

**Estudo experimental de escoamentos fisiológicos em
microcanais fabricados por xurografia**

Elmano Manuel Vieira Pinto

Trabalho de Projecto apresentado à
Escola Superior de Tecnologia e Gestão
Instituto Politécnico de Bragança

para obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia Biomédica

Dezembro de 2012

**Estudo experimental de escoamentos fisiológicos em
microcanais fabricados por xurografia**

Elmano Manuel Vieira Pinto

Trabalho de Projecto apresentado à
Escola Superior de Tecnologia e Gestão
Instituto Politécnico de Bragança

para obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia Biomédica

Orientadores:

Dr. Rui Lima

Dr. Valdemar Garcia

Dr. Ricardo Dias

Dezembro de 2012

*"Science, my boy, is composed of errors,
but errors that it is right to make, for they lead step by step to the truth." - (Jules Verne)*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que estiveram presentes neste fase especial da minha vida e que sobretudo me apoiaram de várias formas nas diversas fases deste projecto. Queria agradecer em especial:

ao Professor Doutor Rui Lima pela orientação e ensinamentos concedidos ao longo do desenvolvimento deste projecto, assim como a dedicação e o incentivo que tornaram a realização do mesmo mais cativante;

ao Professor Doutor Valdemar Garcia pelos conhecimentos transmitidos que se tornaram cruciais para o desenvolvimento do projecto, mas também pela dedicação e paciência da elaboração de todo o relatório;

ao Professor Doutor Ricardo Dias pela dedicação prestada ao longo do projecto, assim como a disponibilidade em criar as condições necessária e fulcrais para a realização projecto;

aos grandes companheiro de trabalho Diana Pinho e David Bento, não só pela ajuda, pelos conhecimentos, pela amabilidade e pela companhia, mas sobre tudo pela amizade que construímos ao longo destes longos meses;

aos meu pais e família, pelo incentivo, dedicação, paciência e sobre tudo pela forma que me educaram ao longo de todos estes anos. E à minha namorada Cátia Daniela sobretudo pela muita paciência demonstrada e pela força que me transmitistes para desenvolver e finalizar este projecto;

à FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia) do QREN, da União Europeia (FEDER) e do programa COMPETE no âmbito dos projectos PTDC/SAU-BEB/105650/2008, PTDC/SAU-BEB/108728/2008, PTDC/EME-MFE/099109/2008, e PTDC/SAU-ENB/116929/2010.

Resumo

Este projecto de mestrado em Tecnologia Biomédica é de natureza experimental e possui como principais pontos de interesse a fabricação de microcanais em polidimetilsiloxano (PDMS) a baixo custo e a visualização do escoamento no interior dos microcanais produzidos.

Constituem como principais objectivos deste projecto a fabricação de microcanais em PDMS com recurso a tecnologias aplicadas à indústria gráfica e efectuar a sua validação. Propôs-se desenvolver/melhorar uma metodologia de microfabricação de baixo custo, conhecida por xurografia, efectuar a visualização e quantificação de vários fenómenos associados ao escoamento sanguíneo em microcanais.

A técnica desenvolvida neste projecto possui como referencia a litografia suave, que por sua vez é a técnica mais utilizada na área da microfabricação. No entanto esta técnica é muito dispendiosa e requer uma sala limpa. Devido à inexistência de uma sala limpa no Instituto Politécnico de Bragança, neste trabalho foi utilizada uma plotter de corte e diversos materiais utilizados na indústria gráfica (vinil, papel adesivo, entre outros) para a produção de um molde e microcanais em PDMS. As geometrias utilizadas para o estudo possuíam larguras com dimensões a variar entre os 150 μ m e os 1000 μ m. Estas possuíam ramificações com zonas de bifurcações e consequentes zonas de confluências. Após a fabricação dos microcanais procedeu-se ao estudo do escoamento de fluidos fisiológicos nesses microcanais. Os fluidos fisiológicos utilizados foram sangue ovino com percentagens de hematócrito entre 1% e 15% em dextrano 40. Foram também testados caudais variáveis entre 5 e 15 μ L/min. Procedeu-se à visualização do escoamento dos fluidos utilizando um sistema de microscópica e captaram-se várias imagens dos microcanais, nomeadamente antes da bifurcação e depois da confluência. As imagens foram tratadas num *software* informático, quantificando a espessura da camada livre de células formada junto das paredes e a jusante da confluência. Os resultados obtidos demonstram que a técnica designada por xurografia pode ser utilizada para estudar vários fenómenos fisiológicos existentes na microcirculação.

Palavras-chave: Microfabricação de baixo custo, xurografia, microcanais, escoamento Sanguíneo, microcirculação, espessura da camada livre de células.

Abstract

This project of the master's degree in Biomedical Technology is an experimental work and includes as the principal interests the fabrication of microchannels of polydimethylsiloxane (PDMS) at low cost and the ability to study blood flow phenomena within the microchannels produced.

The main objective of this project is to fabricate microchannels in PDMS using the technologies applied to the printing industry and validation of their performance. It has been proposed to develop/improve a low cost method of microfabrication, to acquire know how about xurography and to visualize and quantify several physiological phenomena associated with blood flow in microchannels.

The technique used as a reference in this project was soft lithography, which is the most used technique in the field of microfabrication. However this technique is very expensive and requires a clean room. Due to the lack of a clean room at the Polytechnic Institute of Bragança, a cutting plotter and various materials used in the printing industry (technique known as xurography) were used to produce the molds and the correspondent microchannels in PDMS. The geometries used in this study had widths with dimensions ranging from 150 μm up to 1000 μm . These channels had ramifications with bifurcations and confluences regions. After the fabrication of the microchannel the physiological fluid flow in these microchannels were studied. The physiologic fluids used were sheep blood with dextran 40 of which hematocrit percentages were between 1% and 15%. The flow rates varying between 5 and 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ were also tested. The fluid flows were visualized using a microscopic system and captured images of the various microchannels, including especially before the bifurcation and after the confluence. The images were processed with a computer software to quantify the thickness of the cell free layer formed adjacent to the microchannel walls and downstream of the confluence. The results demonstrate that the technique known as xurography can be applied to investigate blood flow phenomena happening in microcirculation.

Keywords: Low cost microfabrication, xurography, microchannel, blood flow, microcirculation, cell free layer.

Conteúdo

Lista de Tabelas	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	xiv
1. Introdução.....	1
1.1. Motivação	1
1.2. Estrutura do relatório	2
2. Fundamentos Teóricos	4
2.1. Microfabricação	4
2.1.1. Fotolitografia	5
2.1.2. Prototipagem rápida.....	9
2.1.2.1. Moldação.....	10
2.1.2.2. Prensagem de polímero a quente.....	10
2.1.2.3. Xurografia	11
2.2. Biofluidos.....	12
2.2.1. O sangue e os seus constituintes.....	13
2.2.1.1. Hemácias	13
2.2.1.2. Leucócitos	14
2.2.1.3. Plaquetas.....	15
2.3. Análise do sangue	15
2.4. Hemodinâmica & Reologia do sangue	16
2.4.1. Classificação dos fluidos	18
2.4.2. Perfis de velocidade de escoamento	18
2.4.3. Comportamento reológico em microcanais.....	19
3. Microfabricação	24
3.1. Procedimento Experimental.....	24
3.1.1. Materiais e Métodos	24
3.1.1.1. Plotter Secabo Mini.....	31
3.1.1.2. Plotter Jaguar II	36

3.1.1.3. Plotter Rolland.....	39
3.1.2. Apresentação e Discussão dos Resultados	41
4. Escoamento Sanguíneo em Microcanais.....	53
4.1. Procedimento Experimental.....	53
4.1.1. Materiais e Métodos	53
4.1.2. Apresentação e Discussão dos Resultados	59
5. Conclusão	75
6. Trabalhos Futuros.....	77
Referências Bibliográficas.....	78

Lista de Tabelas

Tabela 1: Materiais e equipamentos testados na fabricação dos moldes dos microcanais. Apresentação de resultados obtidos e considerações alusivas à utilização dos materiais e equipamentos.	42
---	----

