

FABRICAÇÃO DE MICROCANAIS UTILIZANDO O MÉTODO DE XUROGRAFIA: VISUALIZAÇÃO DA CAMADA LIVRE DE CÉLULAS

**E. Pinto¹, D. Pinho^{1,2}, D. Bento¹, T. Correia^{1,3}, V. Garcia¹, R. Dias^{1,2}, J. M. Miranda²,
R. Lima^{1,2}**

¹ Instituto Politécnico de Bragança (IPB), Campus Stª Apolónia, 5301-857 Bragança, Portugal; ruimec@ipb.pt

² CEFT, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), Porto, Portugal;

³ CIMO, Instituto Politécnico de Bragança (IPB), Campus Stª Apolónia, 5301-857 Bragança, Portugal;

PALAVRAS CHAVE: Microfabricação de baixo custo, xurografia, microcanaís, escoamento sanguíneo, microcirculação, espessura da camada livre de células.

RESUMO: *No presente estudo, pretendeu-se desenvolver/melhorar uma metodologia de microfabricação de baixo custo, conhecida por xurografia e efectuar a visualização e quantificação da camada livre de células (CLC) junto às paredes para diferentes escoamentos sanguíneos em microcanaís.*

1 INTRODUÇÃO

A xurografia é uma técnica que tem vindo a ser utilizada para a fabricação de moldes para a produção de microcanaís. Esta técnica possui como referencia a litografia suave, que por sua vez é a técnica mais utilizada na área da microfabricação. No entanto esta técnica é muito dispendiosa e requer uma sala limpa. A xurografia recorre a equipamentos e materiais usualmente utilizados na indústria gráfica, como plotters de corte, vinil e outros materiais. A técnica de xurografia tem como principal objectivo diminuir os custos de produção de microcanaís [1, 2].

O efeito Fahraeus indica que para microcanaís de dimensões inferiores a 300µm, ocorre o fenómeno de migração dos glóbulos vermelhos (GVs) para o centro do microcanal [3, 4]. Por sua vez, no efeito de Fahraeus-Lindqvist observa-se a variação da viscosidade do sangue com a alteração do diâmetro dos microcanaís. Este fenómeno está também associado à tendência dos GVs migrarem para o centro do microcanal, formando-se uma camada livre de células (CLC) junto das paredes do microcanal [5]. Recentemente foram

realizados estudos que demonstram que a CLC é afectada pelas condições fisiológicas do fluido, assim como pela geometria do microcanal [6, 7, 8]. Os objectivos principais deste trabalho são a fabricação de microcanaís em polidimetilsiloxano (PDMS) de várias geometrias com bifurcações e confluências, a partir de moldes produzidos por xurografia e a medição da espessura da CLC no escoamento de diferentes fluidos a diferentes caudais nos microcanaís produzidos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente foram desenvolvidos microcanaís num *software* CAD, baseados em estudos anteriores de fenómenos associados a bifurcações e confluências. As geometrias possuíam canal principal de 300, 500 e 1000 µm de largura e duas ramificações 50% da largura do canal que lhe deu origem. Na Figura 1, 2 e 3 podemos observar as geometrias utilizadas neste estudo, assim como as larguras dos microcanaís e a angulação das bifurcações e confluências.

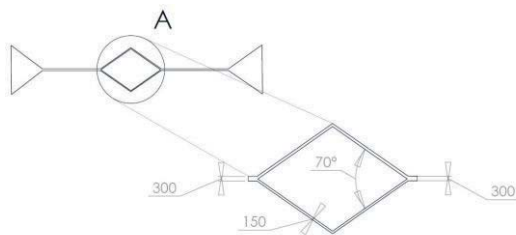


Fig. 1 Desenho esquemático da rede de microcanais da geometria A – Geometria com canal principal de $300\mu\text{m}$ e ramificações de $150\mu\text{m}$.

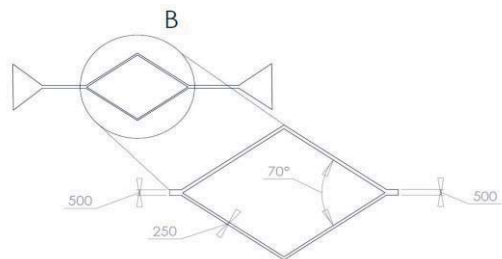


Fig. 2 Desenho esquemático da rede de microcanais da geometria B – Geometria com canal principal de $500\mu\text{m}$ e ramificações de $250\mu\text{m}$.

