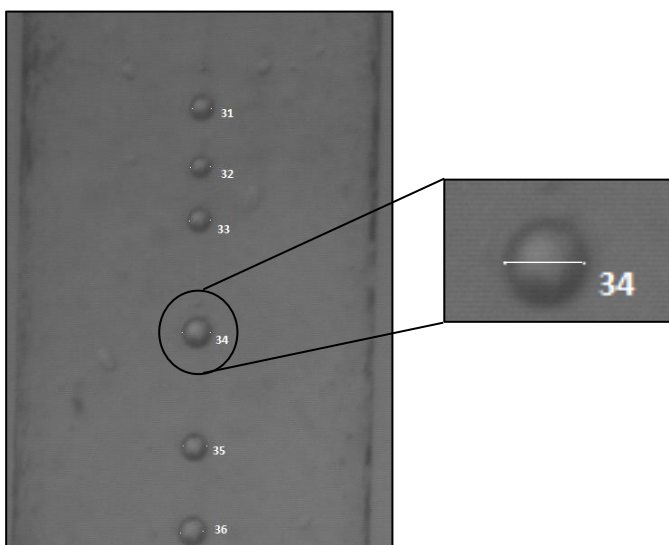
- Novais, Susana, et al. "Cell-free layer (CFL) measurements in complex geometries: contractions and bifurcations." Em *Visualization and Simulation of Complex Flows in Biomedical Engineering. Lecture Notes in Computational Vision and Biomechanics*, 119-132. Springer, 2014.
- Orangesdms - Red Blood Cells - RG*. 2010.
<https://orangesdms.wikispaces.com/Red+Blood+Cells+-+RG> (acedido em 25 de Abril de 2017).
- Orangesdms - White Blood Cell - AB*. 2010.
<https://orangesdms.wikispaces.com/White+Blood+Cell+-+AB> (acedido em 25 de Abril de 2017).
- Pinho, D., B. N. Muñoz-Sánchez, E. J. Vega, R. Lima, e F. T. Pinho. "Rheological behavior os dextran suspensions of PDMS microbeads flowing through a hyperbolic microchannel." *7th Portuguese Congress of Biomechanics*. Guimarães, Portugal, 2017.
- Pinho, Diana, Beatriz Natividad Muñoz Sánchez, Emílio José Vega, e Rui Lima. "Production of PDMS microparticles to mimic RBCs in blood analogue fluids." *11th European Fluid Mechanics Conference*. Sevilha, 2016.
- Pinho, Diana, e Rui Lima. "Apontamentos de Micro/Nanotecnologias." IPB, Bragança, 2016.
- Pinto, Elmano. *Estudo experimental de escoamentos fisiológicos em microcanais fabricados por xurografia*. Tese de Mestrado, Bragança: IPB, 2012.
- Pinto, Elmano, et al. "Fabricação de microcanais utilizando o método de xurografia: visualização da camada livre de células." *5º Congresso Nacional de Biomecânica*. Espinho, Portugal: Sociedade Portuguesa de Biomecânica, 2013. 301-306.
- Pinto, Vânia C., Paulo J. Sousa, Vanessa F. Cardoso, e Graça Minas. "Optimized SU-8 Processing for Low-Cost Microstructures Fabrication without Cleanroom Facilities." *Micromachines*, 2014: 738-755.
- Rodrigues, R. O., V. Faustino, E. Pinto, D. Pinho, e R. Lima. "Red Blood Cells deformability index assessment in a hyperbolic microchannel: the diamide and glutaraldehyde effect." *WebmedCentral BIOMEDICAL ENGINEERING* (WebmedCentral), 2013: 4 (8).
- Rodrigues, Raquel O., et al. "In vitro blood flow and cell-free layer in hyperbolic microchannels: Visualizations and measurements." *BioChip Journal*, 2016: 10: 9.
- Santos, Nuno António Aguiar dos. "Estudo da Reologia de Fluidos Análogos ao Sangue." Bolsa de Integração à Investigação (BII) financiada pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), FEUP - Porto, 2009.
- Silva, João Martins e. *Conceitos sobre hemorreologia e microcirculação humanas*. Lisboa: Boletim da SPHM, 2012.