Lista de Figuras

Figura 1: Principais etapas de microfabricação: A – escolha do material para produção do molde; B – construção das microestruturas no material seleccionado; c – selagem do microdispositivo.	5
Figura 2: A – padrão gerado em computador que se pretende transferir para a <i>wafer</i> ; B – máscara de campo escuro, a zona escura é a camada cromada [6].	6
Figura 3: Esquema do processo de fotolitografia. Podemos observar o revestimento da wafer com um material fotorresister, alinhamento do conjunto wafer/máscara e respectiva exposição a radiação UV [6].	7
Figura 4: Representação esquemática do resultados obtido com a revelação do fotorresiste: A – Fotorresiste positivo; B – Fotorresiste negativo.	8
Figura 5: Etapas gerais de microfabricação por fotolitografia: A – Deposição de filme metálico sobre a <i>wafer</i> ; B – Deposição do fotorresister; C – Colocação da máscara e exposição a radiação UV; D – revelação do fotorresister; E – Remoção da camada de fotorresister; F – Corrosão da camada da <i>wafer</i> ; G – Remoção da camada metálica e H – Selagem dos microcanais.....	8
Figura 6: Esquema das diferentes etapas de microfabricação recorrendo a xurografia [17].	11
Figura 7: Hemácias visualizadas em microscópio de varredura [25].....	13
Figura 8: Leucócitos visualizados em microscópio de varredura [25].....	14
Figura 9: Plaquetas visualizados em microscópio de varredura [25].....	15
Figura 10: Tubo de ensaio depois de procedida a centrifugação do sangue. O Hct encontra-se na parte inferior do tubo [25].	16
Figura 11: Comportamento dos fluidos quando sujeitos a tensões de corte [33].....	18
Figura 12: Perfis de velocidade para hematócrito superior e inferior a 1% [30].....	19
Figura 13: Efeito de Fahraeus em capilares de vidro. Distribuição do Hct no microcanal [30].	20
Figura 14: Efeito de Fahraeus-Lindqvist. Variação da viscosidade em função do diâmetro do microcanal [30].....	20
Figura 15: Representação esquemática da migração axial das Hemácias [41].	21
Figura 16: Microdispositivos que imitam as microvasculaturas através da biomimética. a) Associação dos leucócitos que é utilizada para isolar os leucócitos como eles são	

tipicamente encontrados nas regiões mais próximas das paredes do microcanal; b) Lei da bifurcação é manipulada para remover as células livres do plasma do sangue [42]. 23

Figura 17: Desenho esquemático com pormenor da rede de microcanais e zonas de bifurcação e confluência da geometria A – Geometria com canal principal de 300µm de largura e ramificações de 150µm. 25

Figura 18: Desenho esquemático com pormenor da rede de microcanais e zonas de bifurcação e confluência da geometria B – Geometria com canal principal de 500µm de largura e ramificações de 250µm. 25

Figura 19: Desenho esquemático com pormenor da rede de microcanais e zonas de bifurcação e confluência da geometria C – Geometria com canal principal de 1000µm de largura e ramificações de 500 µm..... 26

Figura 20: Diferentes materiais utilizados para a fabricação do molde. 26

Figura 21: Bomba de vácuo e exsiccador utilizado para remover as bolhas de ar presentes na mistura de PDMS..... 27

Figura 22: A - Deposição do PDMS no molde que possui geometria dos microcanais; B - Estufa utilizada para a acelerar processo de cura. 28

Figura 23: *Spin coater* utilizado para o espalhamento de PDMS nas lâminas utilizadas para selar os microcanais. 28

Figura 24: A - Disco giratório do spin coater; B - Disco fabricado em acetato de forma a solucionar o problema. 29

Figura 25: Lâmina utilizada para efectuar a selagem dos microcanais. 29

Figura 26: Selagem de microcanal de 500µm. 30

Figura 27: Plotter de corte *Secabo Mini*. 31

Figura 28: Materiais utilizados para avaliação da compatibilidade com o PDMS durante o processo de cura..... 32

Figura 29: Recorte da geometria e recolha do PDMS que possui o microcanal. 33

Figura 30: Molde da geometria em vinil, depois de removido o PDMS que possuía o microcanal. 33

Figura 31: Utilização de fita adesiva para solucionar problema com a colagem do papel. 34

Figura 32: Reservatório em alumínio com o objectivo de solucionar o poblema de cura de PDMS nas zonas de contacto com alguns moldes..... 34

Figura 33: Na parte superior da imagem encontra-se o molde do acetato e na inferior o respectivo microcanal produzido..... 35

Figura 34: Vinil Tekmark colado na caixa de petri que funcionou como molde para produção do microcanal da imagem.	36
Figura 35: Equipamento utilizado para corte das geometrias para fabricação do molde.	36
Figura 36: Moldes de geometria recortadas com plotter Jaguar II, colocadas numa caixa de petri.	37
Figura 37: Molde dos microcanais no final dos 20 minutos na estufa a 80°C e depois de removidos os microcanais no PDMS.....	38
Figura 38: Microcanais selados com lâmina de 1,2mm de espessura.	38
Figura 39: Microcanal selado com lâmina de 0,4mm de espessura.	39
Figura 40: Microcanal selado em acetato.	39
Figura 41: Molde com microcanal produzido na plotter de corte <i>Rolland</i>	40
Figura 42: Representação esquemática da geometria do microcanal e localização das secções onde foram recolhidos as imagens para obtenção dos valores da largura do molde e do microcanal.....	43
Figura 43: Comparação dos valores teóricos da geometria com largura do canal principal de 300µm com os moldes produzido com a plotter <i>Jaguar II</i> e os respectivos microcanais fabricados.	44
Figura 44: Comparação dos valores teóricos da geometria com canal principal de 500µm com os moldes produzido com a plotter <i>Jaguar II</i> e os respectivos microcanais fabricados.....	45
Figura 45: Comparação dos valores teóricos da geometria com canal principal de 1000µm com os moldes produzido com a plotter <i>Jaguar II</i> e os respectivos microcanais fabricados.....	46
Figura 46: Percentagens de erro entre os microcanais produzidos e os valores teóricos esperados.	47
Figura 47: Imagens obtidas em microscópio invertido com objectiva de 10x: A- Molde produzido com a plotter <i>Jaguar II</i> da geometria com largura do canal principal de 500µm, na zona de bifurcação; B – Microcanal na zona de bifurcação da geometria B, fabricado com o molde apresentado em A.	48
Figura 48: Imagens obtidas em microscópio invertido com objectiva de 10x: A- Molde produzido com a plotter <i>Jaguar II</i> da geometria com largura do canal principal de 500µm, na zona de ramificação (250µm de largura); B – Microcanal na zona de ramificação (250µm) da geometria B, fabricado com o molde apresentado em A.	49

Figura 49: Imagens obtidas em microscópio invertido com objectiva de 10x: A- Molde produzido com a plotter <i>Jaguar II</i> da geometria com largura do canal principal de 500µm, na zona de confluência; B – Microcanal na zona de confluência da geometria com entrada de 500µm, fabricado com o molde apresentado em A.	49
Figura 50: Imagens obtidas em microscópio invertido com objectiva de 20x: A- Molde produzido com a plotter <i>Jaguar II</i> da geometria com largura do canal principal de 300µm, na zona de confluência; B – Microcanal na zona de confluência da geometria com entrada de 300µm, fabricado com o molde apresentado em A.	50
Figura 51: Imagens obtidas em microscópio invertido com objectiva de 4x: A- Molde produzido com a plotter <i>Jaguar II</i> da geometria com largura do canal principal de 1000µm, na zona de confluência; B – Microcanal na zona de confluência da geometria com entrada de 1000µm, fabricado com o molde apresentado em A.	51
Figura 52: Cortes de perfil de microcanais da Geometria B com duas diferentes plotters de corte: A – Plotter <i>Secabo Mini</i> ; B – Plotter <i>Jaguar II</i>	51
Figura 53: Centrifugadora utilizada para efectuar separação do Hct.	54
Figura 54: Montagem realizada para visualizar o escoamento dos fluidos nos microcanais produzidos.	55
Figura 55: Montagem efectuada junto do microcanal para se realizar o escoamento dos fluidos.	56
Figura 56: <i>Tracking</i> efectuado em <i>ImageJ</i> com o <i>plugin Mtrack J</i> na entrada de um dos microcanais produzidos.	57
Figura 57: Representação esquemática das etapas/funções desenvolvidas em <i>ImageJ</i> para a quantificação da CLC na zona central da confluência: A – Convert to Grayscale; B – Image → Stacks → Z Project → Average Intensity; C – Process → Filters → Unsharp Mask (Radius → 9 e Mask → 0,95); D – Process → Make Binary → Dilate. ...	58
Figura 58: Escoamento sanguíneo da zona de bifurcação com Hct de 5% e uma velocidade de 10µL/min.	59
Figura 59: Escoamento sanguíneo da zona de ramificação com Hct de 5% e uma velocidade de 10µL/min.	60
Figura 60: Escoamento sanguíneo da zona de confluência com Hct de 5% e uma velocidade de 10µL/min.	61
Figura 61: Representação esquemática das zonas de medição da camada livre de células (CLC).	62

