



Embolias Gasosas em Microcanais

e

Técnica de Focagem de Fluxo na Produção de Micropartículas de PDMS

Susana Filipa Teixeira da Silva

Dissertação apresentada(o) 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:

Dr. Rui Lima (IPB)

Dr. Valdemar Garcia (IPB)

Dr. Emilio J. Vega Rodríguez (UEX)

Dr. José M. Montanero Fernández (UEX)

outubro de 2015

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”.

(Albert Einstein)

Agradecimentos

A realização deste projeto não seria possível sem o contributo de algumas pessoas, que deste modo, apoiaram e incentivaram tornando possível a concretização desta tese.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao professor Doutor Rui Lima da Universidade do Minho e ao professor Doutor Valdemar Garcia da Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Bragança, orientadores principais da minha tese, pelo apoio incondicional, pelo acompanhamento cuidado e por um esclarecimento mais abordado acerca do tema em estudo.

Ao professor Doutor Emilio J. Vega Rodríguez e ao Doutor José M. Montanero Fernández da Universidade de Extremadura, co- orientadores da minha tese, agradeço a vossa disponibilidade contínua.

Agradeço ainda aos meus pais e avós, alicerces importantes na minha educação, e que sem eles nada disto seria possível. Obrigado pelo apoio e força dados para a realização dos meus objetivos. Agradeço ainda aos meus irmãos e namorado pelo apoio, incentivo e paciência.

Ao grupo de investigação do Instituto Politécnico de Bragança, um agradecimento especial, pelo auxílio prestado no laboratório. De uma maneira mais especial à Diana Pinho que sempre esteve presente para me auxiliar com os softwares utilizados, pela sua disponibilidade incansável para esclarecimento de dúvidas e com o envio de material para a Universidade de Extremadura.

Agradeço ainda à oportunidade de ter realizado Erasmus estágio na universidade de Extremadura, e pela utilização do seu laboratório.

Resumo

Este projeto de mestrado em Tecnologia Biomédica, de natureza essencialmente experimental, foi desenvolvido no Instituto Politécnico de Bragança (IPB) e na Universidade de Extremadura, Espanha.

Foram dois os objetivos principais do trabalho realizado: um consistiu em estudar a formação e o transporte de microbolhas capazes de gerar embolias gasosas, desenvolvido no IPB, outro consistiu na fabricação e estudo do comportamento de micropartículas de polidimetilsiloxano (PDMS), que simulam os glóbulos vermelhos, através de uma técnica desenvolvida na Universidade de Extremadura, designada por focagem de fluxo.

Para realizar o escoamento das microbolhas, foram fabricados pelo método de xurografia, microdispositivos de focagem de fluxo. Efetuaram-se escoamentos bifásicos de Dextrano (Dx40) com 2,5% hematócrito (Hct) e ar, a vários caudais. Nestes escoamentos foi possível visualizar a formação de microbolhas na zona de contração do microcanal. Foram analisados vários parâmetros: dimensão das bolhas, distância entre pares de bolhas, índice de deformação, velocidade das bolhas e espessura da camada livre de células em três zonas do microcanal.

O estudo das microbolhas ao longo dos vasos sanguíneos, torna-se relevante visto que podem obstruir estes vasos e assim promover a deterioração dos tecidos e, em determinados casos, causar a morte dos mesmos.

Na técnica de focagem de fluxo, utilizou-se polidimetilsiloxano (PDMS), glicerina e surfactante Brij 30, o que permitiu a produção de microgotas de PDMS com diâmetros entre os 10 e 11 μm . Após um processo de cura, obtiveram-se micropartículas com diâmetros inferiores, na ordem dos 4,4 μm . Foi analisado o índice de deformação médio das micropartículas em glicerina e Brij 30, e dos glóbulos vermelhos em Dx40, num canal com uma contração hiperbólica. Este trabalho possibilitou, pela primeira vez, a produção de micropartículas com diâmetros próximos dos glóbulos vermelhos (GVs). Estas micropartículas podem vir a ser utilizadas na produção de fluidos análogos ao sangue, simulando os GVs. Os fluidos análogos ao sangue são cada vez mais relevantes nos estudos *in vitro*. A utilização destes fluidos permite ultrapassar questões de natureza ética e de segurança.

Palavras-Chave: Fabricação de microcanais, escoamento sanguíneo, produção de microbolhas, produção de micropartículas, técnica de focagem de fluxo.

Abstract

This master's project in Biomedical Technology, was developed at the Polytechnic Institute of Bragança (IPB) and at the University of Extremadura, Spain.

This research work has two main objectives: to study the formation and transport of microbubbles capable of generating air embolism (work performed in IPB) and to fabricate and study the behaviour of microparticles of polydimethylsiloxane (PDMS), which simulate the red blood cells, through a technique developed at the University of Extremadura known as flow focusing.

By using the xurography method, microchannels with a flow focusing geometries were fabricated. A two phase fluid flow having Dx40 with 2.5% Hct and air, was tested at various flow rates. At the tested flows it was possible to visualize the formation of microbubbles at the contraction region of the microchannel. In this study, several parameters were analysed such as dimension of the bubbles, the distance between pairs of bubbles, deformation index, velocity of the bubbles and the thickness of the cell free layer in three different zones of microchannel, i. e., contraction, intermediate and expansion zone. The study of microbubbles along the blood vessels, became relevant as it may obstruct the vessels thereby promoting deterioration of the tissues and, in certain cases, cause the death thereof.

By means of a flow focusing technique, PDMS, glycerine and surfactant Brij 30 was used to produce PDMS droplets with diameters between 10 and 11 μm . However, after the curing process, microparticles with lower diameters of about 4 μm were obtained. It was also analysed the average deformation index of the microparticles in glycerine and Brij 30, and red blood cells (RBCs) in Dx40, flowing in a microchannel having a hyperbolic contraction. Hence, for the first time.

Generated microdroplets had diameters dimensions close to RBCs. These generated microparticles can simulate RBCs and produce blood analogous fluids. The blood analogous fluids are increasingly important in vitro blood studies as the use of these fluids can overcomes both ethical and safety issues.

Keywords: Fabrication of microchannels, blood flow, production of microbubbles, production of microparticles, flow focusing technique.

Conteúdo

Resumo	v
Abstract.....	vii
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xvii
Nomenclatura.....	xix
Capítulo 1	1
Introdução.....	1
1.1. Enquadramento, motivação e objetivos.....	1
1.2. Estrutura do relatório.....	1
Capítulo 2	3
Revisão da literatura.....	3
Capítulo 3	9
Circulação sanguínea e embolias gasosas	9
3.1. Vasos sanguíneos.....	9
3.2. Sangue e a sua constituição	10
3.3. Reologia do sangue.....	11
3.4. Embolias gasosas.....	15
Capítulo 4	19
Materiais e métodos.....	19
4.1. Fabricação de microcanais.....	19
4.1.1. Litografia suave	19
4.1.2. Embolias gasosas	21

Xurografia.....	21
Optimized SU-8 processing for low-cost microstructures fabrication without cleanroom facilities	24
4.1.3. Fluidos utilizados para o estudo das Embolias gasosas	25
4.1.4. Equipamento de visualização dos escoamentos em microcanais	26
4.1.5. Software utilizado para o estudo das Embolias gasosas	28
4.2. Técnica de focagem de fluxo na produção das micropartículas de PDMS	29
4.2.1. Litografia suave	29
4.2.2. Fluidos utilizados na produção de micropartículas	30
4.2.3. Equipamento usado na técnica de focagem de fluxo.....	33
4.2.4.....	35
Produção das micropartículas de PDMS	35
4.2.5. Análise da deformação das micropartículas e GVs	38
Capítulo 5	41
Resultados e a sua discussão	41
5.1. Experiências relativas ao escoamento de microbolhas em microcanais	41
Dimensões das bolhas.....	45
Distância entre bolhas.....	47
Índice de deformação das bolhas.....	48
Velocidade das bolhas	51
Camada livre de células (CLC)	53
5.2. Experiências relativas à produção de micropartículas de PDMS.....	56
5.3. Deformação dos GVs e das micropartículas.....	60
Capítulo 6	63
Conclusões e trabalhos futuros	63

6.1. Conclusões.....	63
6.2. Trabalhos futuros.....	66
Referências Bibliográficas.....	69
Anexos.....	I
Anexo 1	I
Anexo 2	II

Lista de Figuras

Figura 1.Representação esquemática da geometria de focagem de fluxo com escoamento de GVs, formação da CLC e formação de microbolha de ar [7].	4
Figura 2.Imagem de um escoamento de microbolhas de ar ao longo de um microcanal [7].	4
Figura 3.(a) Imagem de escoamento de micropartículas de PMMA e (b) escoamento de GVs, com a formação de camada de plasma junto das paredes do microcanal [14].....	5
Figura 4. Ilustração do esquema para a produção de microesferas de PDMS. (a) Geração de gotas microfluídicas de PDMS contendo um corante fosforescente por focagem de fluxo num dispositivo microfluídico de PMMA; (b) cura das gotas de PDMS a 70 °C fora do dispositivo; (c) lavagem e colheita das microesferas; (d) uso dessas microesferas [17].	6
Figura 5.Representação dos vasos sanguíneos [22].....	9
Figura 6.Representação das células do sangue [28].	10
Figura 7.Representação da forma dos GVs [30].....	11
Figura 8.Perfil de velocidade para hematócrito superior e inferior a 1%, a azul está representado o perfil parabólico e a vermelho o perfil pistão [28].....	12
Figura 9.Representação esquemática da viscosidade do sangue em função do hematócrito [32].	13
Figura 10.Representação das estruturas de GVs designadas por rouleaux [32].....	13
Figura 11.Efeito de Fahraeus-Lindqvist, variação da viscosidade em função do diâmetro do microcanal [28].....	14
Figura 12.Representação esquemática da migração axial dos GVs [30].....	15
Figura 13.Esquema de como ocorre uma embolia gasosa arterial [35].....	16
Figura 14.Esquema de como ocorre uma embolia gasosa venosa [37].	16
Figura 15. Representação das várias etapas da fabricação dos microcanais [40].....	19
Figura 16.Processo de aplicação do fotorresiste [Adaptado de [41] e [42].....	20
Figura 17.Processo global até à fabricação do modelo em PDMS e posterior descolagem do molde [Adaptado de [42] e [43]].	21
Figura 18.Representação do microdispositivo de focagem de fluxo e dimensões [7]. ..	21
Figura 19.Visualização da Plotter de corte Jaguar II [3].	22

Figura 20. Visualização dos microcanais numa placa de Petri.....	22
Figura 21. Visualização das embalagens contendo PDMS e o agente de cura.	22
Figura 22. Bomba de vácuo e exsicador utilizada para retirar bolhas de ar do PDMS [9].	23
Figura 23. Visualização do Spin Coater.	24
Figura 24. (a) Centrifugadora do sangue, (b) Visualização das três camadas do sangue após a centrifugação.	25
Figura 25. Visualização dos glóbulos vermelhos após remoção das outras componentes do sangue.	26
Figura 26. Visualização da instalação experimental, a) microscópio invertido Olympus IX71, b) câmara de alta velocidade i- SPEED LT, c) bomba de seringa kdScientific, d) a bomba de seringa New Era, utilizadas para promover a entrada de sangue e ar, respetivamente, no microcanal, e) ecrã de visualização.	27
Figura 27. Imagens obtidas pelo sistema de microvisualização: a) imagem sem tratamento, b) imagem com tratamento.	28
Figura 28. Aplicação do MTrackJ para determinar a CLC e o trajeto das bolhas de ar..	29
Figura 29. Dimensões do microcanal com contração hiperbólica, objetiva 16x, A) 382,8 μm , B) 172,0 μm , C) 45,2 μm , D) 354,8 μm , profundidade =54,8 μm	30
Figura 30. Componentes constituintes do PDMS.....	31
Figura 31. Visualização do equipamento de injeção de polímero no capilar.	31
Figura 32. Esquematização do equipamento utilizado na técnica de focagem de fluxo.	32
Figura 33. Misturadora para tornar homogénea a mistura glicerina e Brij 30.....	33
Figura 34. Representação esquemática do equipamento: (A) capilar localizado dentro de um bocal convergente-divergente, (B) sistemas de alta precisão de orientação- translação, (C) Câmara digital, (D) lentes óticas, (E) fase triaxial de tradução, (F) fibra ótica, (G) mesa ótica, (H) sistema pneumático de isolamento anti- vibração [18].	33
Figura 35. Visualização da nova configuração do bocal com secção retangular.	34
Figura 36. Visualização da câmara CMOS e auxiliar (CCD) com a respetiva célula.	35
Figura 37. Visualização da posição da agulha em ambas as câmaras CMOS e CCD.	36
Figura 38. a) Visualização da célula ligada à bomba de seringa, b) Bomba de seringa que promove a remoção e injeção de líquido.	37
Figura 39. Câmara CMOS alta velocidade (Photron, FASTCAM SA5).	37

Figura 40. Visualização de gotículas de PDMS.	38
Figura 41. Visualização de micropartículas de PDMS, após o processo de cura.	38
Figura 42. Visualização do resultado obtido pela aplicação da função Threshold.	39
Figura 43. Visualização do trajeto de: a) uma micropartícula, b) um GV.	40
Figura 44. Imagem microscópica (objetiva:4x) do microcanal com geometria de focagem de fluxo; a) entrada dos fluidos na zona de mistura, b) escoamento dos fluidos no microcanal após a mistura, c) formação das microbolhas na zona de contração do microcanal.	42
Figura 45. Representação das zonas em estudo ao longo de um microcanal.	43
Figura 46. Visualização da coalescência de uma bolha de ar no microcanal 2 com um caudal de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ para o Dex40_2,5%Hct e de 242 $\mu\text{l}/\text{min}$ para o Ar.	43
Figura 47. Visualização de bolha elíptica formada após coalescência, na zona 3.	44
Figura 48. Bolhas de ar e CLC no Microcanal 2 com um caudal de 0,007 ml/min para o Dx40 com 2,5%Hct e de 335 $\mu\text{l}/\text{min}$ para o Ar.	44
Figura 49. Visualização do processo de medição da dimensão das bolhas ao longo do microcanal.	45
Figura 50. Dimensão de cada bolha, para um caudal de sangue de 0,007 ml/min e de ar de 306 $\mu\text{l}/\text{min}$	45
Figura 51. Dimensão de cada bolha, para um caudal de sangue de 0,005 ml/min e de ar de 242 $\mu\text{l}/\text{min}$	46
Figura 52. Dimensão de cada bolha, para um caudal de sangue de 0,007 ml/min e de ar de 335 $\mu\text{l}/\text{min}$	46
Figura 53. Representação do modo como se procedeu à medição da distância entre duas bolhas.	47
Figura 54. Distância entre bolhas, para um caudal de sangue de 0,007 ml/min e de ar de 306 $\mu\text{l}/\text{min}$	47
Figura 55. Distância entre bolhas, para um caudal de sangue de 0,005 ml/min e de ar de 242 $\mu\text{l}/\text{min}$	48
Figura 56. Definição de índice de deformação (adaptado de [47]).	49
Figura 57. Média do índice de deformação das bolhas, para um caudal de sangue de 0,007 ml/min e de ar de 306 $\mu\text{l}/\text{min}$	49

Figura 58.Média do índice de deformação das bolhas, para um caudal de sangue de 0,005 ml/min e de ar de 242 μ l/min.	50
Figura 59.Média do índice de deformação das bolhas, para um caudal de sangue de 0,007 ml/min e de ar de 335 μ l/min.	50
Figura 60.Representação do modo como se procedeu à medição da velocidade de cada bolha.	51
Figura 61.Velocidade média de cada bolha ao longo do microcanal, para um caudal de sangue de 0,007 ml/min e de ar de 306 μ l/min.....	52
Figura 62.Velocidade média de cada bolha ao longo do microcanal, para um caudal de sangue de 0,007 ml/min e de ar de 335 μ l/min.....	52
Figura 63.Visualização microscópica das CLC e suas trajetórias ao longo do microcanal, numa solução de Ar com Dx40 com 2,5% Hct (Objetiva 10x). a) Imagem original, b)trajetória da CLC no centro e c)trajetória da CLC nas paredes (zoom 200%).	53
Figura 64.Representação gráfica da espessura da CLC ao longo do microcanal (zona 1), para um caudal de sangue de 0,005 ml/min e de ar de 306 μ l/min.	54
Figura 65.Representação gráfica da espessura média das CLC ao longo do microcanal, para um caudal de sangue de 0,007 ml/min e de ar de 306 μ l/min.	55
Figura 66.Representação gráfica da espessura média das CLC ao longo do microcanal, com um caudal de sangue de 0,007 ml/min e de ar de 335 μ l/min.	55
Figura 67.Diâmetro (Dd) das microgotas produzidas numa solução de glicerina, surfactante e PDMS, para o caudal de glicerina = 2x10 ³ μ l/h e de PDMS = 10 μ l/h....	57
Figura 68.Histograma da distribuição do tamanho das microgotas de PDMS, na sua produção.	58
Figura 69.Visualização de uma partícula gel no microcanal com contração hiperbólica.	59
Figura 70.Histograma da distribuição do tamanho das micropartículas alguns dias após a sua cura.	59
Figura 71.Visualização do microcanal com contração hiperbólica e as respetivas zonas de estudo.	61
Figura 72.ID médio dos GVs e das micropartículas com o seu respetivo desvio padrão a 95%.	61

Lista de Tabelas

Tabela 1.Meios e testes de diagnóstico para as embolias gasosas [7], [33].	17
Tabela 2.Dimensões dos moldes e dos microcanais fabricados.	24

Nomenclatura

CLC – Camada livre de células

Dd – Diâmetro das micropartículas

Dx40- Dextrano40

GBs – Glóbulos Brancos

GVs – Glóbulos Vermelhos

Hct - Hematócrito

ID - Índice de deformação

PDMS - Polidimetilsiloxano

PMMA- Polimetilmetacrilato

SDS- Sulfato de dodecil de sódio

Wt- Percentagem em massa

Capítulo 1

Introdução

1.1. Enquadramento, motivação e objetivos

O tema do presente trabalho intitulado “Embolias gasosas em microcanais e técnica de focagem de fluxo na produção de micropartículas de PDMS” enquadra-se no âmbito do projeto final de Mestrado em Tecnologia Biomédica, no ramo de Biomecânica e Reabilitação. Foi desenvolvido no Instituto Politécnico de Bragança e na Universidade de Extremadura, Espanha.

Os estudos efetuados neste trabalho, na área da microfluídica, podem contribuir para uma melhor compreensão do papel das microbolhas no desenvolvimento de embolias gasosas. Por outro lado, a fabricação de micropartículas, capazes de simular e substituir os glóbulos vermelhos do sangue, pode revelar-se útil na realização de estudos *in vitro*, dadas as dificuldades que muitas vezes surgem nos estudos *in vivo*.

A concretização deste projeto teve dois objetivos principais: um consistiu em estudar a formação e o transporte de microbolhas capazes de gerar embolias gasosas, outro consistiu na fabricação e estudo do comportamento de micropartículas de PDMS, que simulam os glóbulos vermelhos, através de uma técnica desenvolvida na Universidade de Extremadura, designada por focagem de fluxo.

1.2. Estrutura do relatório

Para uma melhor compreensão das questões envolvidas no presente trabalho, este relatório encontra-se dividido em 6 capítulos.

No Capítulo 1 apresenta-se uma pequena introdução, enquadramento e objetivos do trabalho.

No Capítulo 2 apresenta-se uma revisão da literatura relacionada com os estudos efetuados neste trabalho.

No Capítulo 3 abordam-se os aspetos relacionados com a circulação sanguínea e

embolias gasosas.

No Capítulo 4 são descritos os materiais e métodos utilizados na realização dos procedimentos experimentais relativos à fabricação de microcanais e à técnica de focagem de fluxo na produção de micropartículas de PDMS.

O Capítulo 5 apresenta os resultados e a sua discussão relativos à fabricação e escoamento gás-liquido em microcanais e à produção de micropartículas de PDMS utilizando a técnica de focagem de fluxo.

Por fim, no Capítulo 6 são dadas a conhecer as conclusões alcançadas com este estudo, e apresentadas perspectivas de trabalho futuro que permitam dar continuidade ao trabalho aqui apresentado.

Capítulo 2

Revisão da literatura

Para a realização deste projeto de investigação, foi realizada uma breve revisão de literatura com aspetos relevantes para a concretização deste trabalho.

Neste trabalho são abordadas duas técnicas de fabricação de microcanais e a produção de micropartículas de PDMS usando a técnica de focagem de fluxo.

A microfabricação é cada vez mais essencial para a ciência e tecnologia moderna, surgindo uma nova oportunidade de fabricar microestruturas ou até mesmo reconstituir estruturas já existentes em versões mais reduzidas [1], [2]. As duas técnicas da produção de microcanais mais utilizadas são a xurografia e a litografia suave.