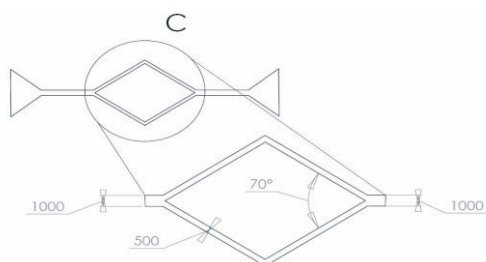


Fig. 3 Desenho esquemático da rede de microcanais da geometria B – Geometria com canal principal de $1000\mu\text{m}$ e ramificações de $500\mu\text{m}$.

Estas geometrias foram posteriormente utilizadas para produção de moldes com o recurso à técnica de xurografia. Para produção de moldes utilizou-se uma plotter de corte *Jaguar II* assim como o vinil *KEMICA TECMARK* serie 3000 de cor branco e o vinil *HEXIS* de cor dourado. Na Figura 4 podemos observar o equipamento utilizado para a fabricação dos moldes por xurografia.



Fig. 4 Equipamento utilizado para corte das geometrias para fabricação do molde.

Os moldes produzidos foram utilizados para fabricação de microcanais em PDMS. Produziu-se PDMS com agente de cura (razão de 10:1) que foi depositado no molde e preparou-se uma lâmina com PDMS (razão de 20:1) espalhado com o auxílio de um *spin-coater*. Efectuou-se a cura do PDMS numa estufa a 80°C durante 20 minutos. Recortaram-se os microcanais, realizaram-se furos de entrada e saída de fluidos e procedeu-se à selagem dos microcanais com a lâmina. Por fim, para ocorrer a adesão dos materiais, colocou-se o dispositivo na estufa a 80°C durante 24 horas.

Os microcanais produzidos foram utilizados para estudar escoamentos sanguíneos com diferentes percentagens de Hematócrito (Hct) e diferentes caudais. Os Hcts utilizados foram de 1, 5 e 15% em dextrano 40 e os caudais testados foram de 5, 10 e 15 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Como preparação das amostras sanguíneas de origem ovina, procederam-se a duas lavagens do sangue em soro fisiológico para a obtenção do Hct. Foi utilizada uma centrífugadora com uma velocidade de 2000rpm durante 15min a 4°C . No final das lavagens, foram colocados em 3 tubos de ensaio distintos 5 μL , 25 μL e 75 μL de hematócrito e adicionou-se dextrano 40 até se completar os 5 mL de amostra. Na Figura 5 podemos observar as diferentes etapas da lavagem da amostra de sangue para a obtenção do Hct.

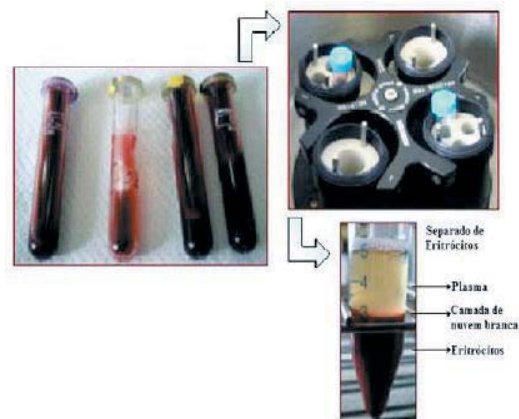


Fig. 5 Esquema das etapas utilizadas para a separação do Hct, dos restantes constituintes sanguíneos.

Foi utilizada uma bomba de seringa (*Harvard Apparatus PHD ULTRA™*) para efectuar o bombeamento dos fluidos. De forma a realizar-se a observação e captação dos filmes do escoamento, foi utilizado um microscópio invertido (*IX71, Olympus*) combinado com uma camera de alta velocidade (*i-SPEED LT*). Na Figura 6 é apresentada a montagem realizada para se efectuar o bombeamento e visualização dos escoamentos em microcanais.