Figura 62: Espessura da CLC em função do caudal do fluido, para 3 valores de Hct, na zona imediatamente antes da bifurcação do microcanal de 300 μ m, e respectivo desvio padrão.	63
Figura 63: Espessura da CLC em função do caudal do fluido, para 3 valores de Hct, na zona imediatamente após da confluência do microcanal de 300 μ m, e respectivo desvio padrão.	64
Figura 64: Espessura da CLC em função do caudal do fluido, para 3 valores de Hct, na zona imediatamente antes da bifurcação no microcanal de 500 μ m, e respectivo desvio padrão.	65
Figura 65: Espessura da CLC em função do caudal do fluido, para 3 valores de Hct, na zona imediatamente após da confluência do microcanal de 500 μ m, e respectivo desvio padrão.	66
Figura 66: Espessura da CLC em função do caudal do fluido, para 3 valores de Hct, na zona imediatamente antes da bifurcação no microcanal de 1000 μ m, e respectivo desvio padrão.	67
Figura 67: Espessura da CLC em função do caudal do fluido, para 3 valores de Hct, na zona imediatamente após da confluência do microcanal de 1000 μ m, e respectivo desvio padrão.	68
Figura 68: Espessura da CLC dos escoamentos fluídicos realizados no microcanal de 300 μ m.	70
Figura 69: Espessura da CLC dos escoamentos fluídicos realizados no microcanal de 500 μ m.	71
Figura 70: Espessura da CLC dos escoamentos fluídicos realizados no microcanal de 1000 μ m.	72
Figura 71: A - Formação da CLC na zona 2; B – Continuação da CLC ao longo do escoamento, na zona de saída do microcanal.	73
Figura 72: Variação da CLC da zona de confluência do microcanal de 500 μ m no escoamento de Hct a 15%, em função do Reynolds.	74

Lista de Abreviaturas

UV	Ultravioleta
PDMS	Polidimetilsiloxano
PMMA	Polimetilmetacrilato
Hct(s)	Hematócrito(s)
Re	Reynolds
CLC	Camada livre de células

Capítulo 1

1. Introdução

1.1. Motivação

O tema deste trabalho intitulado “Estudo experimental de escoamentos fisiológicos em microcanais fabricados por xurografia”, foi proposto no âmbito do mestrado em Tecnologia Biomédica, tendo como objectivo a obtenção do grau de mestre.

Na área da tecnologia biomédica existe um grande aumento de estudos associados ao escoamento de fluidos em microcanais. Foi já observado o grande potencial que esses estudos possuem na análise de fenómenos relacionados com o escoamento de biofluidos, nomeadamente o sangue. A necessidade de desenvolver dispositivos médicos de diagnóstico de baixo custo e o aumento da crise económica associado aos custos elevados da investigação nesta área tem tido como consequência a diminuição dos fundos disponíveis. De forma a contrariar este factor têm-se desenvolvido novas técnicas de fabricação de microdispositivos que permitam efectuar os estudos de escoamentos, de modo a diminuir os custos associados a todo o processo. Considerando os motivos apresentados, achou-se de todo o interesse fazer um trabalho de investigação na área de escoamentos fisiológicos em microcanais fabricados com o auxílio de técnicas de fabricação de baixo custo. Efectuaram-se, então, esforços para fazer uma revisão de literatura dos métodos de fabricação de microcanais correntemente utilizados, procurando melhorar as metodologias de baixo custo utilizadas por outros autores.

A resistência hidrodinâmica do sistema circulatório assim como as trocas de nutrientes e produtos residuais ocorrem fundamentalmente ao nível dos capilares. Desta forma é necessário atribuir grande importância ao estudo da microcirculação. O conhecimento das propriedades reológicas do sangue é também um factor importante para a compreensão do seu papel na saúde e na doença. Um dos principais pontos de interesse nesta área corresponde à compreensão dos mecanismos de fluxo do sangue em condições fisiológicas e patológicas. Apesar de este ser uma área de estudo importante, na actualidade, grande parte do conhecimento remete para estudos relativos a fenómenos ao nível macroscópicos.

Ao longo dos anos, com o objectivo de observar e compreender os fenómenos que ocorrem em microcirculação, têm-se desenvolvido novos equipamentos e técnicas complementares para se obterem explicações comportamentais do fluxo sanguíneo. Apesar de os resultados já obtidos serem animadores e interessantes, os estudos detalhados foram limitados devido à dificuldade de obter resultados precisos para dimensões tão pequenas. Contribuíram para isto as limitações das tecnologias utilizadas como por exemplo a focagem microscópica, a capacidade computacional insuficiente e os métodos pouco fiáveis para a análise dos resultados. Ainda assim, existiu um avanço tecnológico que tem permitido uma análise mais cuidada dos fenómenos que ocorrem no fluxo sanguíneo à microescala.

O objectivo deste trabalho é desenvolver/melhorar uma metodologia de microfabricação de baixo custo que permita obter bons resultados experimentais comparativamente com os processos de microfabricação convencionais. Pretende-se assim efectuar uma contenção de custos não só na aquisição de equipamento dispendiosos mas também no processo da fabricação sem recorrer a uma sala limpa. Constitui também um objectivo desenhar num *software* CAD microcanais de diversos tamanhos, de diversas geometrias e proceder à fabricação dos modelos *in vitro* baseado em estudos anteriores. Posteriormente são observados escoamentos sanguíneos num sistema de microvisualização constituído por um microscópio invertido e uma câmara de alta velocidade. São recolhidos vários filmes do escoamento sanguíneo com diferentes hematócritos de forma a analisar vários parâmetros hemodinâmicos, como por exemplo a espessura da camada livre de células e velocidade de escoamento.

1.2. Estrutura do relatório

De forma a concluir todos os objectivos propostos e motivar muitos outros investigadores da área, este projecto terá a seguinte constituição. No primeiro capítulo é apresentada a motivação e o seu enquadramento para a realização deste trabalho, assim como a sua estrutura. No segundo capítulo será apresentada uma revisão de literatura, onde serão apresentados não só os fundamentos essenciais para a compreensão do trabalho como vários processos de microfabricação e fundamentos de fluidos. Serão também abordados temas para a compreensão da importância da realização destes estudos, assim como a complexidade dos mesmos.

No capítulo 3 iremos apresentar toda a actividade laboratorial realizada para produzir microcanais. Será abordado o método de microfabricação recorrendo a materiais usualmente utilizados por especialistas das artes gráficas (plotters de corte, vinil, entre outros), técnica conhecida por xurografia. Serão explicados neste capítulo os equipamentos utilizados, assim como as experiencias realizadas e a metodologia utilizada para a microfabricação. Serão também apresentados e discutidos os resultados obtidos tendo por base todo o trabalho desenvolvido ao longo de todo o capítulo.

No capítulo 4 será demonstrado o procedimento utilizado para o estudo do escoamento sanguíneo. Este capítulo será constituído pela parte experimental relativa à análise do escoamento sanguíneo com diferentes caudais e diferentes hematócritos, utilizando os diferentes microcanais produzidos. Posteriormente são apresentados e discutidos os resultados obtidos.

Relativamente ao capítulo 5, serão apresentadas as conclusões deste trabalho relativamente à actividade prática desenvolvida na produção de microcanais com o recurso à técnica de xurografia e à análise dos escoamentos testados nos microcanais produzidos.

No capítulo 6 serão apresentadas sugestões para trabalhos futuros, considerando possíveis melhoramentos fundamentados relativamente ao trabalho desenvolvido mas também outras sugestões viáveis.

Por fim serão apresentadas todas as referências bibliográficas essenciais para adquirir os conhecimentos necessários na execução deste projecto e fulcrais para o enquadramento do trabalho desenvolvido.

Capítulo 2

2. Fundamentos Teóricos

Ao longo deste capítulo iremos abordar aspectos relevantes sobre a microfabricação e sobre biofluidos, dado tratar-se de áreas cruciais para a realização deste trabalho. Os fundamentos teóricos abordados serão fundamentais para o enquadramento da actividade experimental deste projecto.

2.1. Microfabricação

A microengenharia é a área da engenharia que abrange as tecnologias de construção de estruturas tridimensionais, tais como dispositivos ópticos, fluídicos e electromecânicos miniaturizados de alto desempenho. A microfluidica é a ciência e tecnologia de sistemas que processa pequenas quantidades de fluidos, recorrendo a canais com dimensões entre dezenas e centenas de micrómetros [4, 5].