A xurografia utiliza uma *plotter* de corte para recortar o negativo em vinil da estrutura que se pretende para o microcanal. É considerada uma técnica que apresenta baixos custos de produção de microcanais, tendo também como vantagens um procedimento rápido e um fácil manuseamento. É uma das técnicas que tem mais procura na microfabricação de moldes, pois utiliza materiais e equipamentos de fácil aquisição e manuseamento, como *plotters* de corte, vinil e outros [3 - 6].

A xurografia enquanto técnica de fabricação de microcanais utilizados em escoamentos bifásicos gás-liquido para a formação de bolhas, tem sido objeto de vários estudos [3 - 8]. Estes trabalhos demonstraram que este método de fabricação é capaz de produzir microcanais, com vantagens relativamente a outros métodos, como a litografia suave.

Várias geometrias de microcanais fabricados por xurografia, têm sido testadas para o escoamento de fluidos, nomeadamente, suspensão de GVs, microgotas e microbolhas.

As geometrias de microcanais em forma de Y e T, tem sido bastante utilizadas. Pelo facto de estas geometrias apresentarem limitações na produção de microbolhas, um novo

design de microcanal com geometria denominada focagem de fluxo tem vindo a ser utilizada, com resultados promissores [9-11].

A título de exemplo, na Figura 1 apresenta-se uma representação esquemática da geometria de focagem de fluxo, onde se pode ver o escoamento de GV's, a formação da camada livre de células (CLC) e a formação de uma microbolha de ar [7].

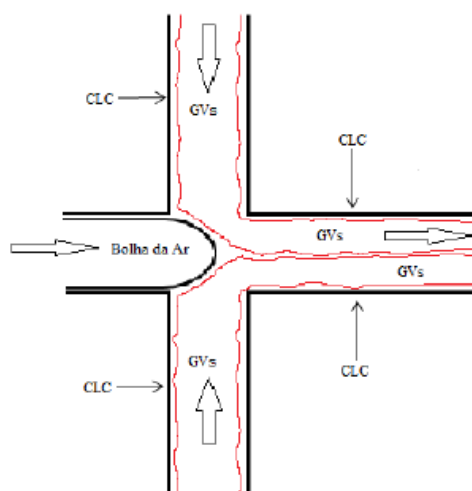


Figura 1. Representação esquemática da geometria de focagem de fluxo com escoamento de GV's, formação da CLC e formação de microbolha de ar [7].

Também como exemplo, na Figura 2 pode visualizar-se a evolução da forma de microbolhas em escoamento ao longo de um microcanal com geometria de focagem de fluxo [7].



Figura 2. Imagem de um escoamento de microbolhas de ar ao longo de um microcanal [7].

Microcanais disponíveis, anteriormente fabricados por litografia suave, foram também utilizados na realização do presente trabalho. Nesta técnica os microcanais são

fabricados após a obtenção dos moldes, por intermédio da fotolitografia. É a técnica mais utilizada para fabricar dispositivos de reduzidas dimensões para aplicações biomédicas [12],[13].

Estudos recentes usaram microcanais com contração hiperbólica feitos por litografia suave, para observar a CLC originada por fluidos análogos ao sangue com microcápsulas, para estabelecer uma comparação com a CLC formada pelos GVs [4], [7]. Nesses estudos verificou-se que as cápsulas de polimetilmetacrilato (PMMA) se apresentavam como esferas rígidas. A formação de CLC verificou-se no escoamento de microcápsulas de PMMA e no de GVs. Na Figura 3 (a) pode visualizar-se o escoamento de microcápsulas/micropartículas em canais com contração hiperbólica e a formação de camada livre de micropartículas. Na Figura 3 (b) pode visualizar-se o escoamento de GVs e a formação de CLC, permitindo deste modo estabelecer uma analogia entre os escoamentos de micropartículas e GVs [14].

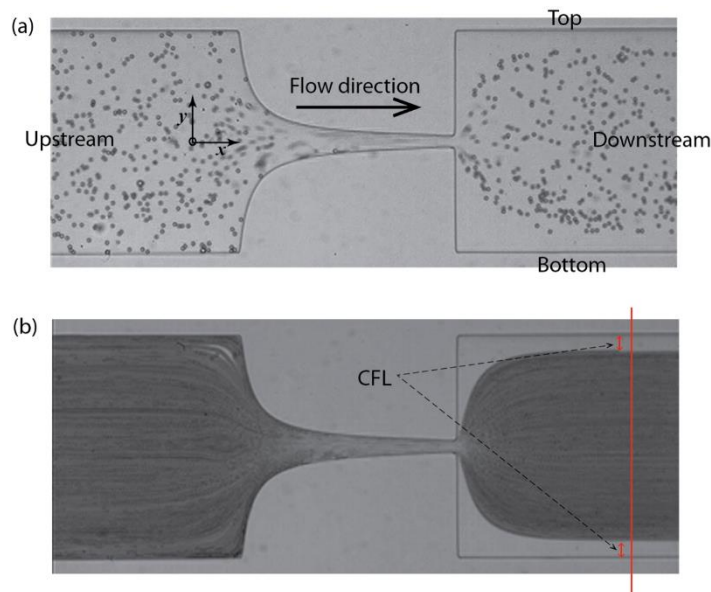


Figura 3.(a) Imagem de escoamento de micropartículas de PMMA e (b) escoamento de GVs, com a formação de camada de plasma junto das paredes do microcanal [14].

A contração hiperbólica do microcanal foi usada no presente trabalho no escoamento de micropartículas, como se refere na secção 4.1.2.

O estudo do comportamento do escoamento do sangue através de microcanais é crucial para melhorar a nossa compreensão sobre os fenômenos que acontecem na microcirculação humana. No entanto, as dificuldades associadas à utilização de sangue *in vitro*, tais como a coagulação e o armazenamento da amostra, promoveram o interesse crescente no desenvolvimento de fluidos com propriedades reológicas semelhantes ao sangue [15].

O polidimetilsiloxano (PDMS) é um material que devido às suas propriedades notáveis, como a boa transparência ótica, a biocompatibilidade e a permeabilidade a gases, é amplamente utilizado para fabricar dispositivos microfluídicos para experiências *in vitro* de sangue [16]. Recentemente, este elastômero inerte tem sido utilizado para produzir microesferas de PDMS monodispersas através de dispositivos microfluídicos [17]. Jiang et al. propuseram em 2012 uma técnica de focagem de fluxo, onde um precursor de PDMS foi disperso em microgotas dentro de uma fase aquosa contínua (ver Figura 4) [17].

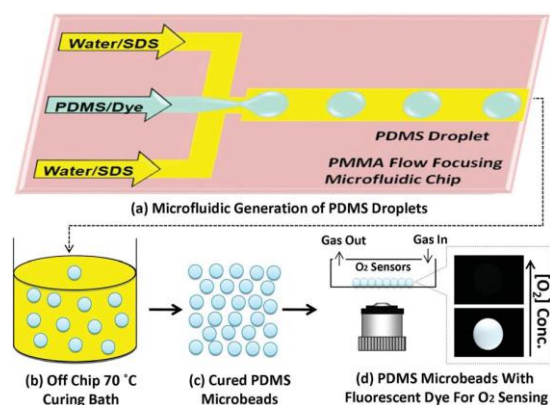


Figura 4. Ilustração do esquema para a produção de microesferas de PDMS. (a) Geração de gotas microfluídicas de PDMS contendo um corante fosforescente por focagem de fluxo num dispositivo microfluídico de PMMA; (b) cura das gotas de PDMS a 70 °C fora do dispositivo; (c) lavagem e colheita das microesferas; (d) uso dessas microesferas [17].

Utilizando este método os autores foram capazes de produzir microesferas de PDMS com um diâmetro médio de 80 μm . No entanto, para desenvolver fluidos análogos ao

sangue é essencial ter micropartículas PDMS com dimensões menores, inferiores a 20 μm [17].

No trabalho que aqui se apresenta, uma nova abordagem da técnica de focagem de fluxo foi utilizada para produzir micropartículas de PDMS com dimensões próximas dos GVs. Esta técnica foi proposta recentemente para produzir jatos de água, gotas, e emulsões com tamanhos que variaram de valores à escala submicrométrica até dezenas de microns [18], [19]. Esta técnica baseia-se também no princípio de focagem de fluxo, método acima mencionado. Esta técnica utiliza a rotura de um jato PDMS líquido constante para formar as micropartículas, o que leva a velocidades de produção mais elevadas.

Poder-se-ia alargar a revisão de literatura aqui apresentada, no entanto, considera-se suficiente para a compreensão dos trabalhos apresentados neste relatório.

Capítulo 3

Circulação sanguínea e embolias gasosas

Neste capítulo descreve-se sucintamente aspetos gerais ligados à circulação sanguínea e às embolias gasosas.

3.1. Vasos sanguíneos

O sistema circulatório é constituído por uma rede de vasos de diferentes calibres (ver Figura 5), artérias, capilares e veias onde é escoado o sangue que percorre todo o organismo [20], [21].

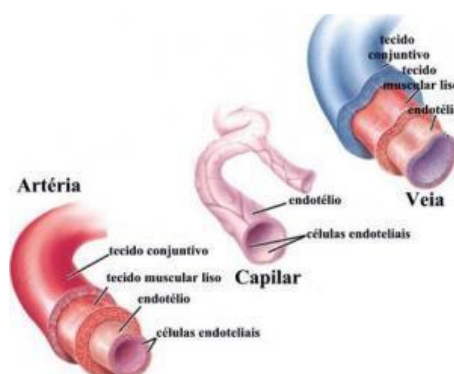


Figura 5. Representação dos vasos sanguíneos [22].

As artérias são vasos que possuem paredes espessas e dilatáveis, tendo como diâmetro 50 a 400 μm [22]. Têm como função o transporte do sangue que é bombeado pelo coração aos tecidos, ramificando-se e dando origem a vasos de menor calibre, as arteríolas [7], [23], [24].

As arteríolas têm como função drenar o sangue das pequenas artérias para os capilares, tendo diâmetros aproximadamente de 40 a 9 μm [22].

Os capilares permitem as trocas de gases, água e solutos entre o sangue e os fluidos intersticiais [22]. Estes vasos possuem diâmetros que variam entre 7 a 9 μm , e têm comprimentos variáveis, sendo que geralmente medem cerca de 1 mm.

As veias e vénulas funcionam como canais coletores e de armazenamento, designados vasos de capacitância e com características que permitem o retorno do sangue ao coração [25].

As veias possuem diâmetros geralmente compreendidos entre os 20 μm e os 5 mm [21].

3.2. Sangue e a sua constituição

O sangue é um fluido complexo, constituído por elementos celulares (ver Figura 6), glóbulos brancos, plaquetas, uma matriz de moléculas e iões designado como plasma e os glóbulos vermelhos [26], [27], [28]. Na Figura 6 as células estão identificadas em língua inglesa.

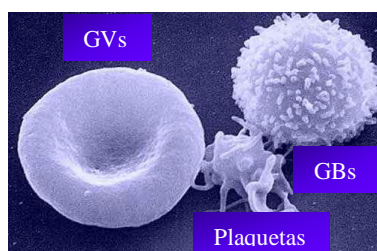


Figura 6. Representação das células do sangue [28].

Os glóbulos brancos ou leucócitos são células nucleadas que representam o principal mecanismo de defesa contra as infeções. A sua forma é, em regra, aproximadamente esférica, mas a sua superfície não é normalmente lisa [28], [29].

As plaquetas ou trombócitos são células em forma de disco, sem núcleos e com apenas 2 a 4 μm de diâmetro. A sua função é participar ativamente na coagulação do sangue, e na formação de trombos plaquetários como resposta à lesão dos vasos sanguíneos [28], [29].

O plasma é um fluido amarelado que constitui a parte líquida do sangue. É composto por cerca de 91% de água e 9% de outras substâncias como iões, proteínas, substâncias nutritivas, gases e produtos de degradação [22], [30], [31].

Os glóbulos vermelhos, GVs, também denominados por eritrócitos ou hemácias são formados na medula óssea e durante a maturação perdem os núcleos antes de entrarem no sistema circulatório.

Quando suspensos num meio isotónico (plasma ou soro fisiológico), os GVs apresentam-se sob a forma de discos bicôncavos com cerca de $7,5 \mu\text{m}$ de diâmetro. A sua forma bicôncava, como se mostra na Figura 7, permite que haja um aumento da área superficial do glóbulo vermelho e este se dobre pelo centro, diminuindo o tamanho. Este comportamento leva à formação de uma camada de plasma isenta de células junto às paredes, tornando mais fácil a sua passagem pelos vasos sanguíneos de menor calibre. A este efeito dá-se o nome de *Fahreus-Lindqvist* [25], [30].

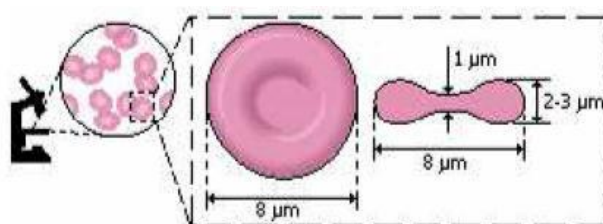


Figura 7. Representação da forma dos GVs [30].

3.3. Reologia do sangue

Ao longo dos anos foram realizados muitos estudos acerca do perfil de velocidades do fluxo sanguíneo em microvasos e microcanais, nunca havendo um consenso geral sobre estes perfis [28].

Através de algumas pesquisas efetuadas provou-se que o perfil de velocidades era influenciado por vários parâmetros, tais como o hematócrito (Hct), o diâmetro do vaso, a

velocidade de corte, as suspensões de fluidos (plasma ou dextrano), os erros experimentais, entre outros [28].

Como referido em [24], segundo Goldsmith, para soluções muito diluídas ($\sim 1\%$ Hct) o perfil de velocidades apresenta-se como uma parábola, e para soluções que apresentem um Hct superior o perfil é do tipo pistão (ver Figura 8).

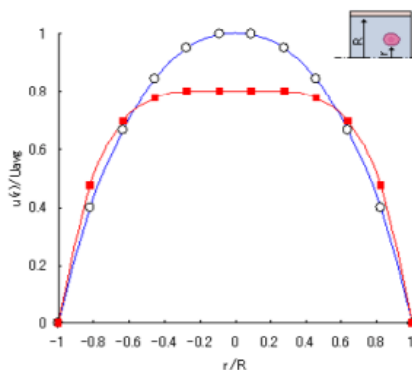


Figura 8. Perfil de velocidade para hematócrito superior e inferior a 1%, a azul está representado o perfil parabólico e a vermelho o perfil pistão [28].

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 parâmetros que influenciam a viscosidade do sangue são o hematócrito, a temperatura e a velocidade de escoamento [27], [32].

O hematócrito (Hct) corresponde à percentagem de volume de sangue ocupado pelos GVs. Este parâmetro apresenta um papel fundamental na viscosidade do sangue, visto que à medida que o Hct aumenta há um aumento da viscosidade. Esta relação não é linear tal como se observa na Figura 9 [32].

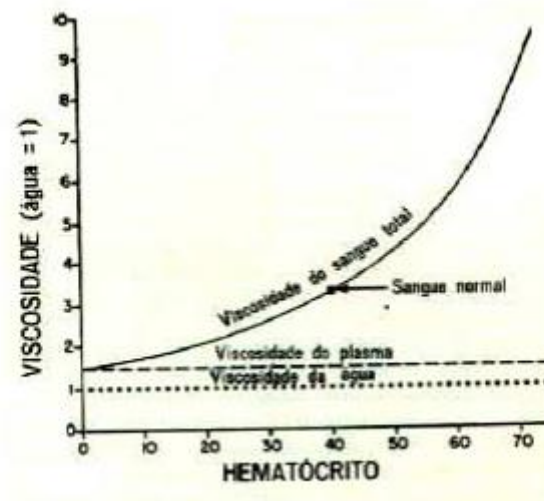


Figura 9. Representação esquemática da viscosidade do sangue em função do hematócrito [32].

A viscosidade sofre efeitos significativos com mudanças de temperatura, aumentando quando a temperatura diminui. A viscosidade aumenta aproximadamente 2% por cada °C que diminui [32].

O fluxo sanguíneo também afeta a viscosidade, pois esta aumenta de uma forma muito acentuada à medida que a velocidade do escoamento diminui. Como a velocidade de escoamento em pequenos vasos é extremamente pequena, cerca de 1 mm/s, a viscosidade do sangue pode aumentar 10 vezes pela ação isolada deste efeito. Este fenómeno é causado pela agregação dos GVs, que se deslocam lentamente entre si, formando estruturas designadas por *rouleaux* (ver Figura 10) [32].



Figura 10. Representação das estruturas de GVs designadas por *rouleaux* [32].

Contudo, não é só a formação das estruturas acima referidas que influenciam a viscosidade. Um dos efeitos que mais frequentemente acontece na microcirculação é designado por efeito de *Fahraeus-Lindqvist*, que provoca uma redução do Hct e conseqüentemente da viscosidade do sangue [30]. O efeito de *Fahraeus-Lindqvist* ocorre em diâmetros inferiores a 300 μm , observando-se a variação da viscosidade do sangue com a alteração do diâmetro dos microcanais, como se observa na Figura 11 [28].

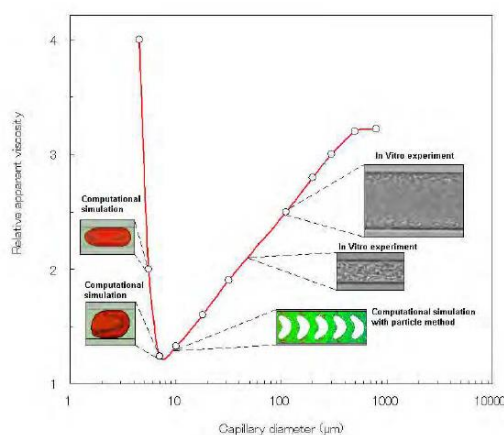


Figura 11. Efeito de Fahraeus-Lindqvist, variação da viscosidade em função do diâmetro do microcanal [28].

Muitos estudos foram efetuados sobre o comportamento dos GVs neste efeito, não sendo contudo unânimes. Uma das possíveis explicações poderá estar associada à diminuição do diâmetro do microcanal que provoca um decréscimo do hematócrito devido à formação de uma camada livre de células (CLC) junto às paredes do microcanal [28], [30], [32].

A CLC poderá estar relacionada com a tendência que os GVs têm em migrar para o centro do microcanal (ver Figura 12). É de salientar ainda que o plasma que se encontra junto às paredes, local onde as forças de corte são máximas, irá reduzir o atrito entre as GVs e as paredes do microcanal, causando uma diminuição da viscosidade do sangue [28], [30], [32].

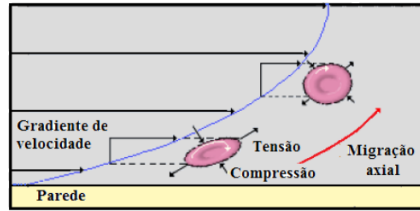


Figura 12.Representação esquemática da migração axial dos GVs [30].

3.4. Embolias gasosas

Uma embolia gasosa pode estar associada a procedimentos cirúrgicos que envolvam a circulação extracorpórea e craniotomia, exames de diagnóstico e trauma pulmonar por ventilação mecânica. Trata-se de uma lesão iatrogénica que está presente em praticamente todos os procedimentos médicos [33].

As bolhas gasosas formadas através dos procedimentos cirúrgicos, ou seja, a entrada de ar na circulação sanguínea podem ser potencialmente fatais, pois estas circulam ao longo dos vasos sanguíneos. Em zonas de menor pressão, o volume das bolhas aumenta, podendo alojar-se nos vasos de menor calibre, capilares, obstruindo o fluxo de sangue [7], [33].

Esta obstrução da circulação pode causar não só a deterioração dos tecidos, como levar à isquémia, podendo levar à morte de um indivíduo [7], [33].

As embolias gasosas podem ser classificadas em embolias arteriais e venosas, dependendo do mecanismo da entrada no sistema circulatório, assim como o local onde elas se instalam [7], [34].

Uma embolia gasosa arterial ocorre quando há entrada de ar na corrente sanguínea arterial (ver Figura 13).

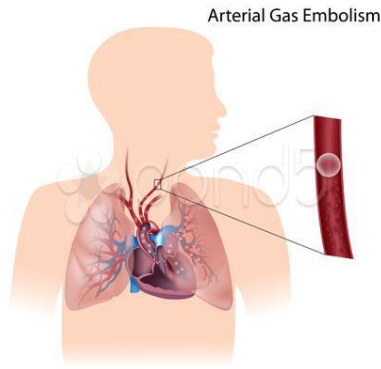


Figura 13. Esquema de como ocorre uma embolia gasosa arterial [35].

O ar proveniente das artérias expande excessivamente os pulmões, devido a uma lesão causada pelas diferenças de pressão [7]. As principais causas da embolia gasosa arterial são o uso da circulação extracorpórea, os procedimentos neurocirúrgicos realizados na posição sentada e na realização de mergulho através da variação da pressão com a profundidade, quando os mergulhadores ascendem rapidamente, ocorre a expansão gasosa pulmonar e eventual ruptura alveolar, ocorrendo neste caso a entrada de ar nas veias pulmonares [7].