Referências

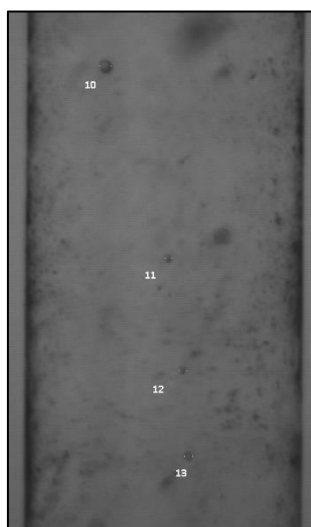
- Silva, Susana. *Embolias Gasosas em Microcanais e Técnica de Focagem de Fluxo na Produção de Micropartículas de PDMS*. Tese de Mestrado, Bragança: IPB, 2015.
- Silva, Vanessa Oliveira de Souza e. *Caracterização microestrutural e reológica de emulsões óleo/água em cisalhamento*. Projeto de Graduação, Brasília: Faculdade de Tecnologia, Departamento de Engenharia Mecânica, 2011.
- Soares, Júlia Cristina Alves. “Fabrico de Microdispositivos a Laser para Aplicações Biomédicas.” Tese de Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança, 2016.
- Tomaiuolo, Giovanna. “Blood-mimicking fluid for biotechnological applications: fluiddynamic behavior of red blood cells and droplets under confined shear flow.” Tese de Doutorado, 2008.

Anexo A

Representação das gotas produzidas no capilar de vidro através da qual se fez a medição do diâmetro manualmente.

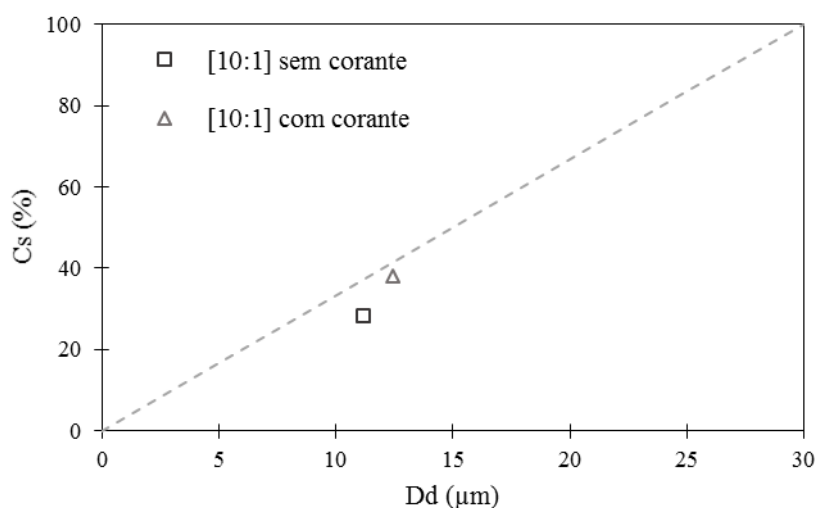


Partículas curadas no capilar de vidro aquando da sua medição do diâmetro.