A microfabricação é um termo geralmente associado a processos de fabricação de dispositivos em miniatura. Estes incluem produção de *wafers*, deposição de filmes, micromaquinagem e todos os outros métodos de fabricação de estruturas que se encontrem na escala *mícron*. Com o evoluir do conhecimento tecnológico, tornou-se possível obter um grande controlo geométrico de estruturas na escala *mícron*, permitindo a criação de ferramentas nas mais diversas áreas de estudo, como a biologia molecular, a bioquímica, medicina e mecânica fluídica [4,5].

A microfabricação não só permite que esta seja aplicada a uma ampla área de estudos, como torna-os mais baratos e eficientes, oferecendo assim vantagens como: menor tamanho do dispositivo; menos uso de material para fabricação; menor tamanho da amostra para o estudo; menos resíduos; e melhor controle [4,5].

A engenharia Biomédica, bioquímica e biológica entre outras, já estão a recorrer a microdispositivos e assim usufruir das suas vantagens, permitindo um aumento da quantidade de estudos associados à produção de novos microdispositivos para análises clínicas e cuidados de saúde. Em seguida irão ser apresentados os processos mais

utilizados na fabricação de microdispositivos, mais especificamente microcanais utilizados para testes de escoamento sanguíneo.

2.1.1. Fotolitografia

Os diferentes processos de microfabricação, incluindo os experimentais, serão discutidos ao longo deste trabalho. Será apropriado iniciar a introdução com a explicação da fotolitografia como método mais utilizado para a produção de microcanais que servirá de referência para os mais diversos estudos. A fotolitografia é um processo de transferência de um padrão para uma superfície da *wafers* que pretendemos gravar. No interior dos microcanais produzidos, será onde irá ocorrer todos os processos analíticos. Depois de construídos os microcanais, devem ainda ser analisados vários aspectos como as estratégias de manipulação dos fluidos no interior dos microcanais, o tipo de injeção dos fluidos, métodos de observação, entre outros [6,7,8].

Mesmo existindo uma grande variedade de materiais e de processos para se proceder à fabricação dos microcanais, a maioria dos processos recorrem a 3 etapas fundamentais: escolha do material do molde (na litografia usualmente utilizam-se *wafers* em silício); construção dos microcanais; e selagem do microdispositivo. Na Figura 1 podemos observar um esquema das 3 etapas descritas [6,7,8].

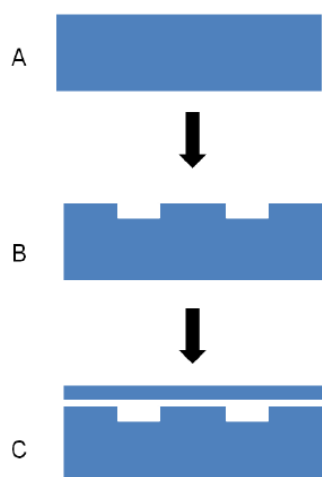


Figura 1: Principais etapas de microfabricação: A – escolha do material para produção do molde; B – construção das microestruturas no material seleccionado; c – selagem do microdispositivo.

Tipicamente na microfabricação utiliza-se uma fonte de energia eléctrica para se efectuar a transferência da imagem para o molde escolhido. Os processos mais utilizados são os fotolitográficos. A fotolitografia foi a primeira técnica utilizada para a construção de dispositivos microfluidicos, como adaptação da fabricação industrial de componentes electrónicos micrométricos [6,7,8].

O processo é iniciado com a criação de um desenho da geometria que pretendemos num *software* formato CAD que permita a impressão do desenho, possibilitando a criação de uma máscara como podemos observar na Figura 2. A máscara é normalmente transparente e feita em cal sodada ou em quartzo, na qual o desenho que foi gerado em computador é depositado numa fina camada cromada. Existem dois tipos de produção de mascaras, os que possuem apenas características rectangulares e as que possuem características circulares. As que possuem características rectangulares são produzidas por um processo denominado de geração de padrões, por sua vez as que possuem características circulares são produzidas recorrendo a um feixe de electrões. As mascaras podem ser também classificadas em mascaras de campo claro ou mascaras de campo escuro. Nas mascaras de campo escuro toda a área é coberta de crómio, enquanto os padrões continuam transparentes, nas mascaras de campo claro o crómio é depositado nas áreas que possui os padrões, enquanto toda a área restante permanece livre [6,7,8].

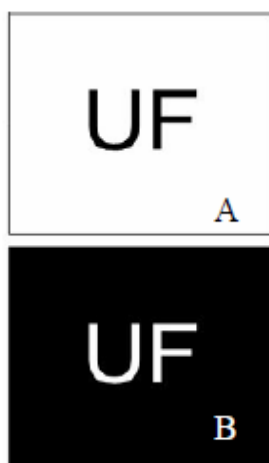


Figura 2: A – padrão gerado em computador que se pretende transferir para a *wafer*; B – máscara de campo escuro, a zona escura é a camada cromada [6].

A fotolitografia (processo representado de forma esquemática na Figura 3) é um processo de microfabricação que possui 4 etapas distintas: aplicação do fotorresiste; alinhamento da máscara; exposição a radiação UV; e revelação do fotorresiste. Relativamente à primeira fase (aplicação do fotorresiste), o fotorresiste é um polímero fotossensível, ou seja, é sensível à luz. Esta propriedade permite que o desenho da geometria seja transferido para a *wafer*. A fina camada de fotorresiste é aplicada na *wafer* geralmente por um processo de revestimento rotacional. É importante efectuar uma escolha adequada do fotorresiste, tendo em conta que existem fotorresiste negativos e positivos possuindo estes comportamentos diferentes quando expostos a radiação UV [6,7,8].

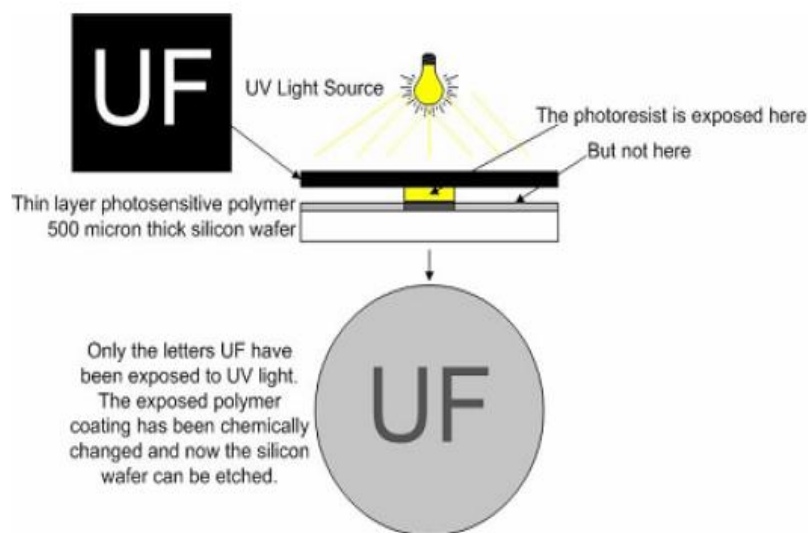


Figura 3: Esquema do processo de fotolitografia. Podemos observar o revestimento da wafer com um material fotorresister, alinhamento do conjunto wafer/máscara e respectiva exposição a radiação UV [6].

O fotorresiste positivo torna-se solúvel quando exposto a radiação UV, ou seja, as áreas do desenho serão dissolvidas durante a etapa de revelação (etapa em que se utiliza um agente de revelação), permitindo que o padrão seja gravado directamente na *wafer*. O fotorresiste negativo torna-se menos solúvel nas mesmas condições, assim sendo, as áreas que não desejamos serão dissolvidas por acção do agente de revelação, a *wafer* vai assim ser gravada em todas as áreas menos nas áreas do desenho [6,7,8]. Na Figura 4 podemos observar uma representação esquemática do molde obtidos com a utilização do fotorresiste negativo e positivo.

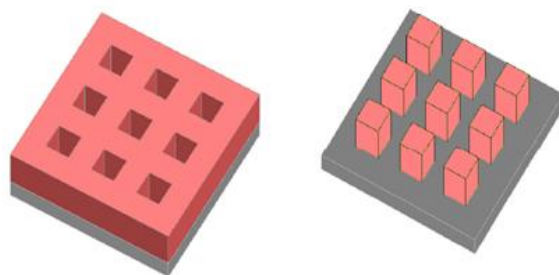


Figura 4: Representação esquemática dos resultados obtidos com a revelação do fotorresiste: A – Fotorresiste positivo; B – Fotorresiste negativo.

Depois de se considerar todos os pormenores anteriormente referidos e de se revestir a *wafer* com o fotorresiste, a máscara é alinhada sobre o *wafer* e é emitida luz UV em direcção ao conjunto *wafer/mascara*. A luz UV passa apenas pelas áreas claras da máscara para o *wafer* [6,7,8].