Nestes casos particulares, em 38% a 45%, poderão ocorrer possíveis perdas de consciência em poucos segundos ou minutos após o retorno à superfície.

Uma embolia gasosa venosa ocorre quando existe a entrada de ar na circulação venosa e atinge o ventrículo direito e/ou a circulação pulmonar, sendo considerado um dos maiores problemas clínicos (ver Figura 14) [34], [36].

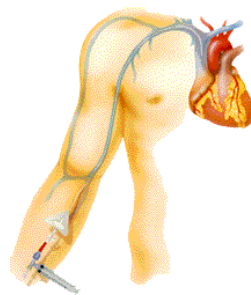


Figura 14. Esquema de como ocorre uma embolia gasosa venosa [37].

Nas embolias gasosas o ar é transportado para os pulmões através da artéria pulmonar. Neste caso a presença das bolhas de ar não provoca apenas a obstrução do fluxo sanguíneo, levando também a que os GVs, os GBs e as plaquetas se agreguem em torno das bolhas de ar. Estas estruturas levam a um aumento da permeabilidade da membrana, e numa última fase, causando o edema pulmonar [7], [34].

É possível ainda que a entrada de ar para os pulmões se manifeste através de alterações cardiopulmonares: arritmias cardíacas, hipertensão pulmonar, pressão no ventrículo direito e insuficiência cardíacas. Relativamente ao quadro neurológico pode causar confusões, ansiedade, convulsões, *deficit* motor e coma [7], [38].

Contudo, os procedimentos referidos anteriormente necessitam de um rápido diagnóstico por parte dos profissionais de saúde. Na tabela seguinte sintetizam-se alguns diagnósticos para as embolias gasosas.

Tabela 1. Meios e testes de diagnóstico para as embolias gasosas [7], [33].

Diagnóstico	
Embolia gasosa arterial	Embolia gasosa venosa
Tomografia computadorizada- para diferenciar a embolia gasosa cerebral de um enfarte ou sangramento intracraniano	Radiografia do tórax – permite detetar ar no ventrículo direito
Ressonância magnética- pode evidenciar a concentração de água no tecido lesado	Eletrocardiograma - deteta entrada de pequenos volumes de ar
-	Monitorização da pressão da artéria pulmonar - essa pressão pode permanecer normal devido ao ar preso na saída do ventrículo direito
-	Oximetria de pulso - a redução da pressão arterial de oxigénio é mais precoce que a queda verificada na pressão expirada do dióxido de carbono.

Capítulo 4

Materiais e métodos

Neste capítulo apresentam-se todos os métodos e materiais utilizados para a realização deste estudo. Ao longo deste capítulo descreve-se o processo de fabricação dos moldes e dos microcanais com geometria de focagem de fluxo, tanto por xurografia como por litografia suave. Descrevem-se, também, a visualização ao microscópio e os diferentes *softwares* utilizados para a obtenção dos resultados pretendidos. Apresenta-se ainda o procedimento experimental relativo à técnica de focagem de fluxo utilizada na produção de micropartículas de PDMS.

4.1. Fabricação de microcanais

4.1.1. Litografia suave

Para a obtenção dos microcanais por litografia suave é necessário proceder à fabricação dos moldes pela técnica de fotolitografia. No esquema que se segue, é possível observar todas as etapas que incluem a litografia suave.

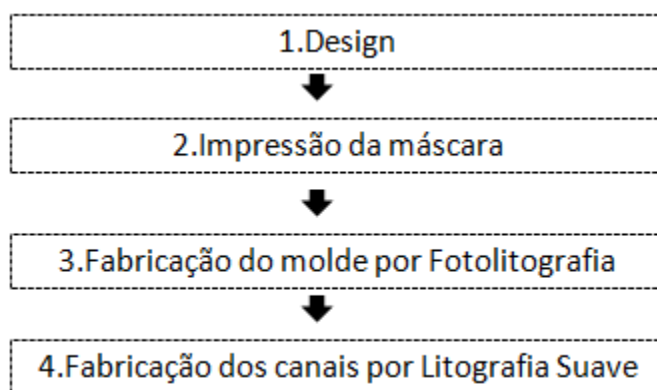


Figura 15. Representação das várias etapas da fabricação dos microcanais [40].

Numa primeira fase, a geometria é desenhada com auxílio do *software AutoCad*, onde de seguida, com recurso a uma impressora, é impressa uma máscara de poliéster de alta

resolução [39].

O processo de fabricação do molde, inicia-se com a deposição uma fina camada de fotorresiste sobre o substrato por centrifugação, com o auxílio de uma *spin coater* (ver Figura 16). Posteriormente, o fotorresiste é curado a uma temperatura adequada, de modo a que ocorra a evaporação do solvente e a solidificação do fotorresiste [40].

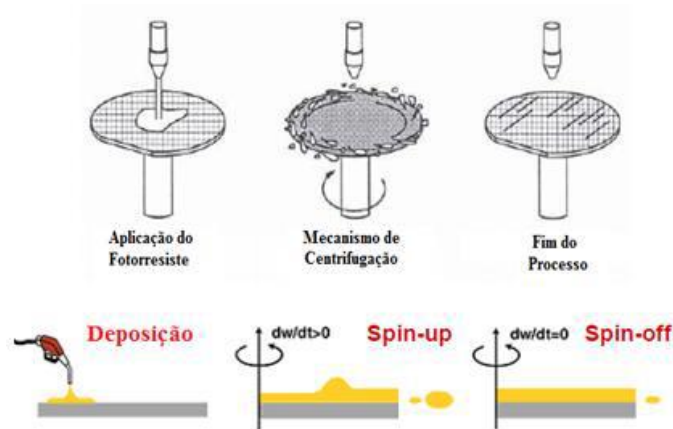


Figura 16. Processo de aplicação do fotorresiste [Adaptado de [41] e [42].

A camada de fotorresiste é exposta à luz UV através de uma máscara. É necessário através de equipamento sofisticado alinhar todos os componentes, o substrato, a luz UV e a máscara [39], [40].

Esta máscara é constituída por partes opacas e claras que definem o padrão, que posteriormente, será passado para o filme do fotorresiste. Após a exposição da luz UV é efetuada a revelação química do fotorresiste, em que o revelador tem como função, dissolver as partes expostas ou não expostas [39], [40].

Deste modo, obtidos os moldes em fotorresiste, prepara-se o PDMS e o seu agente de cura, que posteriormente será espalhado sobre o molde produzido por fotolitografia. Estes vão a curar à temperatura de 80° C durante aproximadamente 20 minutos [39], [40].

Por fim, remove-se a réplica do molde, permitindo obter um grande número de réplicas do molde desenhado, tal como se pode observar na Figura 17 b) [39], [40].

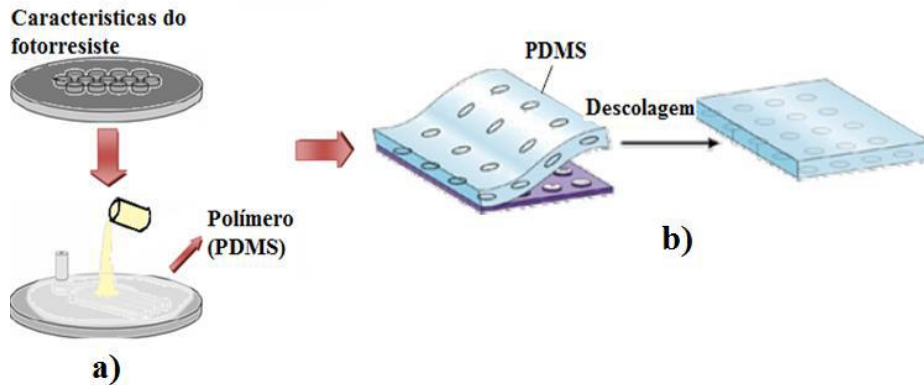


Figura 17. Processo global até à fabricação do modelo em PDMS e posterior descolagem do molde [Adaptado de [42] e [43]].

4.1.2. Embolias gasosas

Xurografia

Como referido anteriormente, utilizou-se a técnica de xurografia para a fabricação de um microdispositivo de focagem de fluxo. Para o desenho dos moldes foram utilizados dois programas essenciais, o *software CAD (Computer Aided Design)* e *software CorelDRAW*. As paredes dos microcanais (ver Figura 18) tinham uma espessura aproximada de $90 \mu\text{m}$ e as suas áreas na zona de medição variaram entre $12462,4$ e $15443,9 \mu\text{m}^2$.

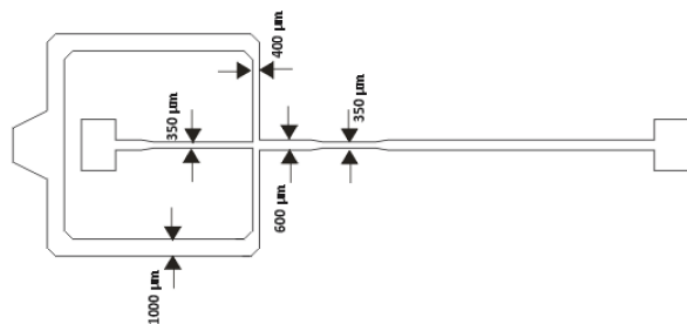


Figura 18. Representação do microdispositivo de focagem de fluxo e dimensões [7].

Posteriormente, procedeu-se à impressão dos moldes, através da *plotter* de corte *Jaguar II* (ver Figura 19).

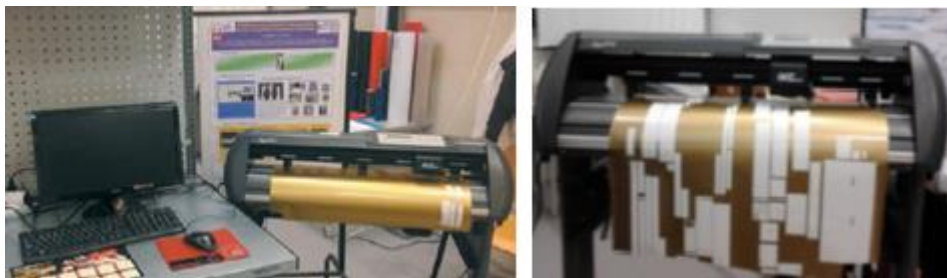


Figura 19. Visualização da Plotter de corte Jaguar II [3].

Uma vez impressos os respectivos microcanais, foi necessário retirá-los do vinil com o auxílio de um papel autocolante e uma pinça de pontas. Este processo teve que ser realizado com muito cuidado, de modo a não danificar o microcanal. Posteriormente colocaram-se os microcanais em placas de *Petri* (Figura 20).

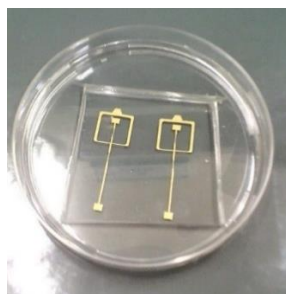


Figura 20. Visualização dos microcanais numa placa de *Petri*.

Depois de obtidos os moldes na caixa de *Petri*, procedeu-se à fabricação do PDMS. Para a produção deste polímero, preparou-se uma mistura de PDMS e agente de cura (ver Figura 21) numa proporção de 10:1 para os moldes das caixas de *Petri*, e uma razão de 20:1 para as lâminas que serão utilizadas posteriormente para vedar os microcanais.

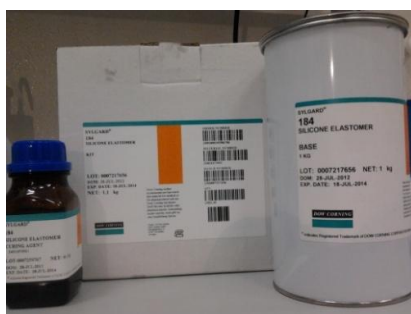


Figura 21. Visualização das embalagens contendo PDMS e o agente de cura.

Posteriormente à fabricação do PDMS foi necessário retirar todas as bolhas de ar existentes nesta mistura, tendo-se recorrido ao uso de uma bomba de vácuo (ver Figura 22).

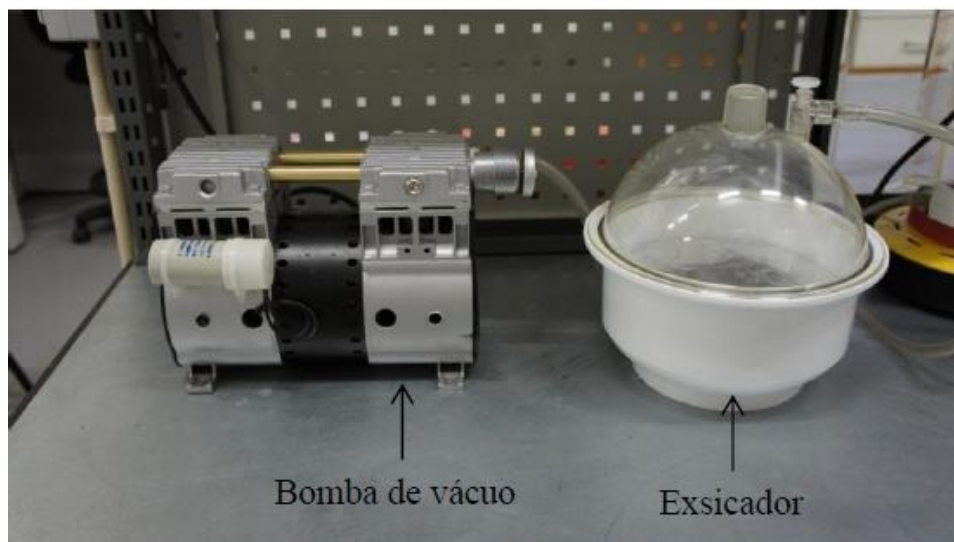


Figura 22. Bomba de vácuo e exsicador utilizada para retirar bolhas de ar do PDMS [9].

De seguida, o PDMS com uma razão 10:1 foi vazado para as caixas de *Petri*, sobre o molde. Posteriormente colocaram-se essas caixas na estufa durante 20 minutos a uma temperatura de 80°C, a fim de curar.

Após os 20 minutos, cortou-se o microcanal a fim de se realizarem os respetivos furos de entrada e saída.

Feitos os furos, procedeu-se à preparação das lâminas usando o PDMS numa razão de 20:1. Neste procedimento foi usado o *Spin Coater* (ver Figura 23) ligado à bomba de vácuo, de modo a tornar uniforme a mistura de PDMS nas lâminas.

Uma vez espalhado o PDMS, colocaram-se as lâminas na estufa a 80°C durante 20 minutos. Após este tempo, colocaram-se os microcanais sobre as lâminas, inseridas de novo na estufa a 80°C, durante 24 horas.



Figura 23. Visualização do Spin Coater.

Concluída a etapa da microfabricação, verificou-se que as medidas dos microcanais variavam, pelo facto de a *plotter* de corte possuir sempre alguns erros de precisão. Da Tabela 2 é possível constatar que as medidas dos moldes dos microcanais utilizados são superiores às medidas dos microcanais fabricados.

Tabela 2. Dimensões dos moldes e dos microcanais fabricados.

Microcanal	Medida do molde [μm]	Medida do microcanal [μm]
1	350	180,28
2	350	157,75

Optimized SU-8 processing for low-cost microstructures fabrication without cleanroom facilities

Inicialmente, foram fabricadas 9 geometrias com dimensões reduzidas dos microcanais com geometria de focagem de fluxo (ver geometrias em Anexo 1), por uma nova técnica de litografia-suave [44]. Este novo método de fabricação não necessita de instalações limpas e os materiais utilizados são mais económicos. No entanto, os microcanais não apresentaram uma boa resolução pelo facto de esta técnica ainda não estar otimizada para dimensões tão reduzidas (ver erros do microcanal em Anexo 2), como as requeridas por estes microcanais. Perante a dificuldade desta fabricação e, visto ter surgido a oportunidade de estudar e desenvolver a produção de micropartículas, foi abandonado o uso destas geometrias para o estudo de embolias gasosas.

4.1.3. Fluidos utilizados para o estudo das Embolias gasosas

Para a realização das experiências foi utilizado sangue de ovino devido aos problemas de ética relativo ao uso de sangue humano. O gás utilizado nas experiências com os canais de geometria de focagem de fluxo foi sempre o ar.

Após colheita do sangue por punção venosa, procedeu-se á sua centrifugação (Figura 24 (a)) com o objetivo de separar os glóbulos vermelhos do plasma. Após a centrifugação do sangue é possível observar as 3 camadas distintas (Figura 24 (b)), sendo que a inferior representa os glóbulos vermelhos, a camada central os glóbulos brancos e plaquetas e por fim a parte superior o plasma.

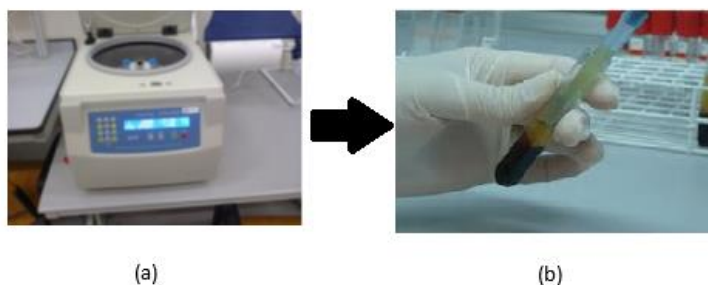


Figura 24. (a)Centrifugadora do sangue, (b) Visualização das três camadas do sangue após a centrifugação.

De seguida, retirou-se a parte superior e central (zona amarelada) com recurso a uma pipeta de *Pasteur*, tendo especial cuidado para não remover os glóbulos vermelhos. Acrescentou-se soro fisiológico aos GVs em volumes iguais (1:1). Repetiu-se novamente a centrifugação, de modo a obter os GVs separados dos restantes componentes do sangue, Figura 25.



Figura 25. Visualização dos glóbulos vermelhos após remoção das outras componentes do sangue.

Na fase seguinte foi preparado o Dextrano40 (Dx40), que foi usado como meio para suspender o volume pretendido de GVs. O Dx40 tem como objetivo manter as condições fisiológicas ótimas para os GVs (condições osmóticas e de sedimentação).

Com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur* colocou-se num tubo de *Falcon* um pouco de Dx40, para posteriormente, com o auxílio de uma micropipeta se colocar a quantidade de sangue necessária, conforme o hematócrito (Hct) que se pretende estudar. Neste estudo foi usado 2,5 % de Hct, ou seja 2.5% de volume de GVs num volume total de 5 mL de Dx40.

4.1.4. Equipamento de visualização dos escoamentos em microcanais

Para a visualização da atividade experimental foi utilizado um microscópio invertido *Olympus IX71* e uma câmara de alta velocidade *i- SPEED LT*. Estes e outros equipamentos constam da Figura 26.



Figura 26. Visualização da instalação experimental, a) microscópio invertido *Olympus IX71*, b) câmara de alta velocidade i- SPEED LT, c) bomba de seringa *kdScientific*, d) a bomba de seringa *New Era*, utilizadas para promover a entrada de sangue e ar, respetivamente, no microcanal, e) ecrã de visualização.

Os microcanais possuíam dois orifícios de entrada, um para o Dx40 com 2,5% Hct e outro para o ar. Dois tubos estabeleciam a ligação entre as bombas de seringa e as entradas nos microcanais.

O escoamento da solução de Ar com Dx40 com 2,5% Hct foi estabelecido com recurso a duas bombas de seringa. O escoamento de Dx40 com 2,5% Hct foi efetuado com a bomba representada por c) na Figura 26, sendo que no escoamento de ar se utilizaram duas seringas com volumes de 10 ml e 35 ml na bomba representada por d).

Para dar início à visualização do escoamento, inseriu-se o fluido com os glóbulos vermelhos numa seringa e o ar na outra. Colocadas em funcionamento, as bombas permitiam o escoamento, nos caudais pretendidos, dos dois fluidos em modo cocorrente nos microcanais.

Posteriormente, ligou-se a câmara de alta velocidade ao ecrã de visualização para se obterem as imagens e vídeos microscópicos pretendidos. Foi possível observar o escoamento dentro dos microcanais e a formação das bolhas de ar.

4.1.5. Software utilizado para o estudo das Embolias gasosas

O *Image J* é um programa que permite realizar processamento de imagens, sendo extensível a milhares de *plugins* e macros para a execução das mais variadas tarefas [45].

Para a visualização da CLC, camada livre de células, nos microcanais em estudo, foi necessário proceder ao tratamento das imagens. No painel disponível neste *software*, acedeu-se ao *Process*, opção *Filters* e por fim o usou-se a máscara *Unsharp mask*. Através deste tratamento obteve-se uma imagem mais nítida, tornando possível uma observação mais clara da CLC (Figura 27).