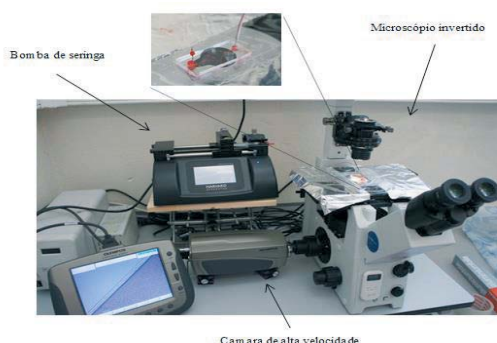


Fig. 6 Montagem realizada para visualizar o escoamento dos fluidos nos microcanais produzidos.

Por fim, foi medida a espessura da CLC junto das paredes dos microcanais, com o auxílio do *plugin Mtrack* do *ImageJ*. Realizou-se o *tracking* de 50 *frames* dos vídeos captados para cada região de interesse. Inicialmente efectuou-se um ajuste de contraste de imagem, permitindo uma fácil detecção da linha de separação do plasma. Em seguida realizou-se *tracking* das paredes dos microcanais e posteriormente realizou-se um *tracking* da linha representativa da CLC. Na Figura 7 é apresentado um *tracking* realizado com o *plugin Mtrack* para a obtenção das CLC junto às paredes do microcanal.

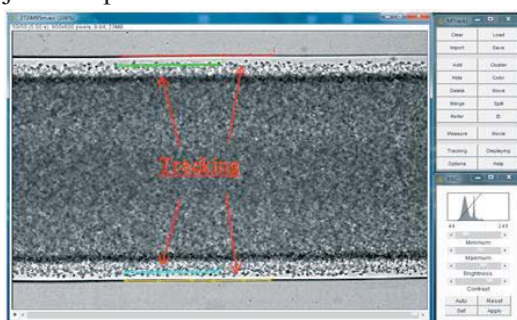


Fig. 7 *Tracking* efectuado em *ImageJ* com o *plugin Mtrack J* na entrada de um dos microcanais produzidos.

3 RESULTADOS

Nas Figuras 8 e 9 estão representadas as zonas de confluência das geometrias referentes ao microcanal de 300 e de 1000 μm . Estas imagens ilustram a influência do tamanho do microcanal na qualidade de fabricação.

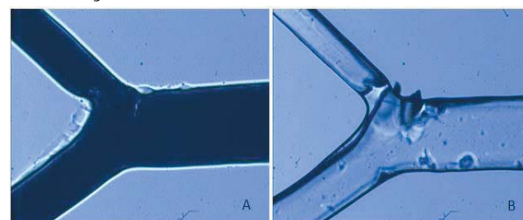


Fig. 8 Imagens obtidas em microscópio invertido com objectiva de 20x: A- Molde produzido com a geometria com largura do canal principal de 300 μm , na zona de confluência; B – Microcanal na zona de confluência da geometria com entrada de 300 μm , fabricado com o molde apresentado em A.

O microcanal de 300 μm possui, na zona de confluência, vários artefactos de fabricação. Pode-se observar diversas rugosidades no microcanal final. Verifica-se ainda que as ramificações são assimétricas. Foram produzidas arestas arredondadas no processo de fabricação do molde, traduzindo-se no microcanal final.

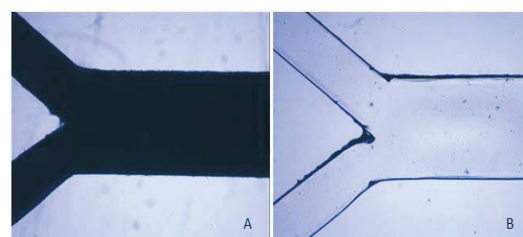


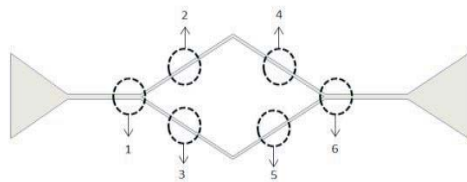
Fig. 9 Imagens obtidas em microscópio invertido com objectiva de 4x: A- Molde produzido com a geometria com largura do canal principal de 1000 μm , na zona de confluência; B – Microcanal na zona de confluência da geometria com entrada de 1000 μm , fabricado com o molde apresentado em A.

Relativamente aos moldes e microcanais de 1000 μm obtiveram-se arestas menos arredondadas comparativamente com o caso anterior. A zona de confluência possui muito melhor acabamento comparativamente com os microcanais de 300 μm e as ramificações são simétricas.