Por fim, procede-se a revelação do fotorresiste, ou seja, a *wafer* é colocada numa solução de revelação para remover as áreas solúveis de fotorresiste. Depois do padrão ter sido transferido para o fotorresiste por fotolitografia e este ficar gravado por meio de ataque químico, é importante a escolha da solução de revelação. Segundo alguns autores é necessário considerar factores como a taxa de corrosão do sistema e a orientação do material. A selecção do produto químico e as taxas de corrosão a temperaturas específicas devem ser utilizadas de acordo com as indicações fornecidas pelos produtores, de forma a obter um sistema adequado a processo de microfabricação. Na Figura 5 podemos observar de uma forma esquemática e detalhada das diferentes etapas da microfabricação recorrendo à fotolitografia [6,9,10].

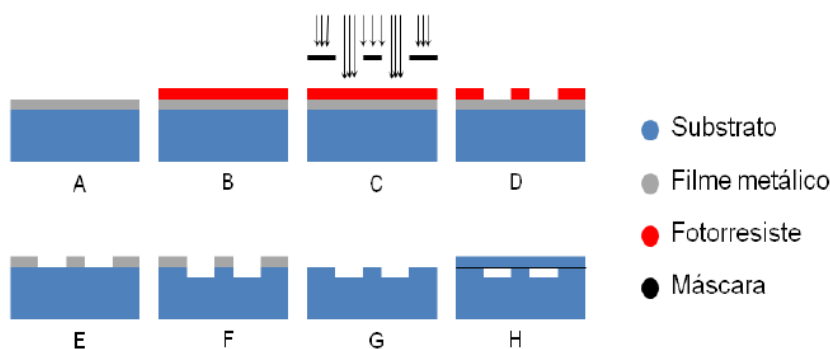


Figura 5: Etapas gerais de microfabricação por fotolitografia: A – Deposição de filme metálico sobre a *wafer*; B – Deposição do fotorresiste; C – Colocação da máscara e exposição à radiação UV; D – revelação do fotorresiste; E – Remoção da camada de fotorresiste; F – Corrosão da camada da *wafer*; G – Remoção da camada metálica e H – Selagem dos microcanais.

A wafer poderá funcionar como microcanal depois de efectuada a sua selagem, ou então se produzíssemos uma wafer que fosse o negativo dos microcanais, esta poderia ser utilizada como molde para a deposição de PDMS. O PDMS depois de solidificado iria adquirir as microestruturas presentes no molde. Posteriormente seria efectuada a selagem e estaria disponível para se efectuarem teste de escoamento de fluidos [6,9,10].

2.1.2. Prototipagem rápida

A microfabricação é um processo de fabricação a uma escala muito pequena, isso poderá por vezes traduzir-se num alto custo e aumento de tempo da produção o que impede por vez o seu uso. Face a esta dificuldade e ao aumento da crise financeira mundial, têm-se procurado ao longo do tempo alternativas que recorram a materiais laboratoriais mais comuns e que acarretem menores custos e maior rapidez na produção. As metodologias que recorrem a prototipagem rápida oferecem todas as vantagens atrás referidas [11,12].

Em grande parte das metodologias utilizadas pelos autores que recorreram a esta técnica como método de microfabricação, utilizou-se o polidimetilsiloxano (PDMS). O PDMS é um excelente material para prototipagem rápida. Este inicialmente encontra-se num estado líquido, porém com a adição de um agente de cura este irá solidificar ao longo do tempo. É também um material que devido às suas propriedades ópticas como a transparência, torna-se possível efectuar uma fácil visualização do fluxo sanguíneo em microscópio. O PDMS normalmente utilizado (*Sylgard® 184 Silicone Elastomer Kit*) faz parte de um conjunto composto de oligómero de PDMS. São normalmente misturados na proporção de 10/1 com um agente de cura ou um agente de ligação cruzada para produzir o polímero usado para fabricar os microdispositivos. Posteriormente a mistura é colocada no molde onde se encontra a geometria que pretendemos e é deixado a curar. A cura do PDMS é alterada com a acção da temperatura, tornando-se possível acelerar o processo com o aumento da temperatura [11,12].

2.1.2.1. Moldação

A moldação é uma técnica que recorre a impressoras 3D de alta resolução para a produção de máscaras, tornando o processo mais barato comparativamente com as máscaras comumente utilizadas em fotolitografia. Neste processo, o desenho CAD é reproduzido num filme que funcionará como máscara. A máscara é alinhada sobre uma *wafer* que está revestida com fotorresiste e é exposta a luz ultravioleta. Após esta etapa a *wafer* irá funcionar como molde para a deposição de PDMS e posteriormente proceder-se a sua remoção, obtendo-se assim microcanais em PDMS. O fotorresiste utilizado neste processo (SU-8) permite que seja depositado até 2mm de espessura sobre a *wafer*, o que é bastante superior comparativamente com outros (normalmente a espessura varia entre 2-3 μ m). De referir que este método de produção de máscaras com impressoras 3D, provoca uma perda de qualidade e resolução dos microcanais finais. As máscaras produzidas possuem menos precisão do que as produzidas por fotolitografia, desta forma todas as etapas seguintes serão influenciadas pela qualidade das máscaras produzidas [13].

2.1.2.2. Prensagem de polímero a quente

Outro método que recorre à prototipagem rápida é a prensagem de polímero a quente. Este método tira vantagem das propriedades viscoelásticas de polímeros (frequentemente é utilizado o polimetilmetacrilato (PMMA)), próximo do ponto de transição vítrea o polímero transforma-se em maleável. Neste método de microfabricação um molde e o substrato de polímero são postos em contacto, aquecidos e pressionados em conjunto. O padrão do molde é transferido para o substrato de polímero. Depois de transferido o padrão para o polímero, este é arrefecido até à temperatura de transição vítrea, adquirindo assim o padrão do molde. É um processo que permite a construção de estruturas com 15 μ m de largura e 1 μ m de espessura. O PMMA tem sido utilizado na área da biologia em processos de separação pela *LabCard* [14,15].

Neste processo o PDMS não é utilizado mas sim o PMMA, este é um polímero facilmente manuseado e rígido enquanto o PDMS é um elastómero flexível e pegajoso que recolhe facilmente resíduos sólidos do ambiente durante o processo de experimentação. O PMMA quando trabalhado com cuidado, minimiza a recolha de pó e

a transferência de impressões digitais que são artefactos indesejados na visualização microscopia [16].

2.1.2.3. Xurografia

A plotter de corte é um equipamento utilizado mais frequentemente na área das artes gráficas. No entanto, recentemente esta tecnologia tem vindo a ser utilizada para a fabricação de moldes para a produção de microcanais. Esta técnica tem como principal objectivo diminuir os custos de produção, considerando que todos os métodos atrás descritos são mais dispendiosos. A plotter de corte é utilizada para cortar vinil ou outros materiais que irão funcionar como molde para o fabrico do dispositivo. Depois de colocado o PDMS no molde, este é desgaseificado com uma bomba de vácuo e posteriormente é efectuada a sua cura num forno ou outro equipamento equivalente (por exemplo uma estufa). Com este método é possível fabricar diversos dispositivos microfluídicos de forma barata e rápida (tempo inferior a 90 minutos). Esta metodologia pode assim ser utilizada por cientistas e investigadores sem acesso a instalações e equipamentos dispendiosos e pode ser aplicada à investigação científica. Na Figura 6, é apresentado um desenho esquemático das várias etapas desta técnica também conhecida por xurografia [17].

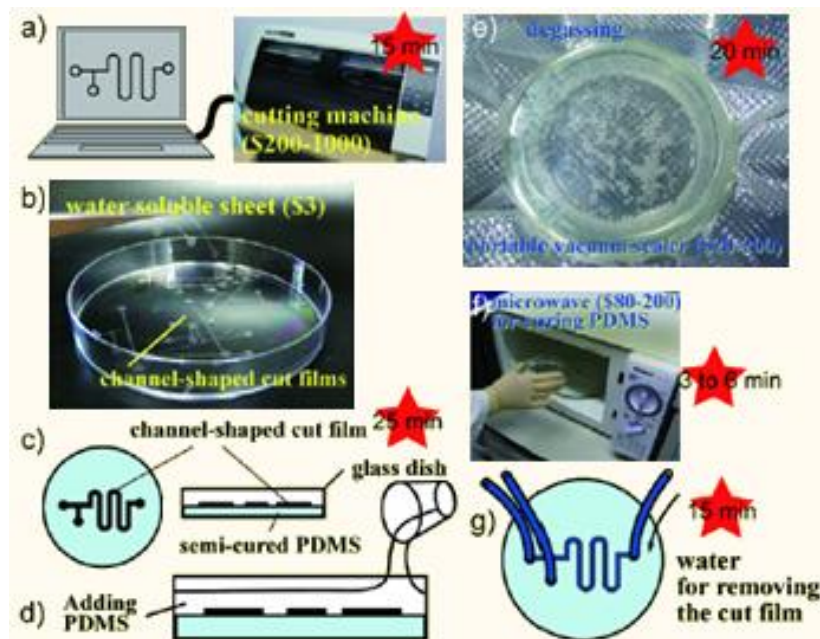


Figura 6: Esquema das diferentes etapas de microfabricação recorrendo a xurografia [17].