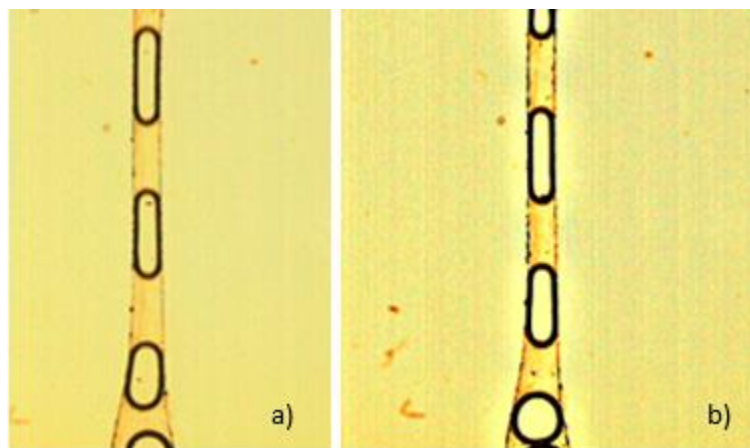


Figura 27. Imagens obtidas pelo sistema de microvisualização: a) imagem sem tratamento, b) imagem com tratamento.

Posteriormente, procedeu-se ao cálculo da espessura da CLC, com o auxílio do *plugin MTrackJ* (Figura 28). Através deste *plugin* foi também possível seguir o trajeto e a velocidade de uma bolha de ar com a função *add*, obtendo-se as coordenadas de cada ponto utilizando a opção *Measure*.

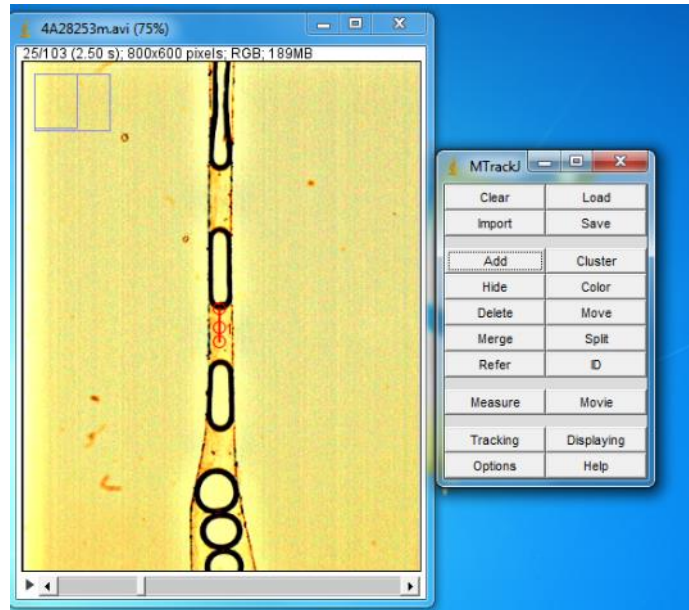


Figura 28. Aplicação do MTrackJ para determinar a CLC e o trajeto das bolhas de ar.

4.2. Técnica de focagem de fluxo na produção das micropartículas de PDMS

Neste subcapítulo serão descritos todos os procedimentos para a produção das micropartículas de PDMS.

4.2.1. Litografia suave

Na fabricação por litografia suave do microcanal usado para o estudo de escoamentos de micropartículas, utilizou-se o mesmo procedimento para a fabricação do PDMS, como referido anteriormente. Na Figura 29 observam-se as medidas do microcanal com contração hiperbólica.

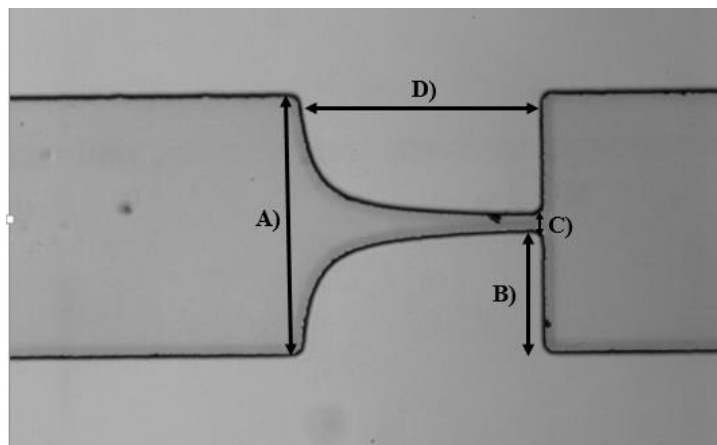


Figura 29. Dimensões do microcanal com contração hiperbólica, objetiva 16x, A) 382,8 μm , B) 172,0 μm , C) 45,2 μm , D) 354,8 μm , profundidade = 54,8 μm .

O canal hiperbólico vai permitir observar a formação de uma camada livre de células depois da contração. No caso de escoamentos sanguíneos em canais retangulares e sem contrações a CLC forma-se naturalmente, podendo a mesma ser artificialmente aumentada com a presença de contrações, neste caso uma contração hiperbólica, a qual para a observação de escoamentos de fluidos análogos também se torna vantajosa, pois vai ajudar a que essa camada livre de células se possa formar, permitindo ainda e ao mesmo tempo visualizar a deformação de micropartículas ou de células sanguíneas. Ou seja, na visualização de um só vídeo é possível analisar os dois parâmetros.

4.2.2. Fluidos utilizados na produção de micropartículas

Neste estudo usou-se o PDMS *Sylgard*® 184 da empresa *Dow Corning* (ver Figura 30), como uma fase dispersa. Este material é composto por dois componentes, um designado por pré-polímero que consiste em oligómeros de siloxano terminado por vinilo, e outro denominado agente de cura. Este é constituído por oligómeros de siloxano e catalisadores. Os dois componentes têm que ser misturados conforme o rácio desejado.

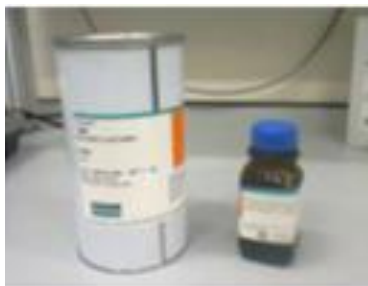


Figura 30. Componentes constituintes do PDMS.

Para este estudo, utilizou-se um rácio de 6:4 dos componentes, reduzindo-se a viscosidade para 827 cSt, sendo mais provável a obtenção de micropartículas estáveis [17].

Com o auxílio de uma balança foi possível realizar todas as medições necessárias de ambos os componentes.

Após a adição de ambos os componentes, misturou-se e aguardou-se uma hora até que as bolhas formadas desaparecessem. Após uma hora, inseriu-se o PDMS para uma seringa *BD PlastipakTM* de 1 ml.

Posteriormente, colocou-se a seringa numa bomba, de modo a proceder à injeção do polímero no capilar, por meio de uma agulha. A bomba de seringa, agulha e restante equipamento podem visualizar-se na Figura 31.

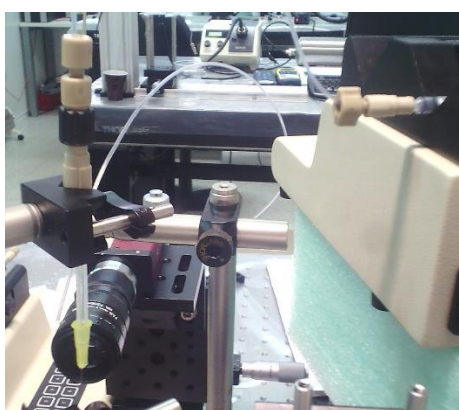


Figura 31. Visualização do equipamento de injeção de polímero no capilar.

No que diz respeito ao fluido inserido dentro de uma célula, que conterà também a agulha com PDMS, preparou-se uma solução de glicerina com 90% wt (22,5 g) e 10 % wt de Brij 30 (2,5 g) num total de 25 gramas. Saliente-se que foram testadas várias percentagens dos dois componentes até chegar a estes valores, que permitiam evitar o fenómeno de coalescência de micropartículas. Também por este motivo, usou-se o surfactante Brij 30 em detrimento de outros. O Brij 30 tem também a vantagem de ser miscível com o PDMS formando uma solução transparente o que permite uma maior visibilidade do capilar e das microgotas [45].

A célula contendo glicerina + Brij30, a agulha inserida no capilar contendo PDMS para posterior injeção, mostra-se na Figura 32.

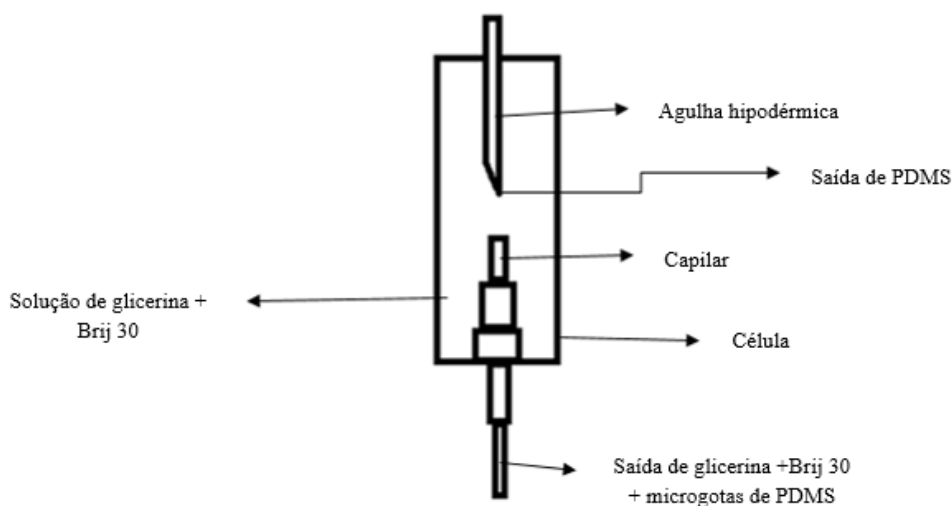


Figura 32. Esquematização do equipamento utilizado na técnica de focagem de fluxo.

Posteriormente, colocou-se a solução numa misturadora (ver Figura 33), a uma temperatura de 50°C e 70 rpm (rotações por minuto) durante uma hora.



Figura 33. Misturadora para tornar homogênea a mistura glicerina e Brij 30.

Após uma hora, retirou-se a solução e deixou-se arrefecer para posteriormente ser inserida numa das seringas de vidro e na célula onde estava situado o capilar. Esta solução tinha de cobrir a totalidade do capilar para facilitar a focagem do mesmo.

4.2.3. Equipamento usado na técnica de focagem de fluxo

O dispositivo experimental utilizado para a realização deste estudo é representado na Figura 34. Neste procedimento foi utilizada uma agulha hipodérmica (*Becton Dickinson MICROLANCE 3 30G 1/2*) com um diâmetro interno de cerca de 160 μm e externo de 300 μm e com um raio hidráulico exterior na ponta da agulha de alguns microns. A ponta da agulha utilizada neste estudo não foi submetida a qualquer tipo de tratamento.

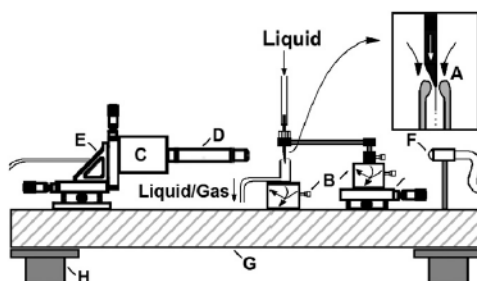


Figura 34. Representação esquemática do equipamento: (A) capilar localizado dentro de um bocal convergente-divergente, (B) sistemas de alta precisão de orientação-translação, (C) Câmara digital, (D) lentes óticas, (E) fase triaxial de tradução, (F) fibra ótica, (G) mesa ótica, (H) sistema pneumático de isolamento anti- vibração [18].

A agulha é inserida no interior de um bocal convergente-divergente (A) com um *pescoço* de cerca de 150 μm de diâmetro, usando sistemas de alta precisão de orientação-translação (B). O bocal foi formado numa das extremidades de um capilar de borosilicato.

Neste estudo chegou-se à conclusão que um bocal com secção circular (Figura 35), com um diâmetro interno de 200 μm e externo de 4 mm, seria a melhor solução.

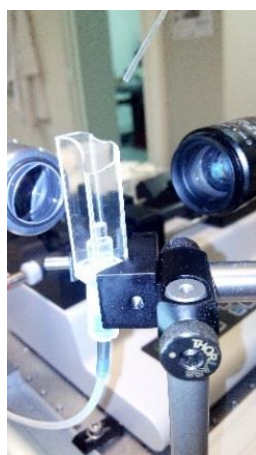


Figura 35. Visualização da nova configuração do bocal com secção retangular.

As imagens digitais da configuração do fluido foram adquiridas usando uma câmara CMOS alta velocidade (*Photron, FASTCAM SA5*) (C), o que permite a aquisição de imagens com um tempo de exposição de 25 μs . A câmara foi equipada com um conjunto de lentes óticas (D).

As lentes óticas selecionadas dependem do tamanho do objeto da imagem, com uma ampliação variando 0,076-0,52 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. Este parâmetro foi calculado para cada sistema ótico através da medição do diâmetro de uma haste de calibração localizada no campo de visão. Deste modo, teve-se em conta a distorção ótica causada pela célula de vidro.

A câmara pode ser deslocada na horizontal e na vertical por meio de um estágio de translação triaxial (E) para focar o jato. A configuração do fluido é iluminada a partir de uma luz branca fornecida por uma fibra ótica (F), ligado a uma fonte de luz.

Todos estes elementos foram montados sobre uma mesa ótica (G) com um sistema de isolamento anti- vibração pneumática (H) para amortecer as vibrações provenientes do edifício.

4.2.4. Produção das micropartículas de PDMS

Nesta secção descreve-se o modo como se produziram as micropartículas.

Numa primeira etapa utilizaram-se duas câmaras para captar a posição da agulha relativamente ao capilar (ver Figura 36). Uma câmara auxiliar CCD (não representada na Figura 34) permitiu obter imagens da agulha com um eixo ótico perpendicular ao da câmara CMOS.



Figura 36. Visualização da câmara CMOS e auxiliar (CCD) com a respetiva célula.

Posteriormente, colocou-se a agulha dentro do capilar (ver Figura 37).



Figura 37. Visualização da posição da agulha em ambas as câmaras CMOS e CCD.

Nesta técnica, o PDMS foi injetado a um caudal constante de 0,1 ml/h através de uma agulha hipodérmica, de modo, a formar uma película sobre a superfície exterior da agulha. Por intermédio de uma bomba de seringa (*Harvard Apparatus PHD 4400*), a glicerina fluía em direção à ponta da agulha produzindo um ligamento de PDMS.

A mistura (glicerina + surfactante + microgotas de PDMS) foi aspirada através do capilar com um caudal de 2 ml/h por meio de uma outra bomba de seringa (ver Figura 38 a)). A mesma bomba de seringa, ampliada na Figura 38 b), à medida que removía a mistura, injetava a solução (glicerina + Brij 30), produzindo-se o efeito de focagem.

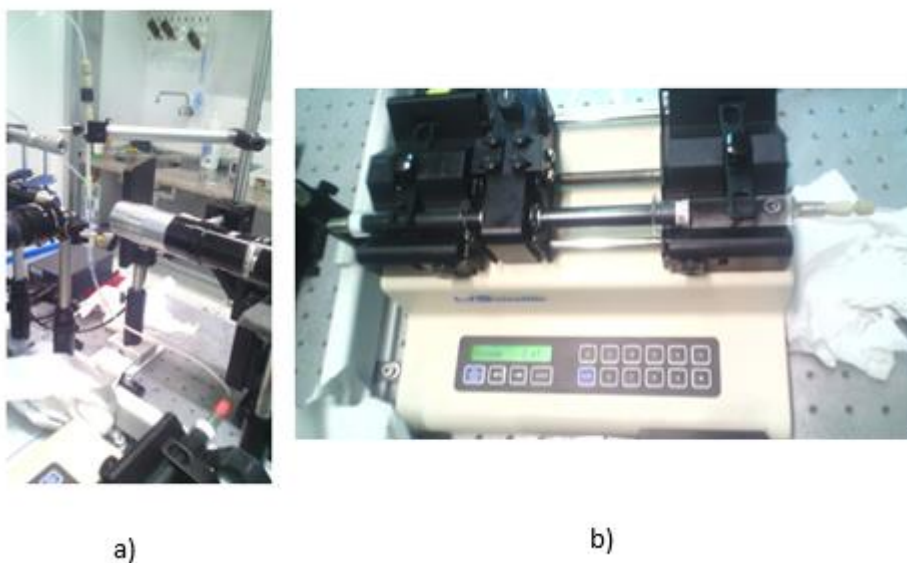


Figura 38.a) Visualização da célula ligada à bomba de seringa, b)Bomba de seringa que promove a remoção e injeção de líquido.

Os líquidos em estudo são movidos por forças de viscosidade e de pressão, estabelecendo-se um escoamento cocorrente. A visualização deste escoamento foi possível através de uma camara de alta velocidade como se mostra na Figura 39.

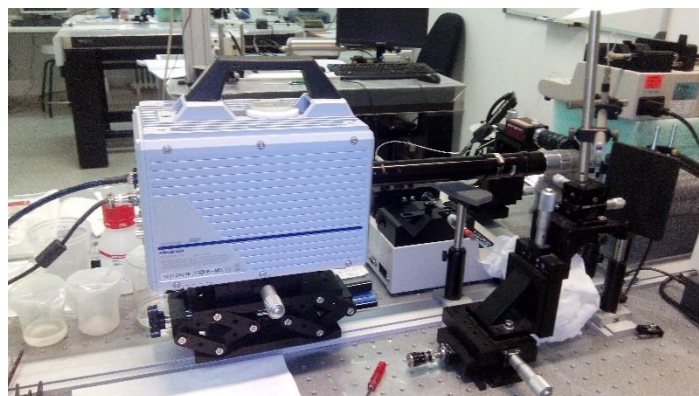


Figura 39.Câmara CMOS alta velocidade (Photron, FASTCAM SA5).

O resultado obtido por esta técnica é visível na Figura 40, onde um jato de PDMS se divide em gotículas que depois se transformam em micropartículas.



Figura 40. Visualização de gotículas de PDMS.

Posteriormente a este processo, removeu-se a solução para dentro de um *gobelé*, com muita precaução de modo a não danificar as gotículas produzidas. De seguida estas gotículas foram a curar durante mais de 24 horas numa misturadora uma temperatura de 70° C, formando-se as micropartículas.

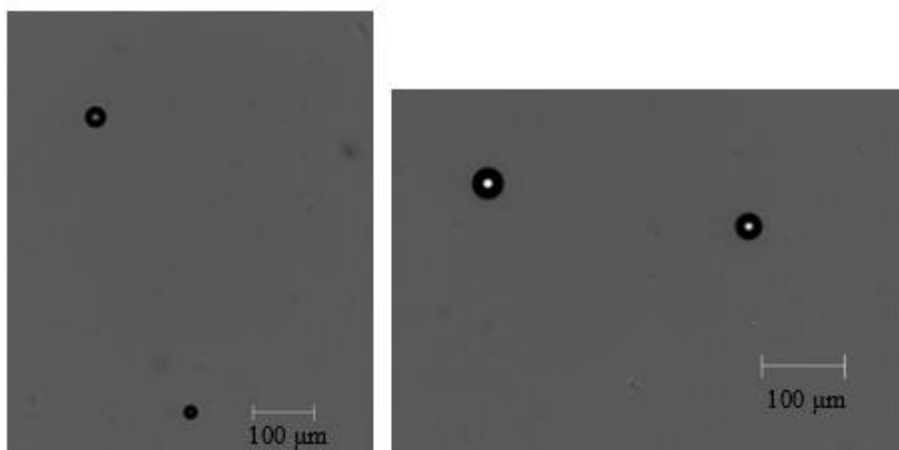


Figura 41. Visualização de micropartículas de PDMS, após o processo de cura.

4.2.5. Análise da deformação das micropartículas e GVs

Nesta secção serão descritos todos os processos utilizados para a análise das micropartículas de PDMS e GVs. Para analisar as micropartículas de PDMS e avaliar o seu potencial, para serem usadas em substitutos dos GVs, foi estudada a sua deformação com recurso ao *software* Image J.

Numa primeira etapa, recorreu-se á função *Z-project*, para a criação da média da imagem original. Posteriormente, por meio da função *Image Calculator*, realizou-se a subtração das duas imagens já obtidas.

De seguida, utilizou-se a função *Threshold* para converter a imagem das micropartículas e GVs, em imagem a preto e branco, tendo-se especial cuidado com esta função, pois permite ainda delinear as micropartículas e GVs sem que estes percam a configuração inicial (ver Figura 42).



Figura 42. Visualização do resultado obtido pela aplicação da função Threshold.

Com recurso à função *ROI Manager*, foi possível realizar o seguimento tanto das micropartículas como dos GVs.

Na Figura 43 a), visualiza-se o seguimento de uma micropartícula e na b) de um GV através dos processos descritos anteriormente.