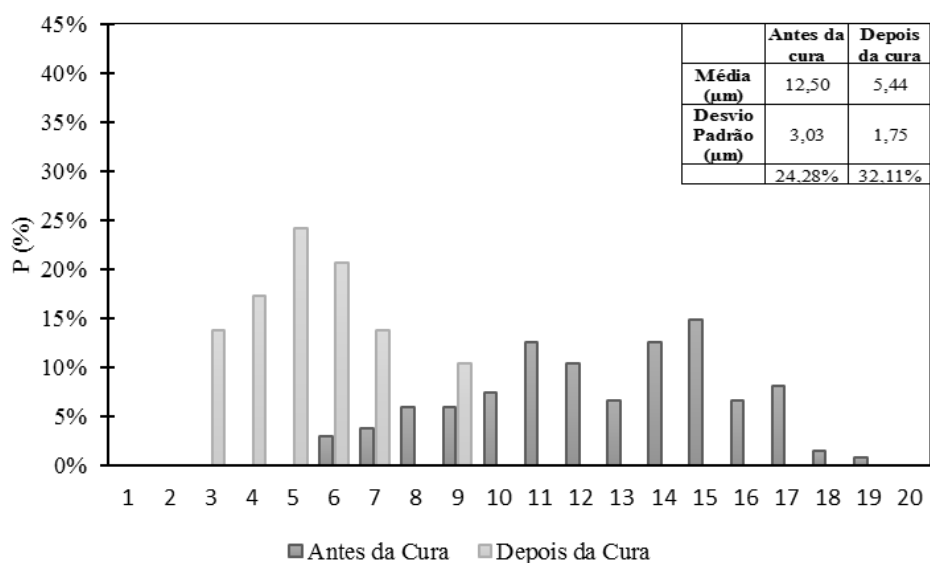


Anexo B

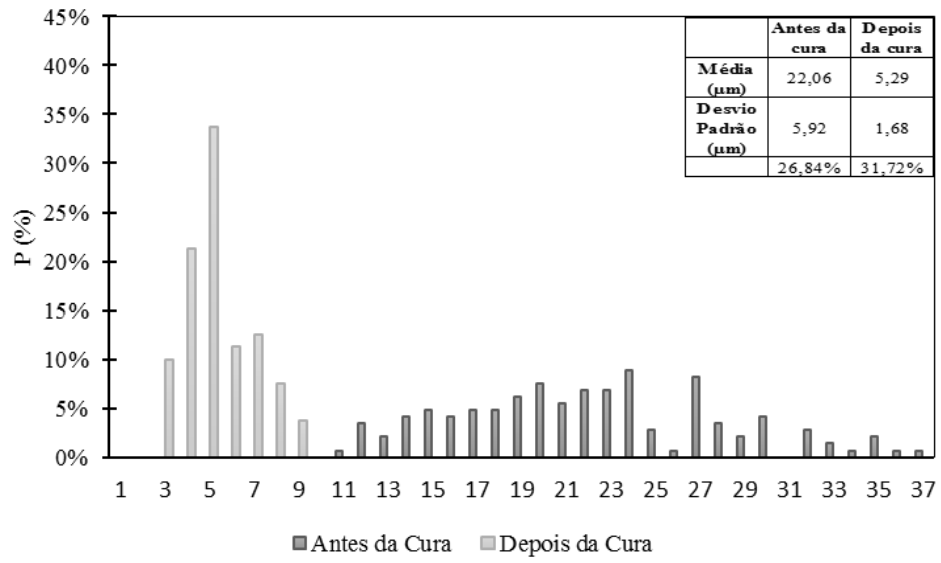
Representação do coeficiente de redução das partículas vermelhas com e sem corante, com tamanho similar.



Representação da probabilidade de existência das partículas cinzentas, antes e depois da cura, com tamanhos de 12 μm e 22 μm , respectivamente.