Daniel *et al.* [18], exploraram diferentes materiais utilizados na indústria gráfica, verificando qual o material que apresentava melhor precisão e qual permitia produzir microestruturas de menores dimensões possíveis. Verificaram que películas térmicas e Rubylith® foram os materiais que permitiram produzir moldes para microestruturas em PDMS com melhor qualidade e com menores dimensões. Verificaram também que era possível produzir microestruturas de forma mais rápida comparativamente com os outros métodos usualmente utilizados.

Apesar de ser uma técnica bastante barata e que produz bons resultados, tem-se ainda desenvolvido poucos estudos com o objectivo de melhorar a produção das microestruturas a baixo custo. Por outro lado não existem estudos relativos à possível aplicação desta técnica ao estudo do escoamento sanguíneo à microescala.

2.2. Biofluidos

Um biofluido é por definição um fluido biológico. Os fluidos biológicos, como o nome sugere, são fluidos produzidos no interior de um corpo orgânico, podendo estes ser, urina, bÍlis, leite materno e o sangue, entre outros. Alguns fluidos podem ser obtidos sob a forma de secreção (leite materno, bÍlis), pode ser excretado (urina, suor), obtido com o recurso de dispositivos médicos (sangue, fluido espinal), ou desenvolver-se como resultado de um processo patológico (pus). De todos os fluidos produzidos no ser vivo, é atribuída especial importância ao sangue pelas funções que este desempenha na sua sobrevivência. [19]

O sangue é um biofluido bombeado pelo coração, que circula por todo o corpo humano em vasos sanguíneos. Este transporta substâncias dissolvidas, produzidas por processos metabólicos do organismo ou necessárias para que os referidos processos possam ocorrer.

Considerando a importância que o sangue possui para a sobrevivência do ser vivo, tem-se verificado um aumento significativo de estudos nas mais diversas áreas. Estudos relacionados com a sua composição, as patologias associadas assim como o seu comportamento ao longo do escoamento nos mais diversos canais de transporte que o ser vivo possui, são objecto de reflexão e de estudo na actualidade.

2.2.1. O sangue e os seus constituintes

O sangue é um fluido opaco, com viscosidade superior à água e heterogéneo constituído por um líquido claro, o plasma e uma série de elementos celulares (Eritrócitos, Leucócitos e Plaquetas) [20]. O sangue está contido num compartimento fechado, o aparelho circulatório que o mantém em movimento segundo um fluxo unidireccional [21]. Num adulto, o volume de sangue corresponde a cerca de 7% do peso do corpo, ou cerca de 5 litros (num adulto com cerca de 70 Kg de peso) [22]. O sangue, devido a sua complexidade e ao facto de ser composto por células que exercem funções específicas, pode ser chamado de tecido, considerando o ponto de vista funcional. O sangue não é um líquido, ele encontra-se num estado fisiológico normal, próximo da composição líquida, na verdade, mais próximo do estado de sol (gel diluído) [23, 24].

2.2.1.1. Hemácias

As hemácias, eritrócitos ou glóbulos vermelhos (Figura de Hemácias em microscópio de varredura) são elementos celulares anucleados, com forma de disco bicôncavo, com cerca de 7,5 micrómetros de diâmetro, cerca de 2,6 micrómetros de espessura na periferia e com apenas 0,8 micrómetros de espessura no centro. A forma bicôncava proporciona uma grande superfície, o que facilita as trocas gasosas da responsabilidade dos eritrócitos. Além disso, as hemácias são muito flexíveis o que lhe permite adaptar à forma dos capilares de menor diâmetro. A quantidade normal no sangue varia entre 3,9 e 5,5 milhões / mm³ de sangue na mulher e entre 4,1 e 6,0 milhões / mm³ de sangue no homem [21].



Figura 7: Hemácias visualizadas em microscópio de varredura [25].

A principal função das hemácias é transportar O_2 para os tecidos do organismo e o transporte de CO_2 dos tecidos para o parênquima pulmonar. Para cumprirem o seu objectivo primordial que é a troca de gases, as hemácias contém no citoplasma uma proteína especializada designada hemoglobina [26, 27].

2.2.1.2. *Leucócitos*

Leucócitos ou glóbulos brancos (visualização em microscópio de varredura na Figura 8) são células com forma esférica quando em suspensão no sangue, intervenientes em mecanismo de defesa. De forma constante, os leucócitos deixam o interior dos capilares para penetrarem no tecido conjuntivo, ocorrendo o fenómeno de diapedese. Na prática, os leucócitos são frequentemente dividida em dois grupos principais, os granulócitos e os agranulócitos [21, 28, 29].



Figura 8: Leucócitos visualizados em microscópio de varredura [25].

Os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) têm um núcleo irregular segmentado. Possuem grânulos no seu interior, delimitados por uma membrana. Os agranulócitos (monócitos e linfócitos) têm um núcleo que possui uma forma regular, ou seja, não apresentam granulações no seu citoplasma. O número de leucócitos por mm^3 de sangue no adulto normal varia entre 6.000 a 10.000, sendo 60 a 70% de neutrófilos, 2 a 4% de eosinófilos, 0 a 1% de basófilos, 20 a 30% de linfócitos, 3 a 8% de monócitos [21, 29]. O diâmetro dos leucócitos poderá variar entre os 7 e os $22\mu m$ de acordo com o seu tipo. [30]

2.2.1.3. *Plaquetas*

As plaquetas sanguíneas (observar na Figura 9), também conhecidas como trombócitos, são relativamente pequena (2-4 μ m de diâmetro), irregulares ou ovais presentes em grande número (200.000-400.000/ μ L de sangue) no sangue. As plaquetas são fragmentos de células anucleadas, derivados de megacariócitos na medula óssea. Desempenham um papel fundamental na coagulação do sangue, formando tampões mecânicos durante a resposta hemostática à lesão vascular. Para que a resposta hemostática seja eficaz, as plaquetas desempenham reacções de adesão, secreção, agregação e fusão [20, 23, 31].

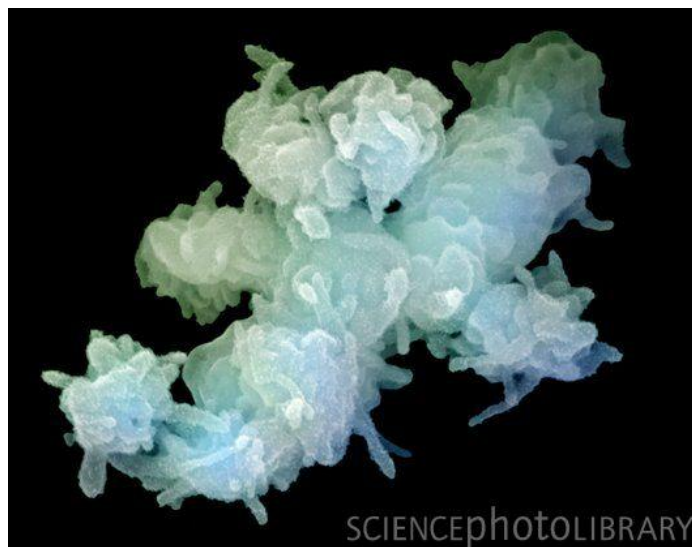


Figura 9: Plaquetas visualizados em microscópio de varredura [25].