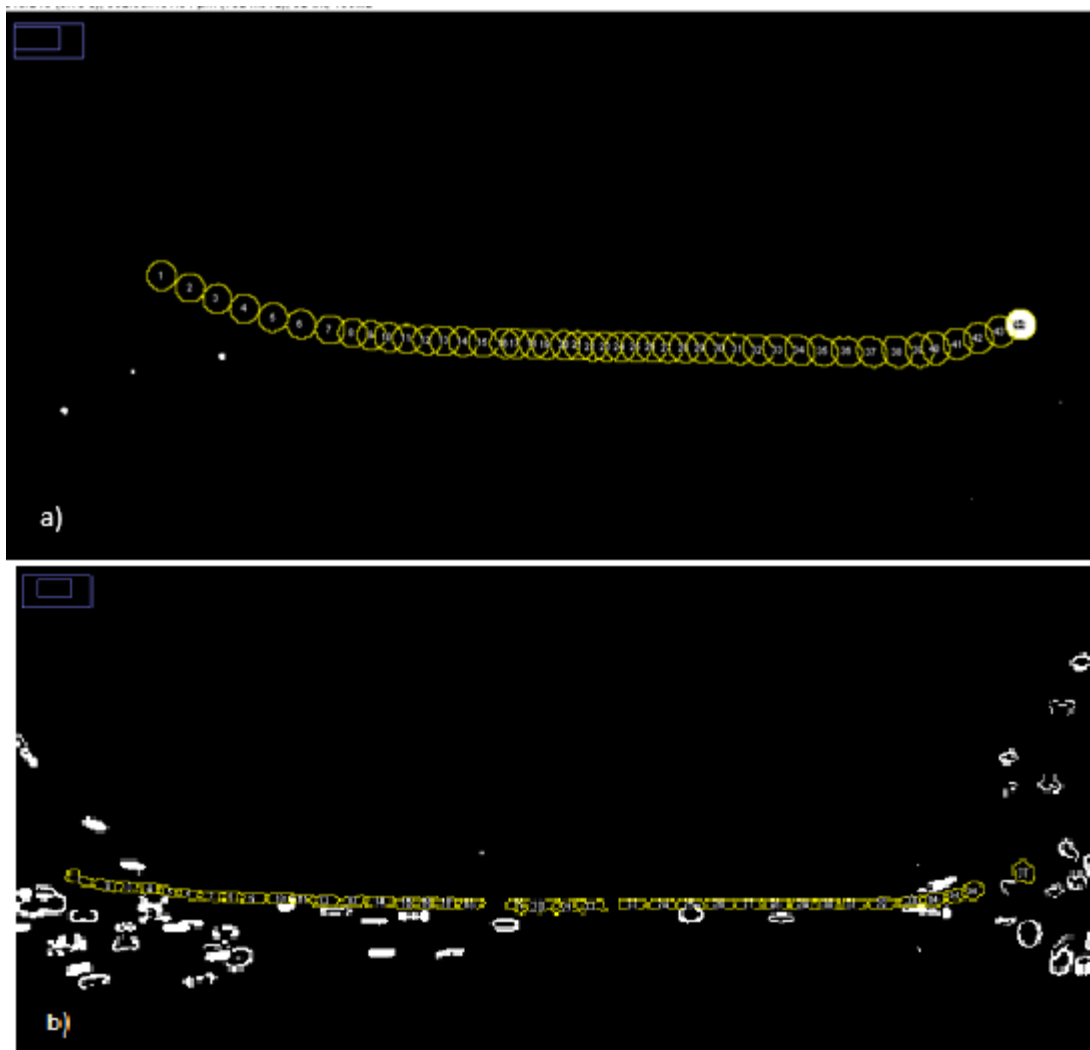


Figura 43. Visualização do trajeto de: a) uma micropartícula, b) um GV.

Através do seguimento das micropartículas e dos GVs foi possível calcular o seu índice de deformação, ao longo do microcanal com contração hiperbólica.

Capítulo 5

Resultados e a sua discussão

Nesta secção são abordados todos os resultados das atividades acima descritas e as suas respectivas análises.

Na secção 5.1, é feita a análise dos dados obtidos com as experiências relativas ao escoamento de fluidos em microcanais. Na secção 5.2 são apresentados os resultados das experiências relativas à produção de micropartículas de PDMS. Na secção 5.3 apresentam -se os dados da deformação dos GVs e das micropartículas.

A análise do escoamento e obtenção dos vários parâmetros foi efetuada com recurso ao *software ImageJ*.

5.1. Experiências relativas ao escoamento de microbolhas em microcanais

Todos os escoamentos das microbolhas realizados são sistemas gás-líquido, em que o gás é injetado através de uma bomba de seringa.

Este subcapítulo engloba os resultados das experiências realizadas com sangue ovino em microcanais com geometria de focagem de fluxo. Utilizou-se nestas experiências a solução de Ar com Dx40 com 2,5% Hct.

Foram vistos e analisados vários vídeos do escoamento dos fluidos em microcanais que permitiram visualizar a formação de bolhas, o seu movimento, a sua forma e o fenómeno da coalescência. Obtiveram-se também, resultados de vários parâmetros do escoamento, tais como: dimensões e índice de deformação das bolhas, distância entre elas, a sua velocidade e a camada livre de células.

Ao longo deste estudo verificou-se que as bolhas individualizadas eram formadas, não na zona de mistura (ver Figura 44 a e b)), mas na zona de contração (Figura 44 c)).

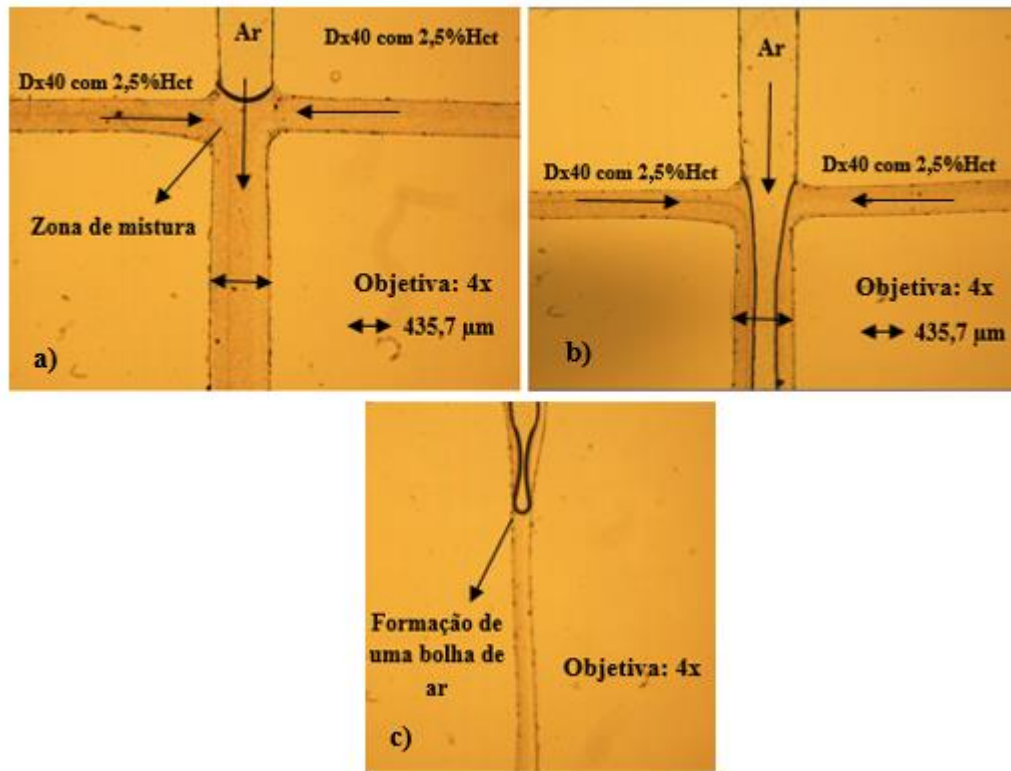


Figura 44. Imagem microscópica (objetiva: 4x) do microcanal com geometria de focagem de fluxo; a) entrada dos fluidos na zona de mistura, b) escoamento dos fluidos no microcanal após a mistura, c) formação das microbolhas na zona de contração do microcanal.

A forma das bolhas começava por ser elíptica alongada na zona de contração, identificada como zona 1 na Figura 45. Quando se aproximavam da zona de expansão do microcanal, identificada como zona 2 na Figura 45, a sua forma passava a circular. Nesta zona a velocidade das bolhas diminuía, porque aumentava a área de escoamento, aproximando-se umas das outras, dando-se início ao fenómeno da coalescência. Quando entravam na zona em que o canal adquiria dimensão igual à anterior à contração (identificada como zona 3 na Figura 45), as bolhas coalesciam, aumentavam de tamanho e a sua forma era elíptica, mas não tão alongada como na zona 1 (ver Figura 46).

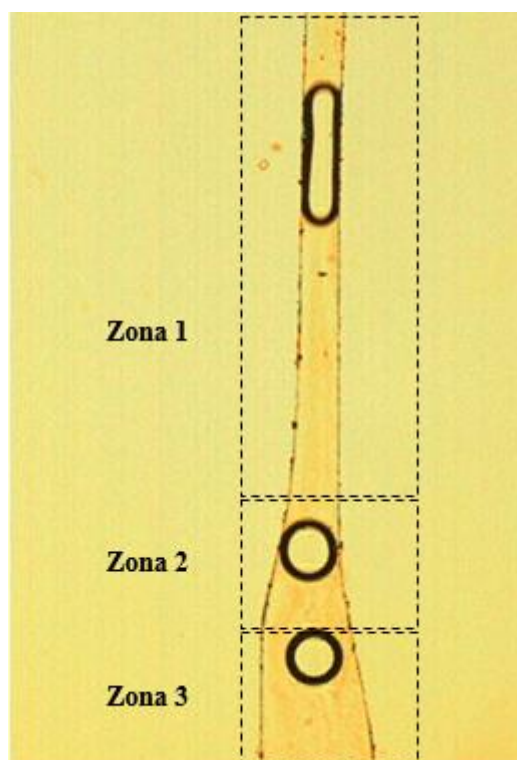


Figura 45.Representação das zonas em estudo ao longo de um microcanal.

O fenómeno da coalescência pode ser melhor visualizado na Figura 46.

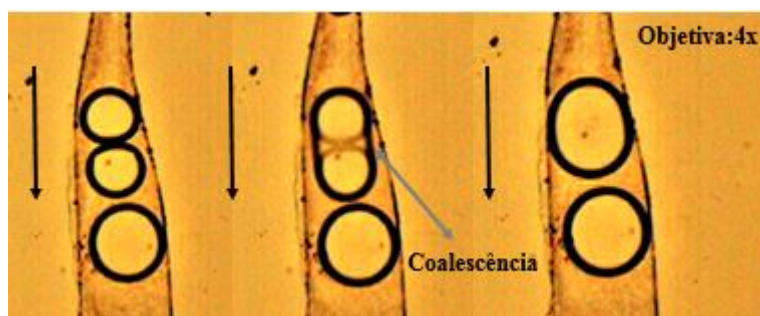


Figura 46.Visualização da coalescência de uma bolha de ar no microcanal 2 com um caudal de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ para o Dex40_2,5%Hct e de 242 $\mu\text{l}/\text{min}$ para o Ar.

Na Figura 47 pode visualizar-se uma bolha na zona 3, com forma elíptica, formada após coalescência.

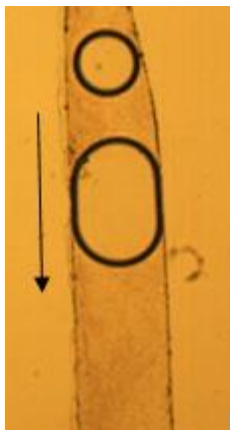


Figura 47. Visualização de bolha elíptica formada após coalescência, na zona 3.

O estudo de escoamentos nestes microcanais permitiu ainda verificar que se formava uma camada livre de células na parte da frente da bolha e na inferior uma região com elevada concentração de células (Figura 48).

Contudo, na zona de contração (zona 1) não é possível visualizar a CLC junto à parede visto que a bolha ocupa toda a secção.

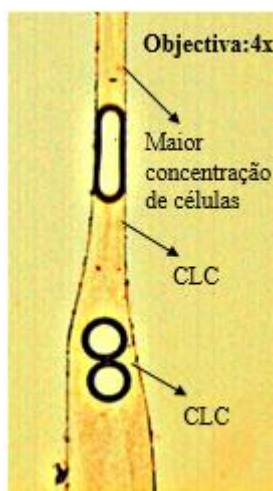


Figura 48. Bolhas de ar e CLC no Microcanal 2 com um caudal de 0,007 ml/min para o Dx40 com 2,5% Hct e de 335 μ l/min para o Ar.

A análise dos parâmetros é importante para a compreensão do que ocorre no nosso sistema cardiovascular na presença de bolhas de ar. Através dos resultados obtidos, poder-se-á contribuir para uma melhor avaliação das embolias gasosas.

Dimensões das bolhas

As dimensões das bolhas ao longo do microcanal vão variando conforme a zona a que se encontrem.

Na Figura 49 está representado o modo como se procedeu à medição da dimensão das bolhas ao longo do microcanal (dimensão linear perpendicular ao escoamento), necessária para a obtenção dos gráficos das Figuras 50, 51 e 52.

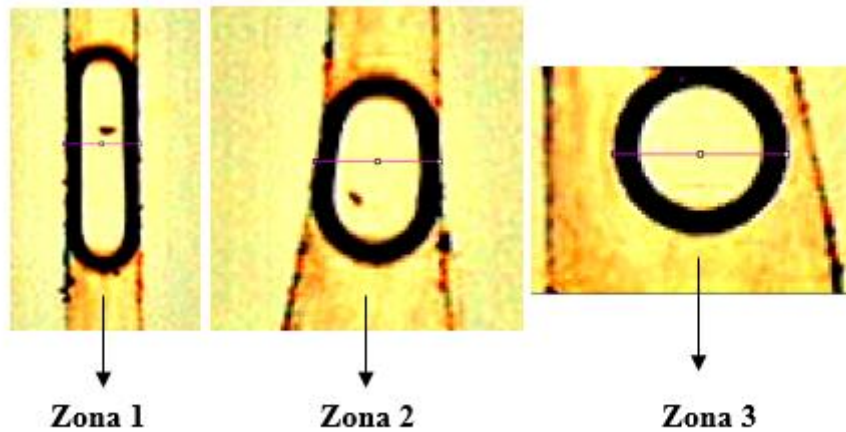


Figura 49. Visualização do processo de medição da dimensão das bolhas ao longo do microcanal.

As Figuras 50, 51 e 52 mostram a variação deste parâmetro com a respetiva zona.

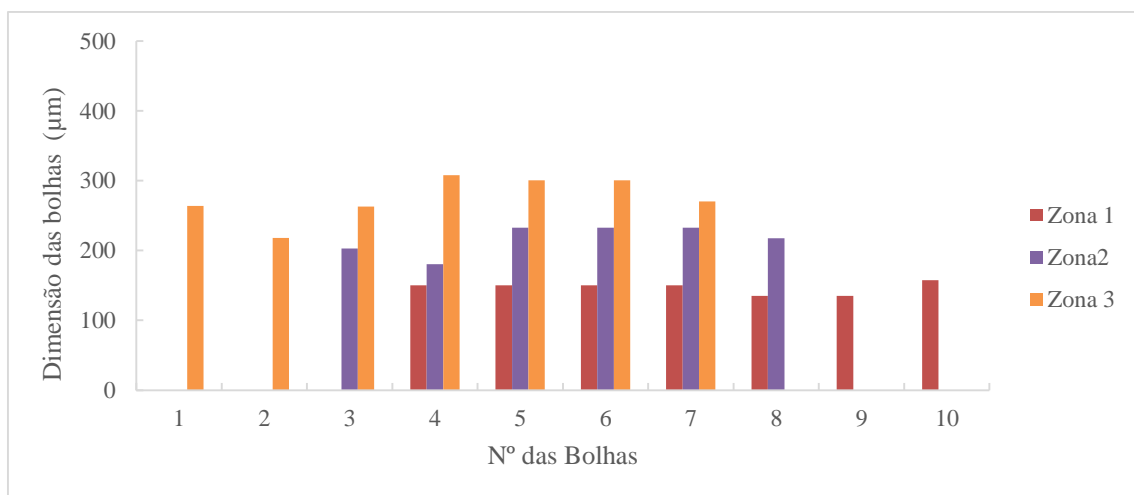


Figura 50. Dimensão de cada bolha, para um caudal de sangue de 0,007 ml/min e de ar de 306 µl/min.

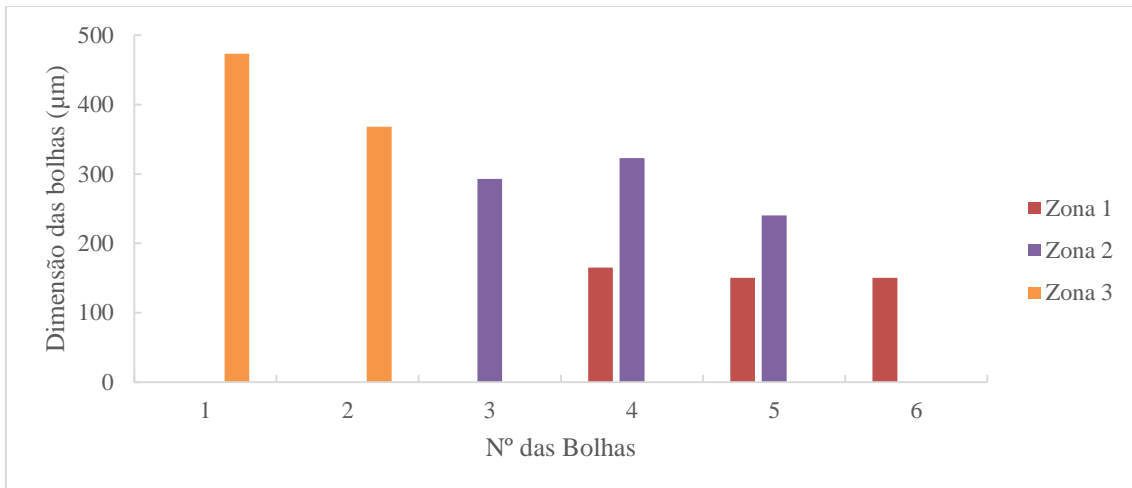


Figura 51. Dimensão de cada bolha, para um caudal de sangue de 0,005 ml/min e de ar de 242µl/min.

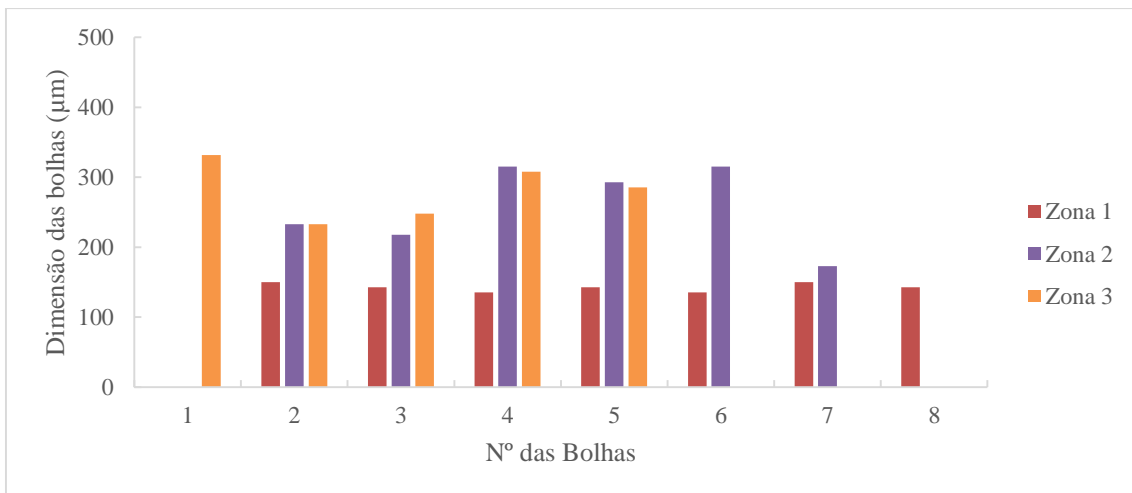


Figura 52. Dimensão de cada bolha, para um caudal de sangue de 0,007 ml/min e de ar de 335µl/min.

Pela análise da Figura 50, Figura 51 e Figura 52, pode-se observar que a dimensão das bolhas é superior na zona 2 e 3, tal como seria de esperar pela análise da Figura 49. Isto seria expectável, visto que nesta zona a área é maior, sendo que a bolha passa de uma contração para uma zona de expansão. A bolha muda da forma alongada para circular.

A menor dimensão das bolhas das bolhas verificou-se na zona de contração, zona 1.

Constata-se também que a dimensão das bolhas é irregular, visto que logo na sua formação o tamanho variava. Isto pode dever-se ao facto de não ser possível garantir um caudal constante de ar bombeado pela bomba de seringa.

Distância entre bolhas

A Figura 53 representa o modo como se procedeu à medição da distância entre as bolhas.