A diminuição da dimensão dos microcanais está correlacionada com a diminuição da qualidade dos microcanais. Este facto está associado à incapacidade do equipamento

manter a qualidade do corte para geometrias de dimensões mais pequenas.

Foram recolhidas diversas imagens microscópicas dos moldes produzidos e dos microcanais. A Figura 10 é uma representação esquemática das secções das geometrias onde foram recolhidas as imagens microscópicas.



- 1 – Antes da Bifurcação;
2,3,4,5 – Ao longo das ramificações;
6 – Após a confluência.

Fig. 10 Representação esquemática da geometria do microcanal e localização das secções onde foram recolhidos as imagens para obtenção dos valores da largura do molde e do microcanal.

Nas Figuras 11, 12 e 13 são apresentados sob a forma gráfica os resultados obtidos referentes à largura dos diferentes microcanais nas secções já identificadas. Os resultados foram processados com o auxílio do *ImageJ* e foi calculada uma média dos valores da largura dos moldes e dos microcanais produzidos de forma a simplificar a comparação dos resultados. São também apresentados os valores teóricos especificados no *software* CAD, permitindo efectuar uma comparação.

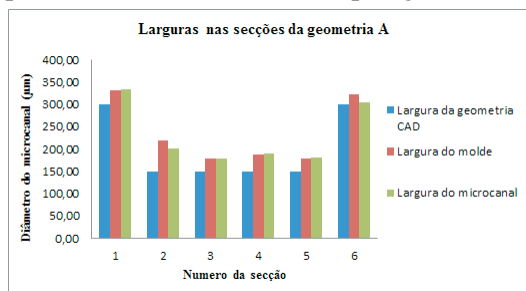


Fig. 11 Comparação dos valores teóricos da geometria de canal principal de 300 µm com os moldes produzidos e os respectivos microcanais fabricados.

Podemos observar na Figura 11 que os microcanais de 300 µm produzidos possuem uma largura média superior aos moldes que lhe deram origem. Existe uma

discrepância média mínima de 4 µm e máxima de 50 µm entre o molde produzido e o microcanal final.

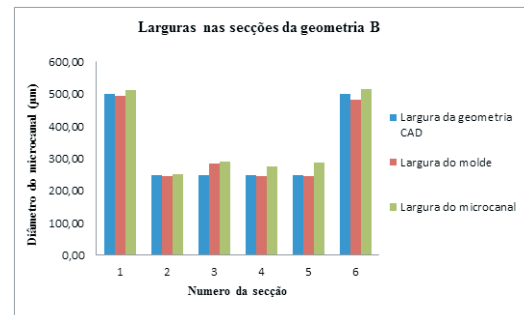


Fig. 12 Comparação dos valores teóricos da geometria de canal principal de 500 µm com os moldes produzidos e os respectivos microcanais fabricados.

Relativamente aos microcanais de 500 µm, da mesma forma que ocorreu nos microcanais de 300 µm, existe alguma discrepância entre os valores teóricos e os resultados obtidos na produção dos moldes e dos respectivos microcanais. Porém a diferença existente é inferior.

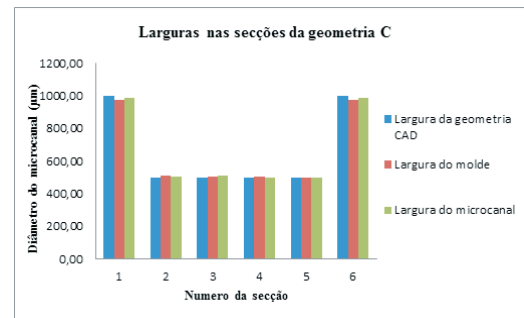


Fig. 13 Comparação dos valores teóricos da geometria de canal principal de 1000 µm com os moldes produzidos e os respectivos microcanais fabricados.

Os moldes e os microcanais de 1000 µm possuem maior proximidade com os valores teóricos, comparativamente com os resultados anteriormente analisados. O aumento da dimensão da geometria traduziu-se numa diminuição da percentagem de erro no processo de fabricação do molde e uma consequente diminuição de erro na fabricação dos microcanais.

Na Figura 14 pode-se observar que a diminuição da largura da geometria conduziu a um aumento do erro percentual

associado ao processo de fabricação dos microcanais.