2.3. **Análise do sangue**

Para se conhecer a composição do sangue, a forma mais comum é a sua análise bioquímica e celular por meio do hemograma. O sangue é composto basicamente de água (aproximadamente 90%), e é dividido em plasma (60%) e células [22]. Através de uma punção venosa obtém-se uma amostra de sangue que é colocada num tubo de ensaio padronizado. Para evitar a sua coagulação, são adicionadas substâncias anticoagulantes como, a heparina. Na centrifugação do sangue não-coagulado ocorre essa divisão, podendo se verificar que a parte mais densa (celular) é composta principalmente por hemácias (ou glóbulos vermelhos), sendo denominada hematócrito (Hct). Na Figura 10 podemos observar o tudo de ensaio depois de efectuada a centrifugação. Embora o Hct seja toda a parte celular do sangue não-coagulado, no

ponto de vista prático pode-se caracterizar o Hct como a quantidade de hemácias presente no sangue. O aumento do Hct significa o aumento na quantidade de glóbulos vermelhos no sangue, que pode ser derivado de uma policitemia (aumento do número de células do sangue), ou devido à perda de líquido sanguíneo. A contagem dos Hct é feita em relação ao plasma (parte líquida do sangue): proporção do sangue total ocupado pelos glóbulos vermelhos [21, 22].



Figura 10: Tubo de ensaio depois de procedida a centrifugação do sangue. O Hct encontra-se na parte inferior do tubo [25].

2.4. Hemodinâmica & Reologia do sangue

A análise do fluxo sanguíneo no sistema cardiovascular é bastante complexa. Considerando que o coração é uma bomba na qual ocorrem diversos factores físicos e químicos que afectam o seu comportamento, será de esperar uma análise difícil do comportamento do fluxo sanguíneo. Os vasos sanguíneos são também bastante elásticos e possuem diversas ramificações de diversos tamanhos, assegurando assim uma rede complexa de transporte sanguíneo para toda a parte do corpo humano. O sangue, como já foi referido anteriormente neste trabalho, é uma solução complexa que possui diversos tipos de células na sua constituição dificultando ainda mais o processo de análise do seu escoamento [32].

Considerando os factores atrás descritos seria de esperar uma grande dificuldade na análise de um complexo escoamento sanguíneo, porém é possível simplificar o

processo aplicando elementos elementares da mecânica dos fluidos aplicada a sistemas hidráulicos simples [32].

O escoamento sanguíneo pode assim obedecer aos princípios físicos de escoamento no interior de condutas, no qual a massa, a energia e a quantidade de movimento são conservadas. O movimento do sangue nos vasos sanguíneos é provocado pelo gradiente de pressão que existe no seu interior. A pressão nos vasos sanguíneos, está constantemente a ser alterada no seu interior, de ponto para ponto, assim sendo esta variação da pressão irá provocar o movimento do sangue. Porém, as forças tangenciais ao movimento do sangue (forças de corte), assim como as forças provocadas pela turbulência do escoamento opõem-se à circulação sanguínea [32].

O escoamento pode ser considerado laminar ou turbulento. Um escoamento laminar ocorre quando a velocidade tem apenas uma componente ao longo do eixo, ou seja, o fluido move-se em camadas, uma camada desliza sobre a camada adjacente, ocorrendo apenas troca de quantidade molecular. Por sua vez o regime turbulento ocorre quando existem outras componentes não normais ao eixo, apesar da componente principal se encontrar ao longo do eixo, ou seja, as partículas apresentam um movimento irregular, existindo assim componentes transversais ao escoamento global do fluido [32].

Em regime laminar, a viscosidade tende a moderar o aparecimento da turbulência, possuindo um Reynolds (Re) inferior a 2300, por sua vez os escoamentos turbulentos são caracterizados por possuir Reynolds superiores a 2300 e por ocorrerem dissipações de energia [32].

O número de Reynolds representa a razão entre as forças de inercia e as forças da viscosidade, permitindo analisar se o escoamento é laminar ou turbulento. Este pode ser calculado tendo em conta as forças inerciais e as forças causadas pela viscosidade. Para condutas de secção circular é calculado por:

$$R_e = \frac{\rho V D}{\mu} = \frac{V D}{\nu} \quad (1)$$

onde ρ é a massa volúmica do fluido, V é a velocidade média, D é o diâmetro da conduta, μ é a viscosidade do fluido e ν é a viscosidade cinemática. Para condutas de secção não circular o diâmetro deve ser substituído pelo diâmetro hidráulico.

2.4.1. Classificação dos fluidos

Relativamente ao comportamento do fluido, estes podem ser classificados como newtoniano, ou não-newtoniano, quando relacionamos a tensão de corte com a taxa de deformação de corte. Seguidamente na Figura 11 pode-se observar o comportamento dos fluidos com a variação dos factores atrás descritos [33].

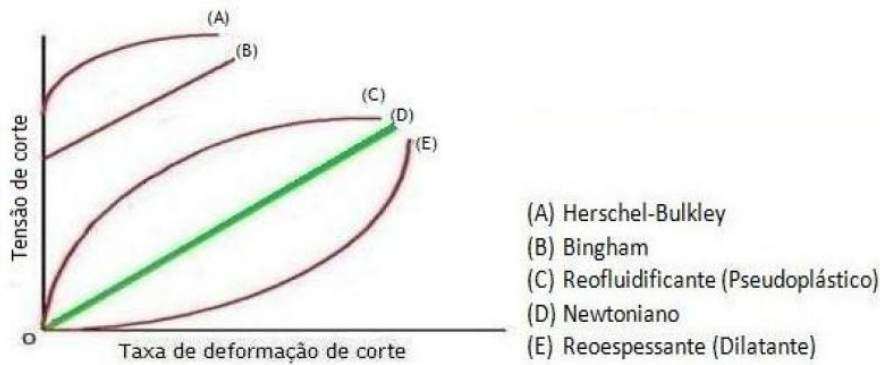


Figura 11: Comportamento dos fluidos quando sujeitos a tensões de corte [33].

Fluidos Newtonianos são todos os fluidos que possuem sempre a mesma viscosidade com a alteração da velocidade, ou seja, apresentam um comportamento viscoso ideal, existindo uma proporcionalidade entre a tensão de corte e a taxa de deformação. Os fluidos mais comuns são o leite, a água, óleos vegetais e o plasma [33].

Os fluidos não-Newtonianos (Bingham, Dilatante, Herschel-Bulkley e Pseudoplástico), não existe relação de proporcionalidade directa entre a tensão de corte e a taxa de deformação, variando assim a sua viscosidade com o grau de deformação aplicado. A polpa de tomate e o sangue são dois dos fluidos não-Newtonianos mais conhecidos [33, 34].

Apesar de a maioria dos fluidos não-Newtonianos se comportarem com um fluido Pseudoplástico, existem também algumas suspensões de partículas irregulares que se comportam como um fluido Dilatante [34]

2.4.2. Perfis de velocidade de escoamento

A determinação da velocidade do escoamento sanguíneo em microvasos e microcanais têm sido objecto de estudo por diversos autores que recorrem as mais diversas técnicas. Apesar de alguns considerarem que o perfil de velocidade pode ser

aproximado a um perfil parabólico, em alguns casos relatam que se pode aproximar de um perfil tipo “pistão” (plano em torno do eixo do microcanal), considerando Hct superiores a 1%, como podemos observar na Figura 12. Como já foi feito referência anteriormente neste trabalho, o escoamento sanguíneo é um processo complexo que é afectado por diferentes parâmetros como o diâmetro do microcanal, a taxa de deformação, o fluido em suspensão (plasma, soro fisiológico ou dextrano), erros experimentais, entre outros. Considerando estes factores, como seria de esperar existe ainda uma grande controvérsia entra os diferentes resultados experimentais e os respectivos autores na escolha do perfil que se aproxime a velocidade do escoamento sanguíneo [30, 35, 36, 37].

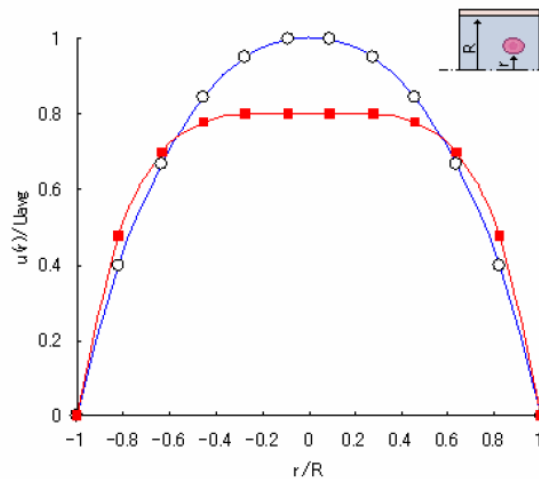


Figura 12: Perfis de velocidade para hematócrito superior e inferior a 1% [30].

2.4.3. Comportamento reológico em microcanais

Ao longo dos tempos, foram efectuados estudos relacionados com o comportamento reológico do fluxo de sangue para diferentes diâmetros de microcanais e para diferentes Hct. Foram observados dois efeitos, o efeito de Fahraeus e o efeito de Fahraeus-Lindqvist, estando estes associados com a alteração dos factores anteriormente enumerados [30,38,39].