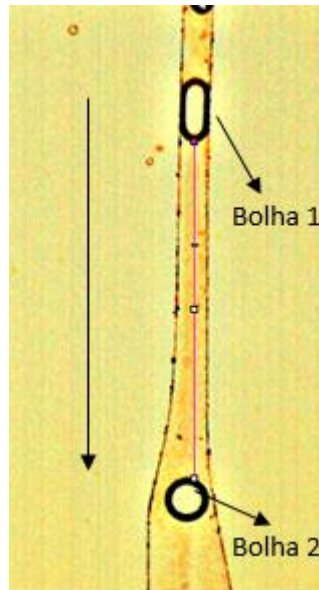


Figura 53. Representação do modo como se procedeu à medição da distância entre duas bolhas.

Na Figura 54 e 55 estão representadas as distâncias entre pares de bolhas, representadas por b1-b2 até b4-b5, em movimento no microcanal num determinado instante, onde existiam bolhas em movimento nas três zonas do microcanal, para vários caudais de sangue e ar. As bolhas estão numeradas conforme a ordem de formação.

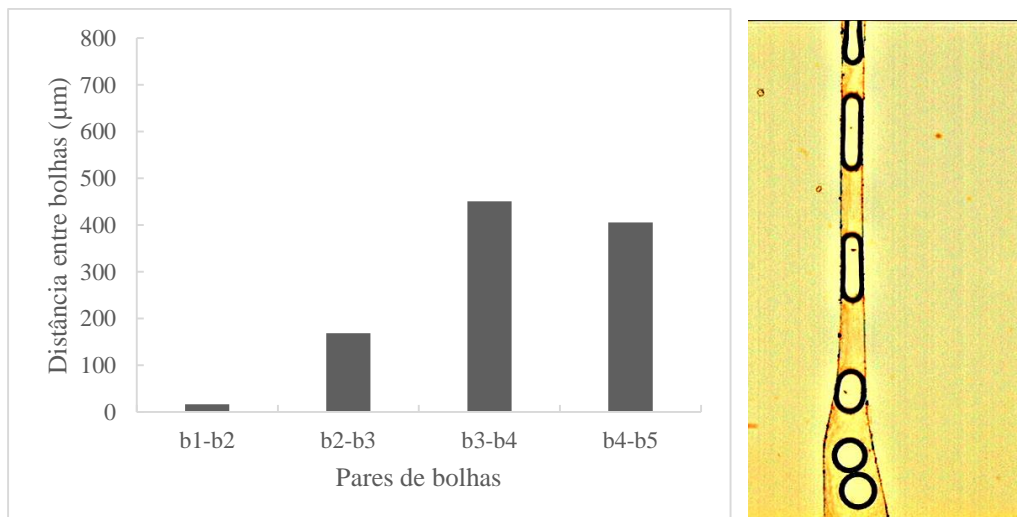


Figura 54. Distância entre bolhas, para um caudal de sangue de 0,007 ml/min e de ar de 306 µl/min.

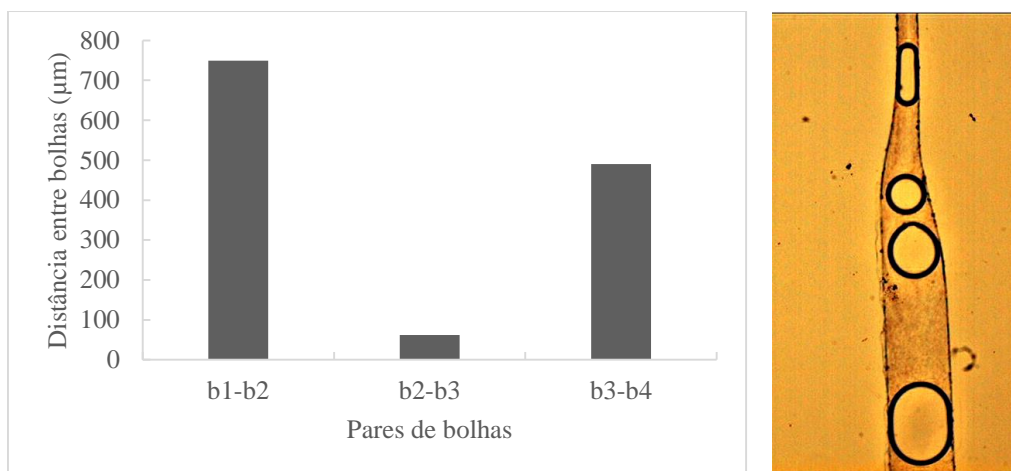


Figura 55. Distância entre bolhas, para um caudal de sangue de 0,005 ml/min e de ar de 242 μl/min.

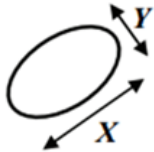
Na análise da Figura 54 e Figura 55 observou-se que as distâncias entre pares de bolhas são superiores na zona 1 (contração), isto porque nesta zona a velocidade é superior à zona 2 e 3 do microcanal. Consta-se também que na zona 2 há uma ligeira diminuição da velocidade, ocorrendo uma maior acumulação de bolhas, sendo que a distância entre os pares de bolhas diminui. Contudo, na Figura 55, verificou-se que os pares de bolhas, b1-b2, apresentam uma maior distância, encontrando-se na zona de expansão, zona 3, isto porque ocorreu a coalescência de bolhas. O aumento do tamanho da bolha leva ao aumento da sua velocidade e, o que leva a um aumento da distância da bolha 3.

Índice de deformação das bolhas

Uma bolha em movimento ao longo de um microcanal pode assumir índices de deformação (ID) diferentes. O cálculo de ID, para posterior análise, é efetuado de acordo com a equação (1).

$$ID = \frac{X - Y}{X + Y} \quad (1)$$

onde o X corresponde ao comprimento maior da bolha e Y ao menor. Quando se verifica um ID próximo de 0, a estrutura da bolha é circular e quando se aproxima de 0,5 apresenta estrutura elíptica alongada (ver Figura 56).



$$ID = \frac{X - Y}{X + Y} \begin{cases} ID = 0 & \text{○} \\ ID = 0,5 & \text{—} \end{cases}$$

Figura 56. Definição de índice de deformação (adaptado de [47]).

Para a análise de todos os resultados recorreu-se ao *software ImageJ* e posteriormente ao Excel. Na Figura 57, 58 e 59 apresentam-se os valores do ID médio das bolhas para as três zonas do microcanal. Estes valores foram obtidos com base na média dos ID obtidos para várias bolhas em movimento em cada zona.

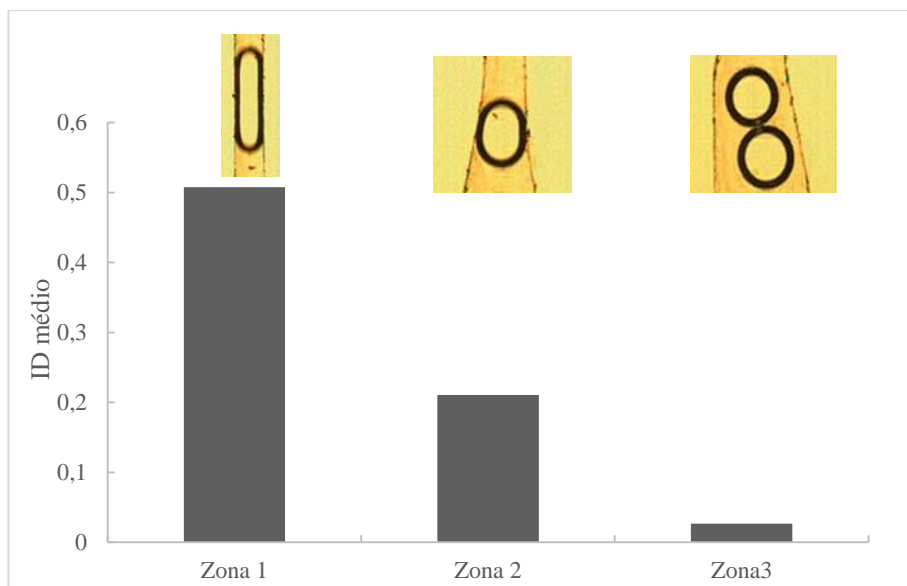


Figura 57. Média do índice de deformação das bolhas, para um caudal de sangue de 0,007 ml/min e de ar de 306 μ l/min.

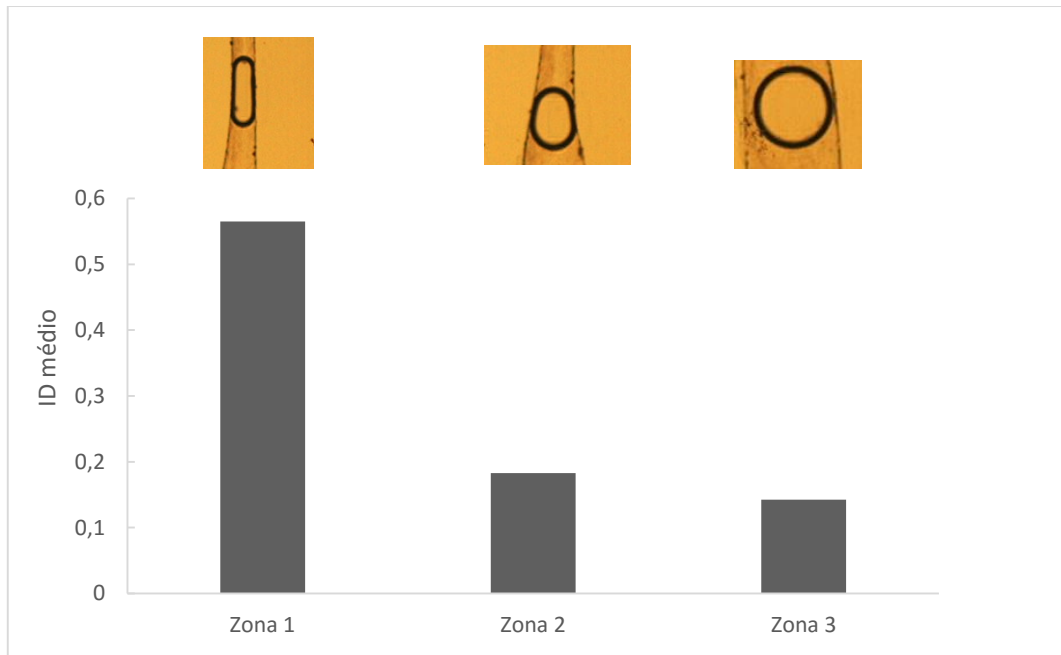


Figura 58.Média do índice de deformação das bolhas, para um caudal de sangue de 0,005 ml/min e de ar de 242 µl/min.

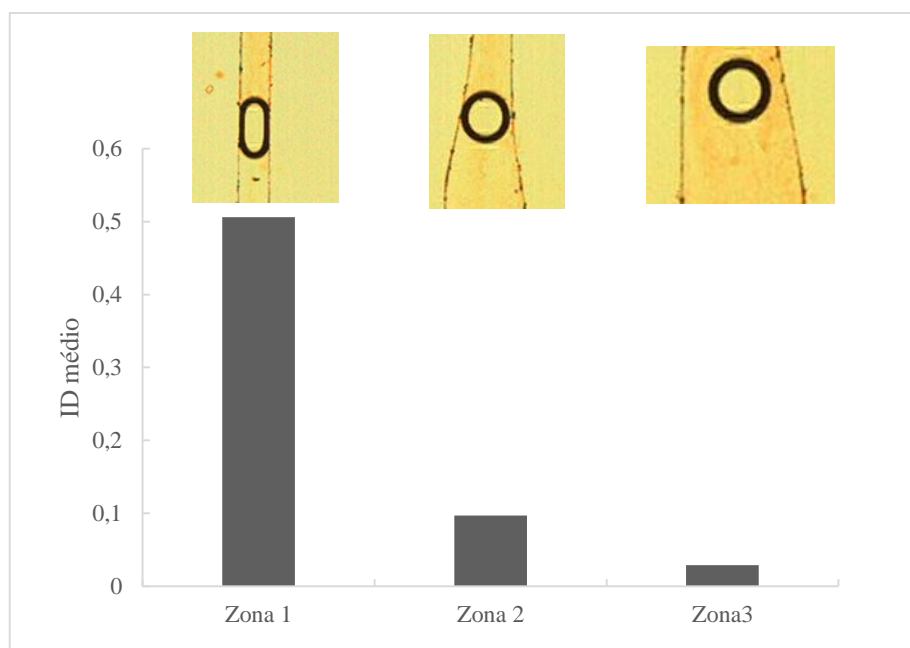


Figura 59.Média do índice de deformação das bolhas, para um caudal de sangue de 0,007 ml/min e de ar de 335 µl/min.

Pela análise das Figuras 57, Figura 58 e Figura 59 pode constatar-se que o índice de deformação médio é superior na zona 1 (zona de contração), isto devido à forma que a bolha possui, elíptica alongada.

Na zona 2, verificou-se uma redução do valor do ID, isto porque, é a zona de transição. Nesta zona as bolhas têm forma intermédia entre elíptica alongada e circular.

Verificou-se, como esperado, que o ID diminui ao longo do microcanal, atingindo o valor mínimo na zona de expansão (zona 3) onde a seção reta de escoamento é maior e as bolhas assumem forma circular. Quando a bolha apresenta forma circular o seu ID está próximo do valor zero.

Velocidade das bolhas

A Figura 60 representa a forma como se procedeu à análise da velocidade de cada bolha ao longo do microcanal.

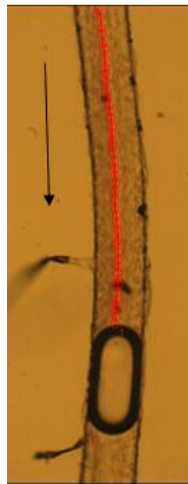


Figura 60. Representação do modo como se procedeu à medição da velocidade de cada bolha.

Nas Figuras 61 e 62 apresentam-se os gráficos relativos à velocidade média ao longo do microcanal, respetivamente, para várias bolhas numeradas de 1 a 10, para as três zonas. O caudal de sangue foi de 0,007 ml/min e o de ar foi de 306 μ l/min.

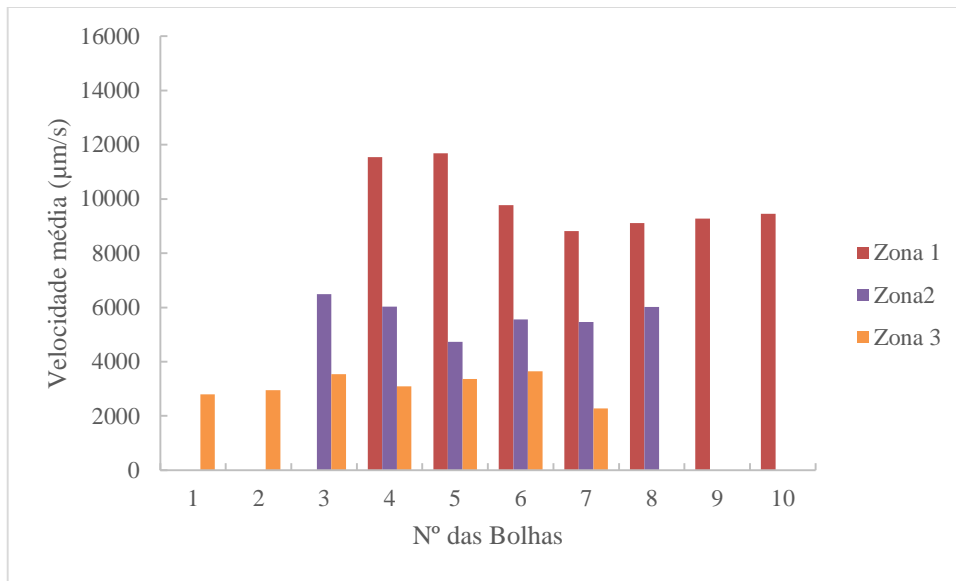


Figura 61. Velocidade média de cada bolha ao longo do microcanal, para um caudal de sangue de 0,007 ml/min e de ar de 306 µl/min.

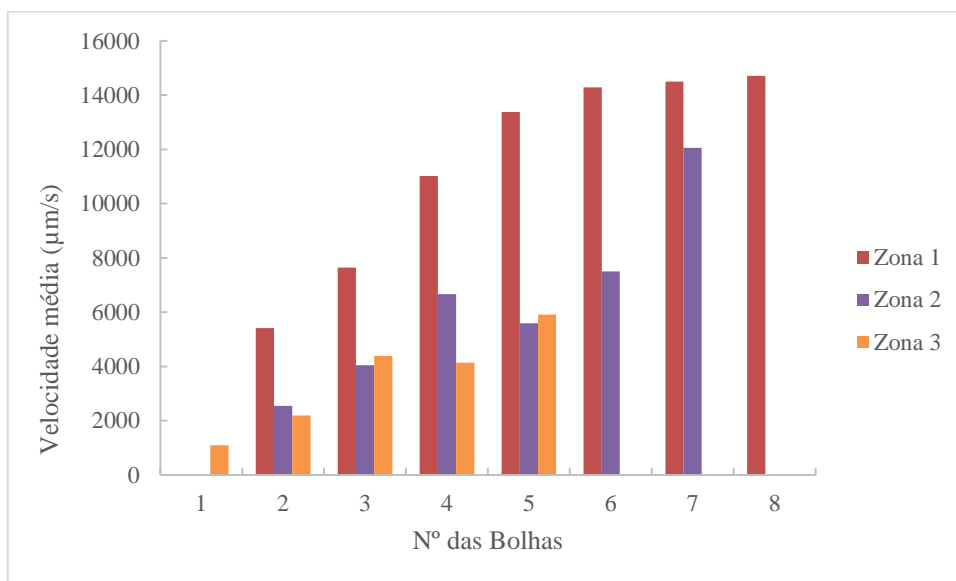


Figura 62. Velocidade média de cada bolha ao longo do microcanal, para um caudal de sangue de 0,007 ml/min e de ar de 335 µl/min.

Pela análise das Figuras 61 e 62 verifica-se que as velocidades mais elevadas ocorrem na zona 1, como esperado, visto que as bolhas se encontram na zona de contração.

Verifica-se, por outro lado, que na zona 3 as velocidades são significativamente inferiores, pois com o aumento da área da seção do microcanal há uma diminuição da velocidade das bolhas.

Camada livre de células (CLC)

Na Figura 63 é possível visualizar a CLC formada no centro do microcanal e a formada junto às paredes, na zona 1 do microcanal, tendo-se utilizado uma objetiva de resolução 10x.

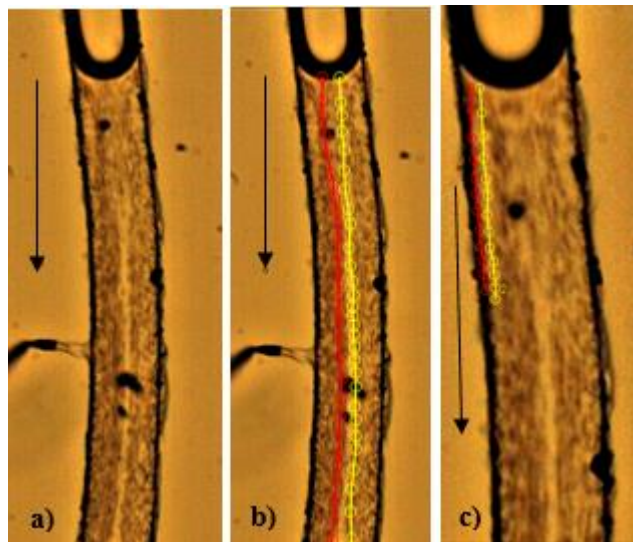


Figura 63. Visualização microscópica das CLC e suas trajetórias ao longo do microcanal, numa solução de Ar com Dx40 com 2,5% Hct (Objetiva 10x). a) Imagem original, b) trajetória da CLC no centro e c) trajetória da CLC nas paredes (zoom 200%).

Na Figura 63 a) e b) pode-se visualizar a CLC formada no centro do microcanal e a sua respetiva análise através do *software Image J*, respetivamente. Na Figura 63 c) está representada mais detalhadamente (zoom 200%) a espessura da CLC junto à parede do microcanal e sua trajetória.

Através da análise da CLC, do centro e da parede do microcanal, da Figura 63, obtive-se os valores da sua espessura média, representado no gráfico da Figuras 64.

Na Figura 64 está representada a espessura da CLC na zona 1 do microcanal no centro e na parede.