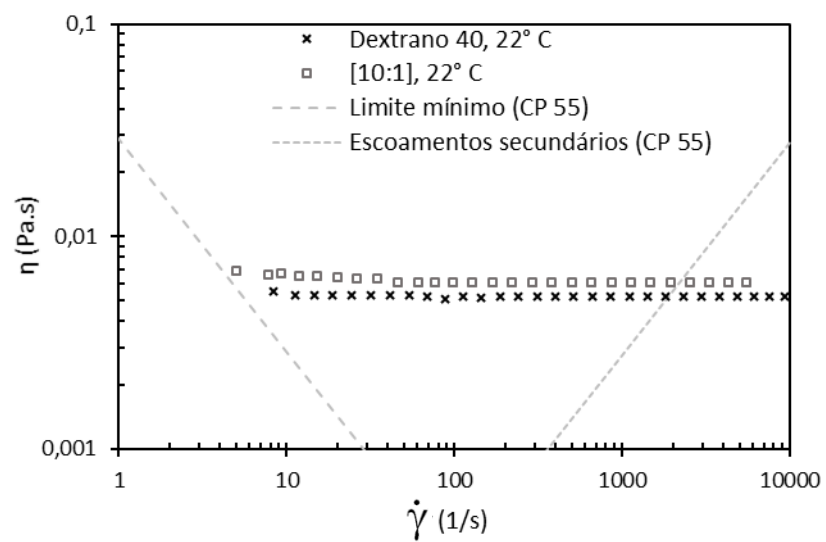
Anexo B



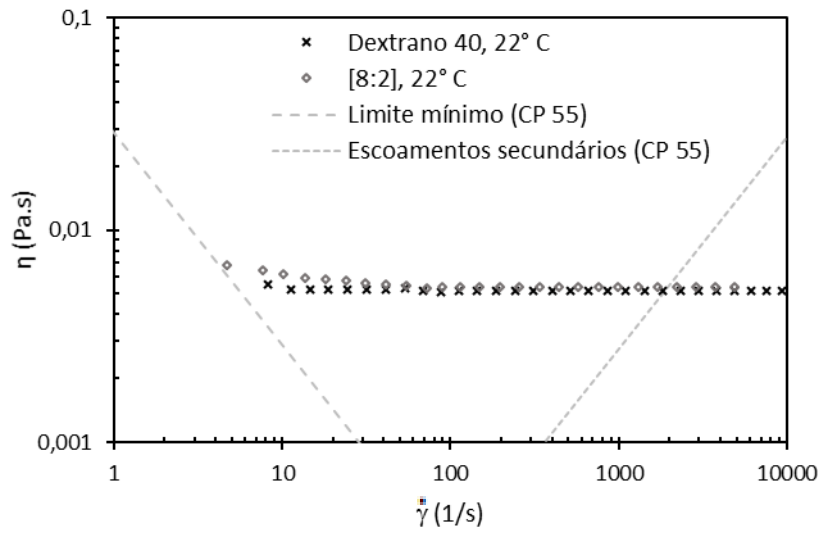
Anexo C

Representação dos gráficos de reologia dos diferentes rácios:

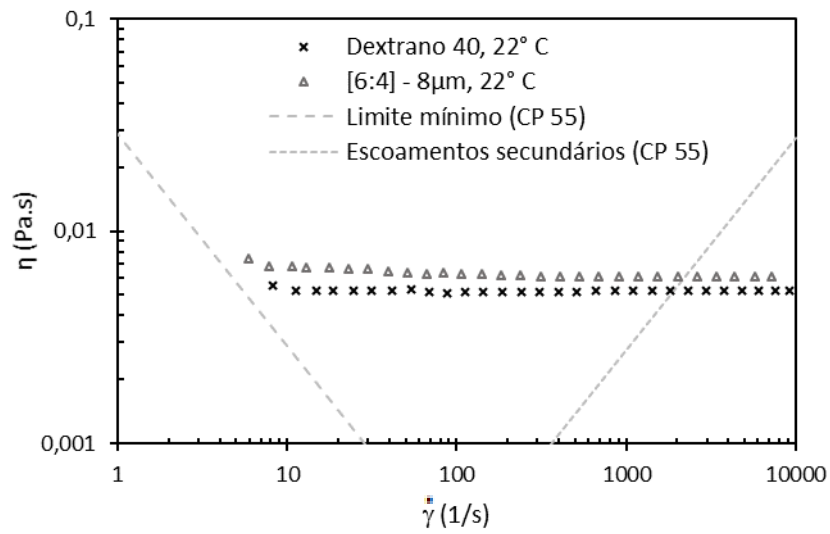
- Rácio de [10:1]



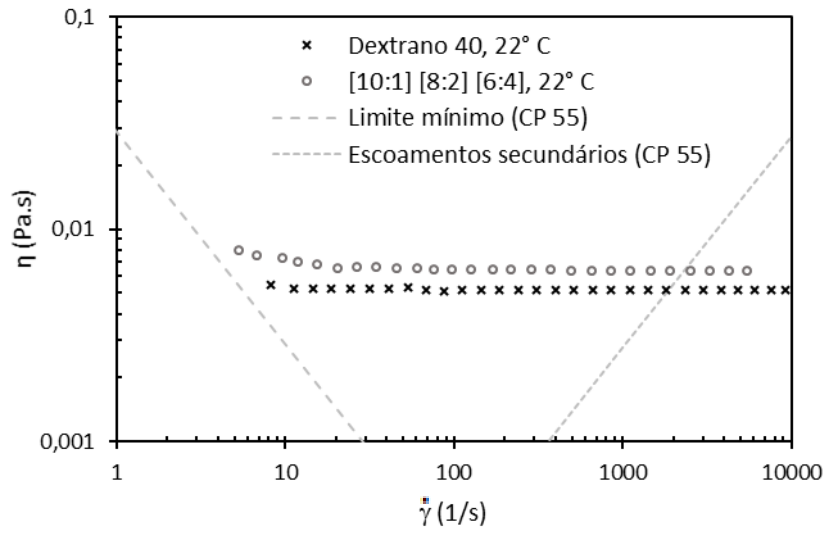
- Rácio de [8:2]



- Rácio de [6:4]



- Todos os rácios: [10:1], [8:2] e [6:4]



Anexo D

Tabela com a velocidade média das partículas em cada zona dependendo do caudal de escoamento.

Velocidade ($\mu\text{m/s}$)			
Q ($\mu\text{L/min}$)	Zona 1	Zona 2	Zona 3
5	130763,52	44746,78	26087,57
8	1088597,59	67958,66	43970,73
10	1494064,18	125883,19	68541,72