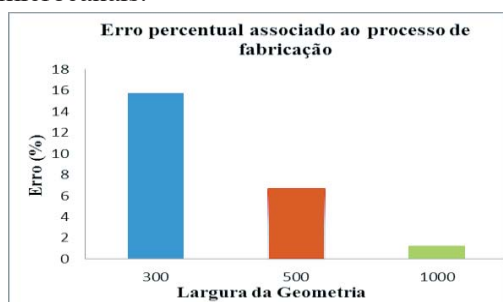


Fig. 14 Erro percentual médio entre os microcanais produzidos e a geometria CAD.

Ao longo dos diversos teste efectuados com a variação dos caudais, das percentagens de Hct e das diferentes geometrias, verificou-se que na zona das ramificações não ocorriam grandes alterações da camada livre de células (CLC). Por isso, optou-se analisar a variação da CLC na zona imediatamente antes da curvatura da bifurcação e na zona imediatamente após a confluência, onde o canal já é rectilíneo.

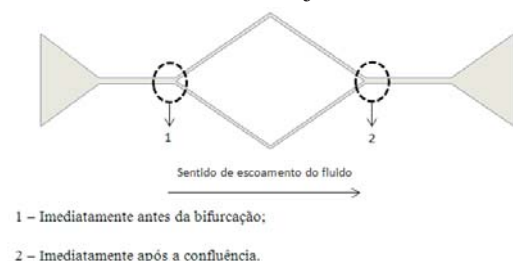


Fig. 15 Representação esquemática das zonas de medição da camada livre de células (CLC).

A recolha destes dados permitiu uma análise numérica com o auxílio do *ImageJ*, quantificando a CLC junto as paredes dos microcanais. Nas Figuras 16 e 17 são apresentadas imagens de escoamento sanguíneo num microcanal produzido com a geometria de canal principal de 500 μm.

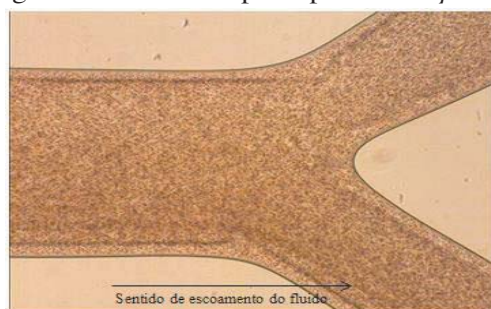


Fig. 16 Escoamento sanguíneo da zona de bifurcação com Hct de 5% e um caudal de 10 μL/min.

O escoamento sanguíneo era uniforme ao longo de toda a largura do microcanal. Relativamente ao escoamento após a bifurcação, este possuía total simetria nas duas ramificações. A ocorrência da simetria do escoamento deve-se a regularidade que os canais possuíam, na sua construção. Possuíam paredes rectas e a bifurcação era simétrica.

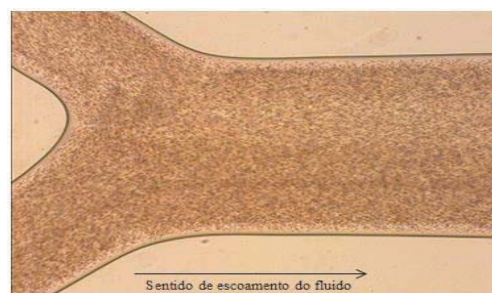


Fig. 17 Escoamento sanguíneo da zona de confluência com Hct de 5% e um caudal de 10 μL/min.

Na zona após confluência, a espessura da CLC é superior à espessura da CLC em todas as outras secções da rede de microcanais. Este fenómeno poderá estar relacionado com forma como a concavidade foi inserida no microcanal. Este facto poderá também estar relacionado com a movimentação axial das células ao longo do escoamento e poderá estar interligado com o escoamento associado a bifurcações e confluências.

Nas Figuras 18, 19 e 20 podemos observar as variações das CLCs obtidas no escoamento de fluidos no microcanal de 300, 500 e 1000 μm respectivamente. Podemos analisar a variação da CLC para os diferentes caudais, para as diferentes percentagens de Hct e nas duas zonas em estudo.