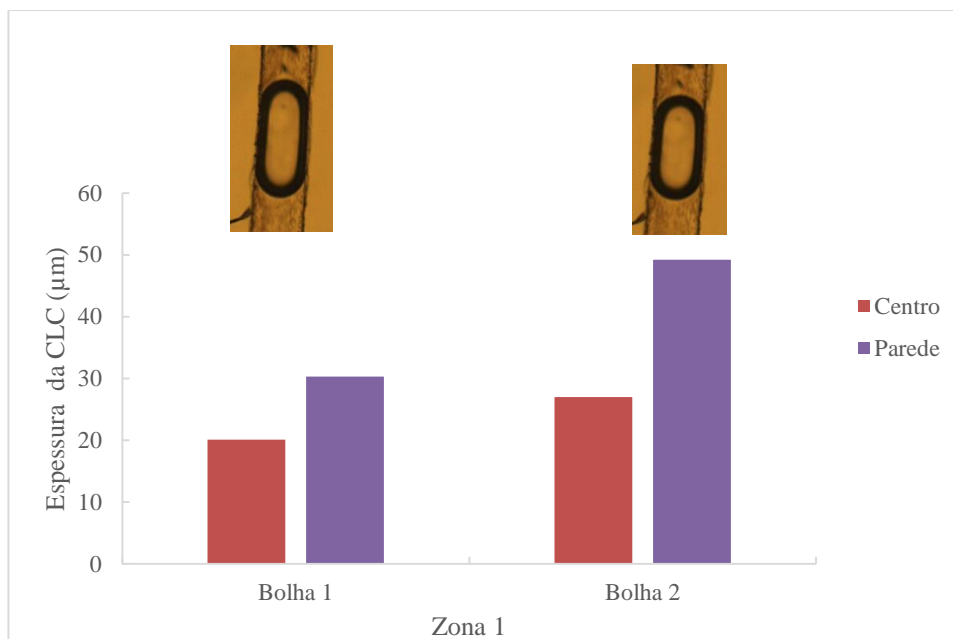


Figura 64. Representação gráfica da espessura da CLC ao longo do microcanal (zona 1), para um caudal de sangue de 0,005 ml/min e de ar de 306 µl/min.

A Figura 64 mostra que, na zona 1 do microcanal, a espessura da CLC junto à parede, em ambas as bolhas, é superior à existente no centro. Isto deve-se ao facto de neste escoamento existir no centro do microcanal a confluência de dois fluidos, e nas paredes as forças de corte são máximas, velocidade nula, e como consequência os GVs têm tendência para migrar para o centro [9].

A diferença da CLC entre as duas bolhas presentes na Figura 64, poder-se-á dever ao facto de a dimensão das bolhas assumem valores diferentes no processo da sua formação na zona 1. Será assim possível estabelecer uma correlação entre o tamanho das bolhas e a formação da CLC.

Na obtenção das Figuras 65 a 66 utilizou-se uma resolução inferior (objetiva 4x), não sendo por isso possível visualizar a CLC junto das paredes.

Nas Figuras 65 e 66 está representada a espessura média da CLC no centro do microcanal para as várias zonas do escoamento, quando o caudal de sangue era de 0,007 ml/min e de ar era de 306 e 335 µl/min, respetivamente.

A formação da CLC no centro do microcanal deve-se ao facto de, quando se forma uma bolha que passa a movimentar-se, a CLC existente junto às paredes ser obrigada a deslocar-se para o centro, dado que as bolhas ocupam a totalidade da seção reta do microcanal.

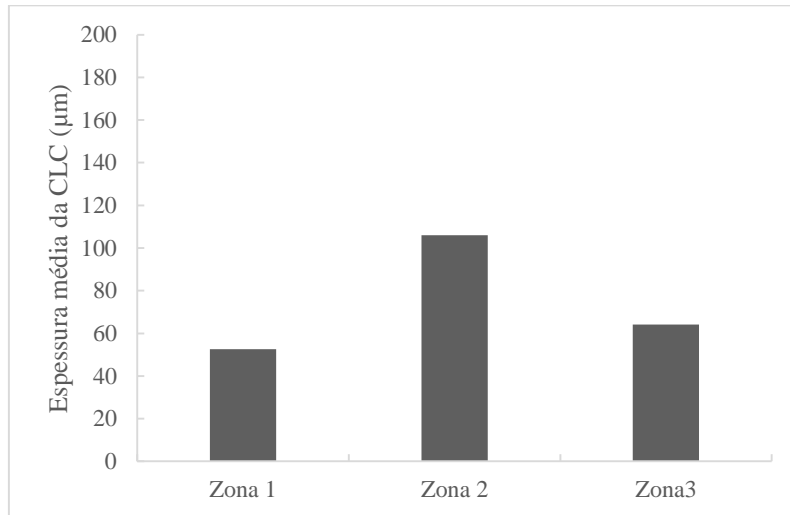


Figura 65. Representação gráfica da espessura média das CLC ao longo do microcanal, para um caudal de sangue de 0,007 ml/min e de ar de 306 µl/min.

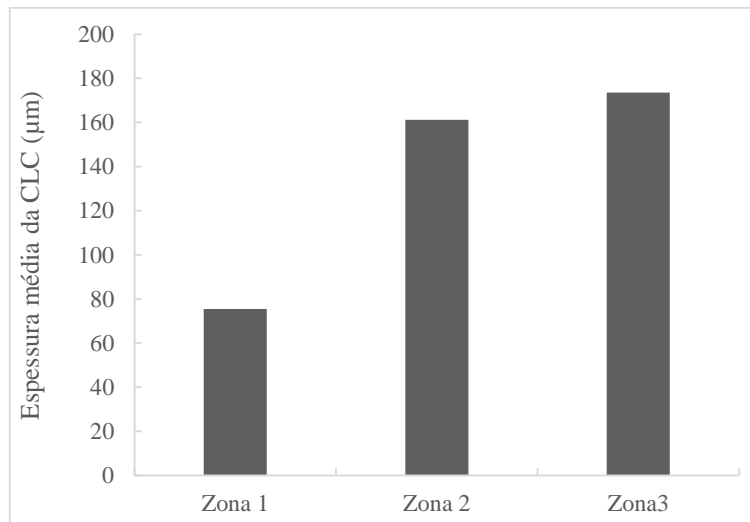


Figura 66. Representação gráfica da espessura média das CLC ao longo do microcanal, com um caudal de sangue de 0,007 ml/min e de ar de 335 µl/min.

Das Figura 65 e 66 pode inferir-se que, quando as bolhas estão espaçadas umas das outras, o volume de plasma acumulado na zona central fica contido numa camada de pequena espessura, sendo portanto a espessura da CLC menor. Na zona 2, com menores

velocidades das bolhas, estas ficam mais próximas umas das outras, pelo que mantendo-se o volume do plasma, a espessura da CLC é maior. Nesta zona de expansão, onde se dá a coalescência de bolhas que adquirem maior tamanho, a camada de plasma entre elas é empurrada para a frente da bolha resultante da coalescência, pelo que na zona 3 pode ocorrer uma CLC com maior espessura.

A forma e o tamanho das bolhas nas três zonas estudadas terá, assim, influência na espessura da CLC.

5.2. Experiências relativas à produção de micropartículas de PDMS

Na técnica de focagem de fluxo, o tamanho das microgotas produzidas é controlado com precisão, deslocando a ponta da agulha ao longo do capilar sem variar o caudal. Na Figura 67 b) pode-se observar o diâmetro (D_d) das microgotas produzidas numa solução de glicerina, surfactante (Brij 30) e PDMS em função da posição da ponta da agulha no capilar.

Na Figura 67 a), pode-se visualizar a formação de microgotas, em que $z = 0$ representa a posição inicial da agulha ($x = 0$). A posição da agulha foi deslocada na direção $z > 0$, com incremento de $23,4 \mu\text{m}$, atingindo um máximo de $285,1 \mu\text{m}$. Na posição mínima da ponta da agulha, $z = 0$ e $z < 0$ não é possível visualizar a formação de microgotas pois a formação de jato não ocorre devido ao facto das correntes externas serem mais fortes dentro do capilar. Com o deslocamento da ponta da agulha de incremento em incremento em $z > 0$, vai-se observando um aumento do diâmetro, D_d , das microgotas atingindo o diâmetro maior na posição de $Z = 285,1 \mu\text{m}$. Na Figura 67 b) é possível observar-se o que está descrito anteriormente, ou seja, com o aumento da distância da ponta da agulha da posição $z = 0$ observa-se um aumento do valor de D_d .

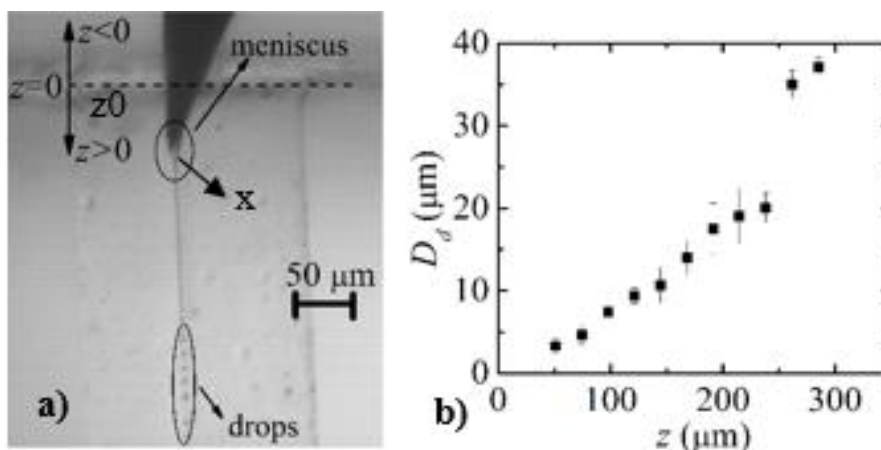


Figura 67. Diâmetro (D_d) das microgotas produzidas numa solução de glicerina, surfactante e PDMS, para o caudal de glicerina = $2 \times 10^3 \mu\text{l/h}$ e de PDMS = $10 \mu\text{l/h}$.

Durante a sua formação as microgotas inicialmente possuem forma alongada, adquirindo a geometria esférica durante a queda pelo capilar, devido ao efeito de tensão superficial.

O caudal real de PDMS não coincidia com o valor estabelecido na bomba de seringa, dada à elevada viscosidade do fluido. O valor do caudal real de PDMS foi obtido através do tratamento de um vídeo captado por uma câmara de alta velocidade. No vídeo efetuou-se a análise do diâmetro das gotas para se poder calcular o seu volume e posteriormente o caudal real de PDMS injetado. O valor deste caudal, Q_{PDMS} , foi obtido através da seguinte equação:

$$\frac{N_G}{t} \times V_G = Q_{PDMS} \quad (2)$$

onde N_G representa o número de gotas formadas, t é o tempo, V_G é o volume médio das gotas.

Na Figura 68 está representado um histograma das microgotas, percentagem em função do diâmetro, construído a partir da análise de um vídeo captado com uma câmara de alta velocidade, para um caudal de glicerina de $2 \times 10^3 \mu\text{l/h}$ e um caudal de PDMS de $10 \mu\text{l/h}$. Pode-se verificar que existem dois conjuntos de microgotas, uma vez que não se pode desprezar as microgotas satélite (conjunto cinza escuro).

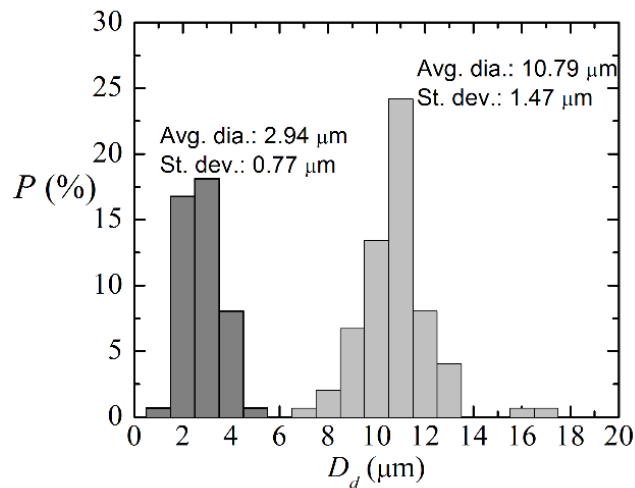


Figura 68. Histograma da distribuição do tamanho das microgotas de PDMS, na sua produção.

As microgotas satélite estão diretamente relacionadas com a dinâmica da rutura do *pescoço* (entre duas microgotas principais), que depende essencialmente do caudal da fase contínua e a proporção das propriedades dos fluidos envolvidos [48], [49].

De referir que a análise apresentada na Figura 68 foi obtida aquando da formação das gotas ao longo do capilar, ou seja, antes de se proceder à sua cura e pode-se verificar que foi possível a produção de microgotas com diâmetros entre os 10 e 11 μm .

Contudo, após a cura das microgotas em glicerina, verificou-se que algumas micropartículas não estavam efetivamente curadas, às quais designamos partículas em estado gel (Figura 69). Isto poderá dever-se ao facto das 24 horas de cura das micropartículas de PDMS à temperatura de 70°C numa solução de glicerina a 100 %, não ser suficiente.

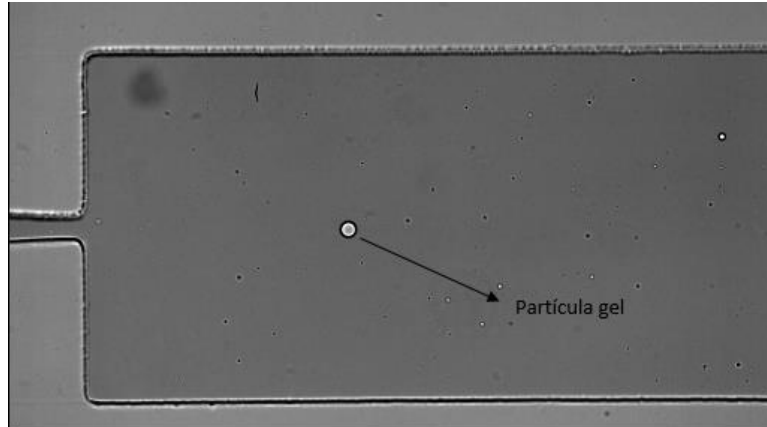


Figura 69. Visualização de uma partícula gel no microcanal com contração hiperbólica.

Ao se verificar a presença de partículas gel foram analisadas, ao longo do tempo, todas as amostras recolhidas e verificou-se que as micropartículas sofreram alterações no seu tamanho. Na Figura 70 está representado um histograma das micropartículas após alguns dias da cura.

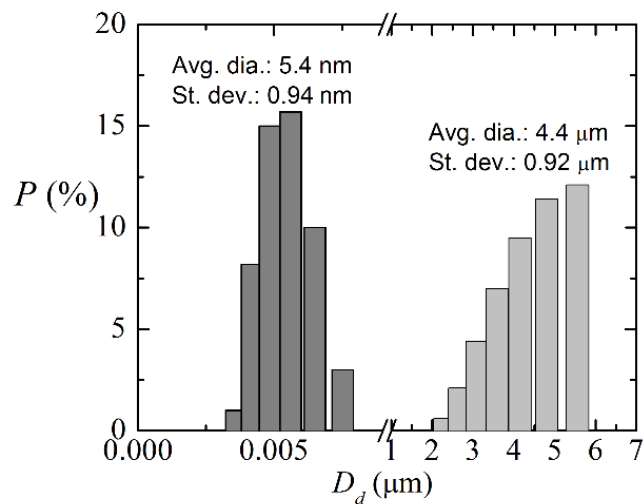


Figura 70. Histograma da distribuição do tamanho das micropartículas alguns dias após a sua cura.

Na Figura 70 pode visualizar-se a alteração do diâmetro das micropartículas de PDMS, estas que antes apresentavam D_d médio de 10 a 11 μm passam agora a ter

diâmetros médios de 4,4 μm , observando-se também um aumento da concentração de partículas satélite.

Esta diminuição da concentração e do diâmetro das partículas de 10 μm e consequente aumento da concentração das partículas gel pode estar relacionado não só com o déficit de tempo de cura mas também no fato de ser usado um surfactante podendo levar à coalescência das partículas após um período de tempo.

A fim de evitar este fenómeno, realizaram-se várias curas para evitar que as micropartículas desaparecessem, pois um dos objetivos deste trabalho seria isolar as micropartículas da glicerina, quer por centrifugação ou por evaporação do meio envolvente, para posteriormente inseri-las num fluido análogo ao sangue, para a simulação dos glóbulos vermelhos. Contudo, verificou-se que a concentração de micropartículas era inferior a 0,5% não sendo possível a visualização da CLC nem o estudo da reologia destas.

5.3. Deformação dos GVs e das micropartículas

Nesta secção é apresentado o estudo da deformação das micropartículas de PDMS, num microcanal com contração hiperbólica, como já referido anteriormente.

Para a análise da deformação dividiu-se o microcanal em duas zonas, a zona A, onde se encontra a contração, e a zona B, local onde ocorre a recuperação dos GVs e micropartículas.

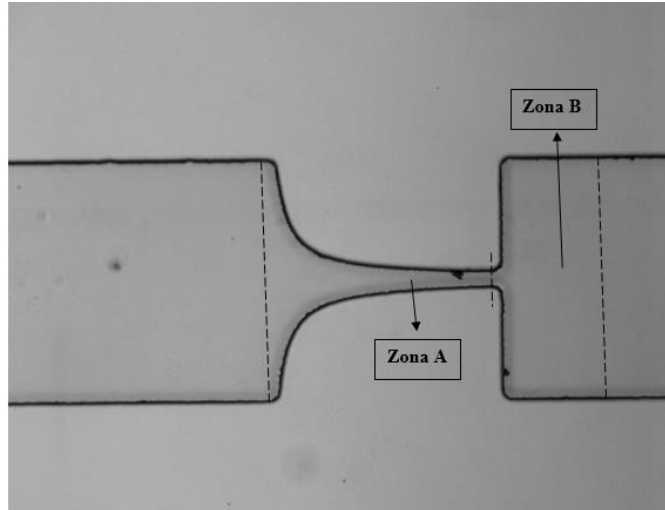


Figura 71. Visualização do microcanal com contração hiperbólica e as respetivas zonas de estudo.

Na análise da deformação das micropartículas, verificou-se que existia uma ligeira deformação, o que nos leva a um grande passo, visto que até agora os escoamentos efetuados com partículas de outros polímeros apresentavam-se como corpos rígidos [9].

Na Figura 72, está representada a comparação do ID médio das micropartículas de PDMS de diâmetro médio de 11,8 μm com o ID dos glóbulos vermelhos, num microcanal de contração hiperbólica referido na secção 4.1.2.

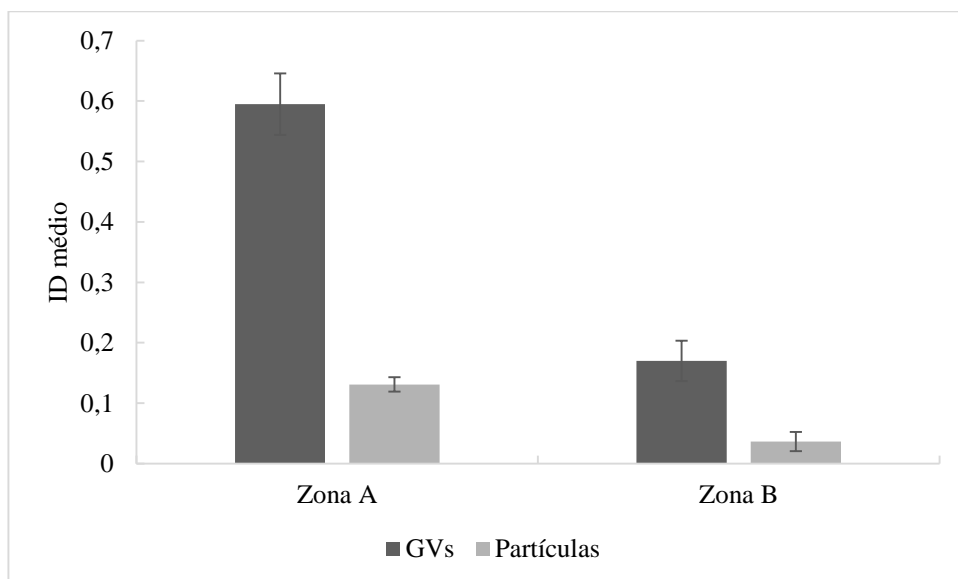


Figura 72. ID médio dos GVs e das micropartículas com o seu respetivo desvio padrão a 95%.

Pela análise do gráfico da Figura 72, verificou-se que o ID médio foi superior na zona A, quer nas micropartículas quer nos GVs. Foi ainda possível verificar também que os GVs apresentam um ID médio superior relativamente às micropartículas, o que seria espectável, visto que os GVs são células com elevada deformabilidade, que quando expostos a uma contração alteram a sua forma temporariamente.

Uma análise mais rigorosa do ID de ambos os componentes em estudo teria que ter em conta os fluidos em que estão suspensos os GVs e as micropartículas. Contudo, isso não foi possível, tornando o processo de comparação dos ID mais complicado.

Capítulo 6

Conclusões e trabalhos futuros

Este trabalho teve como objetivos principais estudar a formação e o transporte de microbolhas capazes de gerar embolias gasosas e produzir micropartículas de PDMS através da técnica de focagem de fluxo.