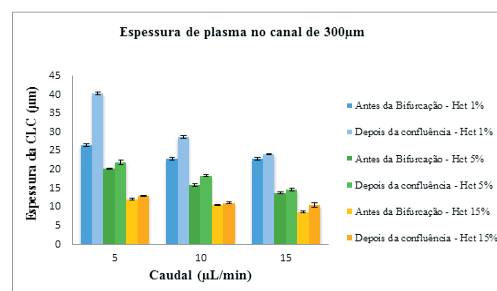


Fig. 18 Espessura da CLC dos escoamentos fluidicos realizados no microcanal de 300 μm.

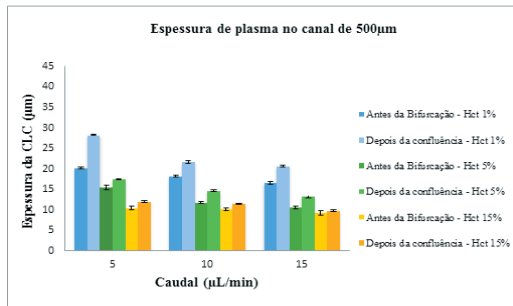


Fig. 19 Espessura da CLC dos escoamentos fluidicos realizados no microcanal de 500 µm.

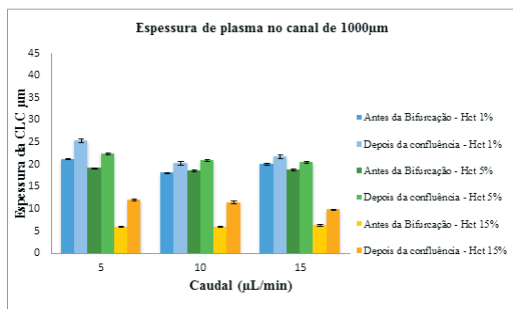


Fig. 20 Espessura da CLC dos escoamentos fluidicos realizados no microcanal de 1000 µm.

O aumento do caudal e da percentagem de Hct nos microcanais testados, produziu de forma relativamente linear uma diminuição da CLC. Portanto, estes diminuíram a tendência que os GVs possuíam em migrarem para o centro do microcanal. O aumento do número de células presentes no escoamento diminui o espaço disponível na zona axial, provocando um aumento de pressão da CLC e a sua consequente diminuição.

Verificou-se também que a espessura da CLC na zona de confluência é maior que na zona de bifurcação. Este aumento poderá ser justificado pela angulação que as curvaturas da bifurcação e da confluência apresentavam, mas poderá também estas associada à contínua migração das células para a zona axial ao longo do escoamento, como já foi referido anteriormente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FCT, COMPETE, QREN e União Europeia (FEDER) no âmbito dos projectos PTDC/SAU-BEB/105650/2008, PTDC/SAU-BEB/108728/2008, PTDC/EME-

MFE/099109/2008, e PTDC/SAU-ENB/116929/2010.

REFERÊNCIAS

- [1] Gojo, R., Morimoto, Y., Takeuchi, S., "Quick and Easy Fabrication of Microfluidic Channels with Water soluble Molds". Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, Japan. International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. October, 2008, San Diego, California, USA.
- [2] Daniel A. Bartholomeusz, Roland W. Boutté, Joseph D. Andrade, "Xurography: Rapid Prototyping of Microstructures Using a Cutting Plotter", Journal of Microelectromechanical Systems, vol. 14, n.º.6, December 2005.
- [3] Chien, S., Usami, S., Skalak, R., *Blood flow in small tubes In: Handbook of Physiology – The cardiovascular system IV*, pp.217-249, 1984.
- [4] Maeda, N., *Erythrocyte rheology in microcirculation*. Japanese Journal of Physiology, vol. 46, pp1-14, 1996.
- [5] Mchedlishvili, G., Maeda, N., *Blood flow structure related to red cell flow: a determination of blood fluidity in narrow microvessels*. Japanese Journal of Physiology, vol. 51, pp19-30, 2001.
- [6] R. Lima, S. Wada, S. Tanaka, M. Takeda, et al, "Biomedical Microdevices", vol. 2, pp153-167, 2008.
- [7] R. Lima, T. Ishikawa, Y. Imai, et al, Journal of Biomechanics, vol. 41, pp2188-2197, 2008.
- [8] V. Garcia, R. Dias, R. Lima, In Vitro Blood Flow Behaviour in Microchannels with Simple and Complex Geometries, Applied Biological Engineering – Principles and Practice, Ganesh R. Naik (ed.), InTech, vol. 17, pp394-416, 2012.