6.1. Conclusões

Relativamente às embolias gasosas as principais conclusões retiradas deste estudo são as seguintes:

- A xurografia utilizada na fabricação dos microcanais para os estudos efetuados sobre embolias gasosas revelou-se uma boa técnica para a visualização e formação de bolhas num dispositivo de focagem de fluxo.
- Esta técnica apresenta inúmeras vantagens em relação às outras técnicas de fabricação, tais como o baixo custo dos equipamentos e fácil manuseamento.
- Efetuaram-se escoamentos em simultâneo, em modo cocorrente de Dx40 com 2,5%Hct e ar, com os caudais a variar entre 0,005 e 0,007 ml/min e entre 242 a 335µl/min, respetivamente. Foi possível visualizar a formação de microbolhas na zona de contração do microcanal. Analisaram-se vários parâmetros: dimensão das bolhas, distância entre pares de bolhas, índice de deformação, velocidade das bolhas e espessura da camada livre de células em três zonas do microcanal, zona de contração (zona1), zona intermédia (zona2) e zona de expansão (zona3).
- A dimensão das bolhas formadas foi superior nas zonas 2 e 3, devido à área de secção ser maior, relativamente à zona 1. Foi ainda possível visualizar que o tamanho das bolhas era irregular, não se verificando a formação de bolhas com o mesmo tamanho. Isto pode dever-se ao facto de não ter sido possível garantir um caudal constante de ar bombeado pela bomba de seringa
- Relativamente à distância entre pares de bolhas verificou-se que esta era maior

na zona 1, devido à velocidade ser superior, relativamente às zonas 2 e 3. Nestas duas zonas, como a velocidade diminuía, a distância entre os pares de bolhas também diminuía.

- Em casos particulares, quando se dava a coalescência de bolhas, a velocidade aumentava, e conseqüentemente a distância entre pares de bolhas também aumentava.
- O índice de deformação (ID) era mais elevado na zona de contração do microcanal devido à forma que as bolhas possuíam, elíptica alongada. Quando passavam da zona de contração para a zona de expansão, as bolhas tinham tendência em se transformarem numa geometria circular, e conseqüentemente o seu ID aproximava-se de zero.
- As velocidades observadas das bolhas eram mais elevadas na zona 1. Na zona 3 as bolhas apresentavam velocidades significativamente menores devido ao aumento da área da secção transversal do escoamento.
- Relativamente ao tempo médio de passagem de cada bolha ao longo do microcanal, os menores tempos de passagem verificaram-se na zona 1 e os maiores ocorreram na zona 3. Estes dados estão em concordância com os obtidos para as velocidades nas mesmas zonas. Na zona 1, correspondente à contração do microcanal, as velocidades são maiores e os tempos de passagem menores e na zona 3, correspondente à expansão (maior dimensão do microcanal), as velocidades são menores e os tempos maiores.
- Nos escoamentos realizados foi possível observar a formação da CLC no centro e junto à parede do microcanal.
- A espessura da CLC junto à parede é superior à existente no centro do microcanal. Isto deve-se ao facto de nos escoamentos efetuados existir confluência dos dois fluidos no centro do microcanal, e nas paredes as forças de corte serem máximas, sendo a velocidade nula. Como conseqüência os GVs têm tendência para migrar para o centro.
- A diferença da espessura da CLC entre as duas bolhas deveu-se ao facto da sua dimensão assumir valores diferentes no processo da sua formação, sendo possível estabelecer uma relação entre o tamanho das bolhas e a formação da CLC.

- Quando as bolhas estavam espaçadas umas das outras, o volume de plasma acumulado na zona central ficava contido numa camada de pequeno volume, sendo portanto a espessura da CLC menor. Na zona 2, com menores velocidades das bolhas, estas ficavam mais próximas umas das outras, pelo que mantendo-se o volume do plasma, a espessura da CLC era maior. Nesta zona de expansão, onde se dava a coalescência de bolhas que adquiram maior tamanho, a camada de plasma entre elas era empurrada para a frente da bolha resultante da coalescência, pelo que na zona 3 podia ocorrer uma CLC com maior espessura.
- A forma e o tamanho das bolhas nas três zonas estudadas terá, assim, influência na espessura da CLC.

Relativamente ao estudo efetuado sobre a técnica de focagem de fluxo na produção de micropartículas de PDMS as principais conclusões são as seguintes:

- Esta técnica revelou ser muito promissora na produção de micropartículas de PDMS, pois no estudo efetuado apresentou uma elevada produção. Apresentou, ainda, benefícios na obtenção da estabilidade dos fluidos em estudo, permitindo a quebra do jato em gotas.
- O uso da agulha hipodérmica forneceu uma grande estabilidade ao jato produzido, sendo possível obter as microgotas de PDMS.
- Na produção das microgotas de PDMS verificou-se que ao mover a agulha ao longo do capilar na direção $z > 0$, que diâmetro, D_d , se alterava até alcançar a posição mínima da agulha, $z=0$ e $z < 0$, onde não é possível visualizar a formação de microgotas, não se formando o jato devido ao facto das correntes externas serem mais fortes dentro do capilar.
- Com o deslocamento da ponta da agulha de incremento em incremento em $z > 0$, observou-se um aumento do diâmetro, D_d , das microgotas.
- Com a técnica de focagem de fluxo, obtiveram-se microgotas antes de se proceder à sua cura, com diâmetros entre os 10 e 11 μm . A produção de microgotas com estas dimensões não tinha ainda sido possível.
- Após o processo de cura das microgotas, produziram-se micropartículas de

reduzidas dimensões com um diâmetro médio de 4,4 μm .

Relativamente ao estudo efetuado sobre a deformação dos GVs e das micropartículas de PDMS as principais conclusões são as seguintes:

- Na análise da deformação das micropartículas, verificou-se que existia uma ligeira deformação, aspeto muito relevante, visto que até agora nos escoamentos efetuados com partículas de outros polímeros apresentavam-se como corpos rígidos.
- Verificou-se que o ID médio, quer das micropartículas quer dos GVs, foi superior na zona do microcanal onde existia uma contração hiperbólica. No entanto, o ID médio dos GVs foi superior ao das micropartículas de PDMS. Este facto era de esperar, visto que os GVs são células com uma elevada deformabilidade.

Como conclusão final, refira-se que a geometria de focagem de fluxo de microcanais revelou-se, mais uma vez, adequada para a produção de microbolhas. Esta produção é relevante dada a importância que as microbolhas têm no fenómeno das embolias gasosas.

A produção de microgotas e micropartículas, pela técnica de focagem de fluxo, revelou-se bastante promissora, dado que se conseguiram obter microgotas e micropartículas de PDMS com diâmetros próximos dos GVs, o que até à data ainda não tinha sido conseguido. As micropartículas são importantes por poderem substituir os GVs em fluidos análogos ao sangue. A utilização destes fluidos é cada vez mais importante nos estudos *in vitro*, porque permite ultrapassar questões de natureza ética e de segurança.

6.2. Trabalhos futuros

Como trabalhos futuros seria interessante o uso dos microcanais que se encontram no anexo 1, para posterior análise do efeito das embolias gasosas em microcanais fabricados, pela técnica litografia suave.

Outra proposta para trabalhos futuros consiste na realização de mais experiências com escoamentos bifásicos com formação de microgotas, de modo a obter mais informações sobre a sua formação e velocidade, para estabelecer as equações adequadas ao seu cálculo.

Seria também interessante, produzir as micropartículas de PDMS pela técnica focagem de fluxo utilizando fluidos diferentes, como por exemplo, água e surfactante SDS. Isto poderia facilitar o manuseamento das micropartículas após a cura, tornando possível a introdução das micropartículas num fluido análogo ao sangue e o estudo da sua reologia.

Referências Bibliográficas

- [1] Qin D., Xia Y., Rogers J., Jackman R., MeiZhao X., Whitesides G., “Microfabrication, Microstructures and Microsystems”, em *Microsystem Technology in Chemistry and Life Science*, Cambridge, Springer Berlin Heidelberg, 1998, p.1-20.
- [2] Voldman J., Gray M., Schmidt M., “Microfabrication in Biology and Medicine”, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 1999. **1**: p. 401-425.
- [3] Pinto E., Pinho D., Bento D., Correia T., Garcia V., Dias R., Miranda J., Lima R., “Fabricação de Microcanais Utilizando o Método de Xurografia: Visualização da Camada Livre de Células”, em *5º Congresso de Biomecânica*, Espinho, 2013.
- [4] Bartholomeusz D.,Boutté R., Andrade J., “Xurography: Rapid Prototyping of Microstructures Using a Cutting Plotter”, *Journal of Microelectromechanical Systems*,vol.14, 2005.
- [5] Pinto, E., Taboada, B., Faustino, V., Cidre, D., Rodrigues, R., Miranda, J., Garcia, V., Dias, R. e Lima, R., “Blood flow in microchannels manufactured by a low cost technique: xurography, Prespectives in Fundamental and Applied Rheology”, 2013.
- [6] Rodrigues, R. O., Faustino, V., Pinho, D. Pinto, E., Cidre, D., Yaginuma, T., Taboada, B., Bento, D. e Lima, R., “Separation and deformation of red blood cells in PDMS microchannels, Prespectives in Fundamental and Applied Rheology”, 2013.
- [7] Sousa L., “Estudo de Embolias Gasosas em Microcanais”.Novembro 2013, Dissertação, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.
- [8] Pinto E., Faustino V., Rodrigues R., Pinho D., Garcia V., Miranda J., Lima R.,“A Rapid and Low-Cost Nonlithographic Method to Fabricate Biomedical Microdevices for Blood Flow Analysis”, *Micromachines*, vol. 6, nº Xurography, pp. 121-135, 2015.
- [9] Baroud, C.N., F. Gallaire, and R. Dangla, Dynamics of microfluidic droplets. *Lab on a Chip*, 2010. 10 (16): p. 2032-2045.

- [10] Hong, Y.P., Wang, F.J., 2007. Flow rate effect on droplet control in a co-flowing microfluidic device. *Microfluidics and Nanofluidics* 3, pp.341–346.
- [11] Hua, J., Stene, J.F., Lin, P., 2008. Numerical simulation of 3D bubbles rising in viscous liquids using a front tracking method. *Journal of Computational Physics* 227, pp. 3358–3382.
- [12] Pinto E., “Estudo experimental de escoamentos fisiológicos em microcanais fabricados por Xurografia”. Dezembro 2012, Dissertação, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.
- [13] Santos G., “Fabricação de Dispositivos Microfluídicos por Fotolitografia e Projeto de Fotoexpositora de Luz Pontual”, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.
- [14] Calejo J., Yagiuma T., Rosales F., Lima R., Deaño L., “Particulate-viscoelastic blood analogue reproducing the erythrocytes cell free layer in a microfluidic device containing contraction”, p. 18, 14 Maio 2014.
- [15] Sousa P., Pinho F., Oliveira M., Alves M., “Extensional flow of blood analog solutions in microfluidic devices”, *Biomicrofluidics* 5, 2011.
- [16] Dias R., Martins A., Lima R., Mata T., “Single and two-Phase Flows on Chemical and Biomedical Engineering”, Netherlands, Bentham Science Publishers, 2012, p. 513–547.
- [17] Jiang k., Thomas P., Forry S., DeVoe D., Raghavan S., “Microfluidic synthesis of monodisperse PDMS microbeads as discrete oxygen sensors”, *Soft Matter*, vol.8, p.923-926, 2012.
- [18] Acero A., Muñoz N., Montanero J., Calvo A., Vega E., “A new flow focusing technique to produce very thin jets”, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol.23, p. 1-10, 2013.
- [19] Acero A., Ferrera C., Montanero J., Calvo A., “Focusing liquid microjets with nozzles”, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol.22,p. 1-10, 2012.
- [20] Cidre D., “Estudo do Escoamento Sanguíneo em Microcanais com Bifurcações” ,Fevereiro 2008,Dissertação,Bragança.

- [21] Santos N., “Estudo da Reologia de Fluidos Análogos ao Sangue”, 2008-2009, Dissertação, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto.
- [22] Tate S., “Anatomia e Fisiologia”, 8ª edição, LusoCiência, p. 726, 2008, Loures.
- [23] Mohrman D., “Fisiologia Cardiovascular”, 6ª edição, MCGRAW HILL PUBLICATIONS CO, 2007.
- [24] Pimparel L., “Escoamento de Células Sanguíneas em Redes Microcapilares”, Novembro 2012, Dissertação, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.
- [25] Silva S., Caetano S., “Influência das propriedades reológicas do sangue em microcanal com contração simétrica”, 2013-2014, Projeto, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.
- [26] Fedosov D., Caswell B., Popel A., Kardiadakis G., “Blood Flow and Cell-Free Layer in Microvessels”, The official Journal of the Microcirculatory Society, USA, vol.17, p. 615-628, 2010.
- [27] OK B., HJ M., “Blood Rheology and Hemodynamics”, em Seminars in Thrombosis and Hemostasis, New York, Thieme, 2003, vol.29, p.435-450.
- [28] Dias R., Lima R., Garcia V., “In Vitro Blood Flow Behaviour in Microchannels with Simple and Complex Geometries”, In Applied Biological Engineering - Principles and Practice, Porto, InTech, 2012, p. 393-41 .
- [29] Karsheva M., Dinkova P., Pentchev I., Ivanova T., “Blood Rheology - A Key for Blood Circulation in Human Body”, Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy, vol.44, p. 50-54, 2009.
- [30] Lima R., Ishikawa T., Imai Y., Yamaguchi T., “Blood Flow Behavior in Microchannels: Past, Current and Future Trends”, Biomedical Engineering, Bentham Science, Bragança, 2012.
- [31] Pinho F., “Alguns Conceitos Básicos de Hemodinâmica”, 2009, Dissertação Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, .
- [32] Pereira D., “Aproximação de Petrov-Galerkin para o Escoamento de Sangue em Anastomoses Sistêmico-Pulmonares do tipo Blalock-taussig Modificada”, 2001, Dissertação, Porto Alegre.
- [33] Locali R., Almeida E., “Embolia Gasosa”, Revista Brasileira de Terapia Intensiva, vol 18 , Nº3, Brasil, 2006.

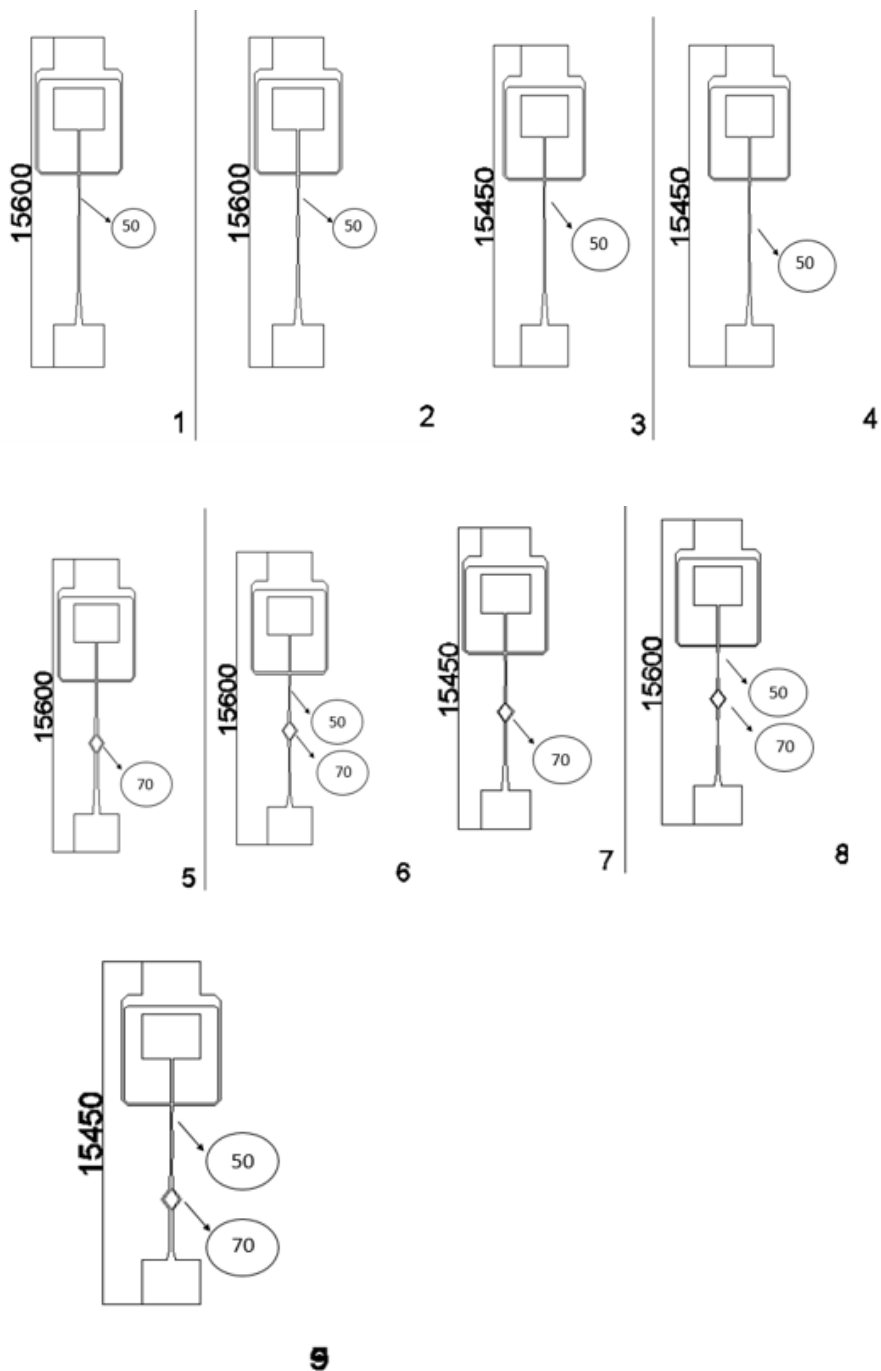
- [34] Webber S., Andrzejowski J., Francis G., “Gas Embolism in Anaesthesia”, *British Journal of Anaesthesia*, vol.2, p.53-57, 2002.
- [35] “Embolia Gasosa Arterial”,
<http://www.pond5.com/pt/illustration/31132591/embolia-gasosa-arterial.html>.
- [36] Muth CM., Shank ES., “ Gas Embolism”, *The New England Journal of Medicine*, vol.342, p. 476-482, 2000.
- [37]”Home Enfermagem”
<http://homeenfermagem.webnode.com.br/products/curso%20para%20capacita%C3%A7%C3%A3o%20de%20inser%C3%A7%C3%A3o%20de%20cateter%20picc%20-%20enfermeiros/>.
- [38] Palmon SC, Moore LE., Lundberg J., Toung T., “Venous Air Embolism”, *Journal of Clinical Anesthesia, USA*, Elsevier, 1997, p. 251-257.
- [39] Calejo J., “Desenvolvimento de Fluidos Bifásicos Análogos ao Sangue: Estudo Reológico, Escoamento em Microcanais e Simulações Numéricas”, Novembro 2013, Dissertação, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.
- [40] Novais S., “Desenvolvimento de um microdispositivo biomédico para a separação e deformação de eritrócitos”, Outubro 2012, Dissertação, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.
- [41] Mishra, R., “Photoresist development on sic and its use as an etch mask for sic plasma etch”, M.S. thesis, Department of Electrical and Computer Engineering, Mississippi State University, (2002).
- [42] Tamaiulo, G., “Blood-Mimicking fluid for biotechnological applications- fluidodynamic behavior of red blood cells and droplets under confined shear flow”, (2008), pp: 18-75.
- [43] Nianzhen, Li., Tourovskaia, A., Folch, A., “Biology on a Chip: Microfabrication for Studying the Behavior of Cultured Cells”, *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, Vol: 31, (2003), pp: 423-488.
- [44] Pinto V., Sousa P., Cardoso V., Minas G., “Optimized SU-8 Processing for Low-Cost Microstructures Fabrication Without Cleanroom Facilities”, *Micromachines*, Vol.5, pp. 738-755, 2014.

- [45] Abramoff M., Magalhaes P. Ram , S., “Image processing with ImageJ”, *Biophoton*, vol.11, pp. 36-42, 2004-11.
- [46] Liu X., Wang Q., Qin J., Lin B., “A facile “liquid-molding” method to fabricate PDMS devices with 3- dimensional channel topography” , *Lab chip*, p.1200-1205,2008.
- [47] Yaginuma T., Oliveira M., Lima R., Ishikawa T., Yamaguchi T., “Red blood ceel deformation in flow throug a PDMS hyperbolic microchannel”, *NSTI-Nanotech*,vol.2, p. 505-507, 2011.
- [48] Carrier O., Dervin E., Funfschilling D., Li H., “Formation of satellite droplets in flow-focusing junctions: volume and neck rupture”, *Microsyst Technol*, vol. 21, p. 9, 3 Abril 2013.
- [49] Zhang X., Basaran O., “An experimental study of dynamics of drop formation”, *Phys Fluids* 7, 2015.

Anexos

Anexo 1

As 9 geometrias fabricadas com dimensões reduzidas dos microcanais com geometria de focagem de fluxo, por uma nova técnica de litografia-suave.



Anexo 2

Erros dos microcanais fabricados por litografia suave.