Robin Fahraeus observou nos seus estudos que o fluxo sanguíneo e o seu hematócrito são afectados pela alteração do diâmetro dos microcanais, quando estes são inferiores a 300µm de diâmetro. O efeito Fahraeus indica que para microcanais mais

estreitos ocorre o fenômeno de migração axial das hemácias para o centro do microcanal. Podemos observar o efeito de Fahraeus na Figura 13 [30,38,39].

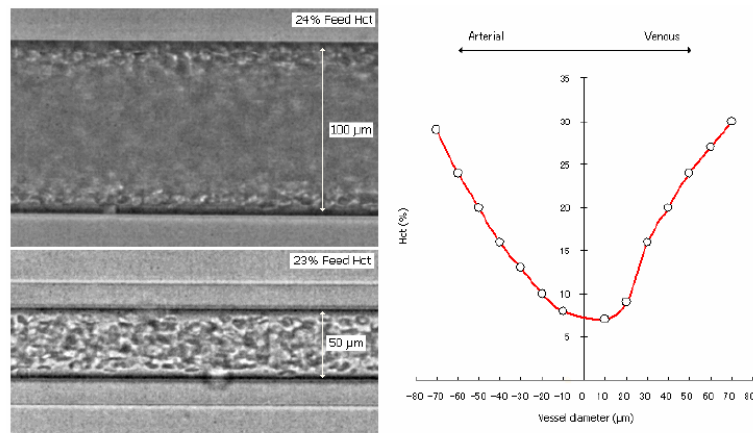


Figura 13: Efeito de Fahraeus em capilares de vidro. Distribuição do Hct no microcanal [30].

O efeito de Fahraeus-Lindqvist, tal como o fenômeno anteriormente referido ocorre para diâmetros inferiores a $300\mu\text{m}$, observando-se a variação da viscosidade do sangue com a alteração do diâmetro dos microcanais. Verificou-se que a viscosidade do sangue diminui com a diminuição do diâmetro do microcanal, porém vários estudos posteriores verificaram que para diâmetros inferiores a $7\mu\text{m}$ o efeito de Fahraeus-Lindqvist é invertido, tal como podemos observar na Figura 14. Foram apresentados pelos autores destes estudos vários fenômenos que podem influenciar a viscosidade aparente do escoamento sanguíneo, como a camada de plasma e os movimentos microscópicos realizados pelas hemácias [38,39].

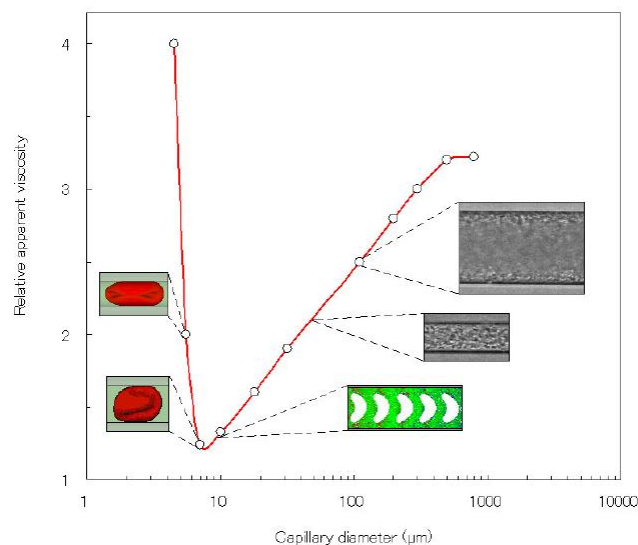


Figura 14: Efeito de Fahraeus-Lindqvist. Variação da viscosidade em função do diâmetro do microcanal [30].

O efeito de Fahraeus-Lindqvist pode ser explicado por dois factores associados, a diminuição do diâmetro do microcanal que provoca um decréscimo do hematócrito a ser escoado devido à formação de uma camada livre de células (CLCs) junto às paredes do microcanal. A CLC formada junto as paredes ainda não possui uma explicação totalmente unânime, porem esta pode ser associada à tendência das hemácias migrarem para a zona central do microcanal como podemos observar na Figura 15. Assim sendo o plasma que se encontra junto as paredes (local onde as forças de corte são máximas) irá reduzir o atrito entre as hemácias e as paredes dos microcanais, contribuindo assim para a redução da viscosidade do sangue [40].

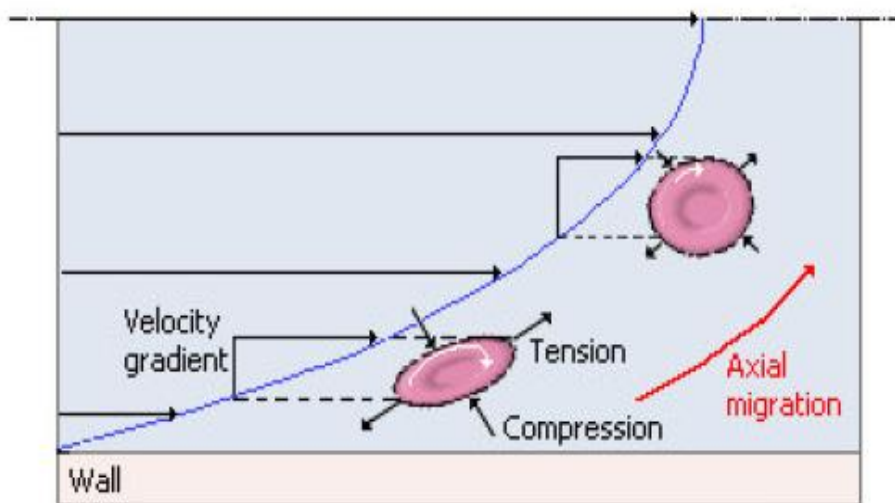


Figura 15: Representação esquemática da migração axial das Hemácias [41].

2.4.4. Técnicas de separação de células baseados em biomimética

As técnicas de separação baseadas em biomimética dos microfluidos adaptam-se aos fenómenos hemodinâmicos que envolvem as propriedades intrínsecas do sangue e das microvasculaturas, de forma a se alcançar o fraccionamento desejado dos componentes do mesmo. Estes fenómenos incluem a drenagem do plasma, a associação dos leucócitos e o efeito Zweifach Fung, também conhecido por lei da bifurcação. Apesar dos mecanismos não serem descritos, estes efeitos foram observados e reproduzidos em sistemas microfluídicos [42,43].

Dentro da microvasculatura, a concentração das Hemácias tende a ser elevada junto ao centro dos vasos, enquanto que os Leucócitos são associados a uma região rica em plasma nas paredes dos mesmos.

A lei da bifurcação descreve o comportamento das Hemácias quando o microcapilar bifurca. Estas células deslocam-se predominantemente, o maior dos capilares na bifurcação. Então foram desenvolvidas algumas técnicas que aproveitam estes efeitos da lei da bifurcação. Shevkoplyas *et al.* desenvolveram um método para o isolamento dos Leucócitos do sangue através da aplicação deste fenómeno fisiológico [42,43].

A separação das células do plasma é outro objectivo comum. O fenómeno da drenagem do plasma tem sido explorado *in vitro* para a separação das células livres do plasma. Faivre *et al.* exploraram este efeito em microcanais fabricados com sangue, previamente, diluído. Para além disso, eles aplicaram uma saída trifurcada para seguirem ao pormenor esta súbita expansão do mesmo [42,44]. Sollier *et al.* reviram, recentemente, este método e demonstraram que o efeito encontra-se, também, presente em canais mais largos, mesmo utilizando caudais mais elevados [42,44]. Os parâmetros mais importantes para o desenvolvimento destes métodos foram a viscosidade (ajustada através da diluição do sangue), a forma e o tamanho da expansão, bem como o caudal utilizado. Nestas condições de valores elevados de caudal, os efeitos de inércia podem afectar a drenagem do plasma. A lei da bifurcação foi também manipulada de forma a que eles conseguissem uma separação do plasma altamente eficiente através de uma vasta gama de Hct.

Por conseguinte, as técnicas de separação baseadas na biomimética, como podemos observar na Figura 16, são compostas por um número de técnicas diferentes, podendo ser aplicadas de inúmeras maneiras. Os caudais utilizados para a drenagem do plasma testada por Faivre e Sollier, permitiu-lhes processar grandes volumes de amostra. Os dispositivos produzidos por Shevkoplyas (associação de leucócitos) e Yang (lei da bifurcação) executam a caudais relativamente baixos. Este facto limita a sua utilização para dispositivos portáteis, também conhecidos por *lab-on-chip*, onde a manipulação de pequenos volumes é imprescindível [32].

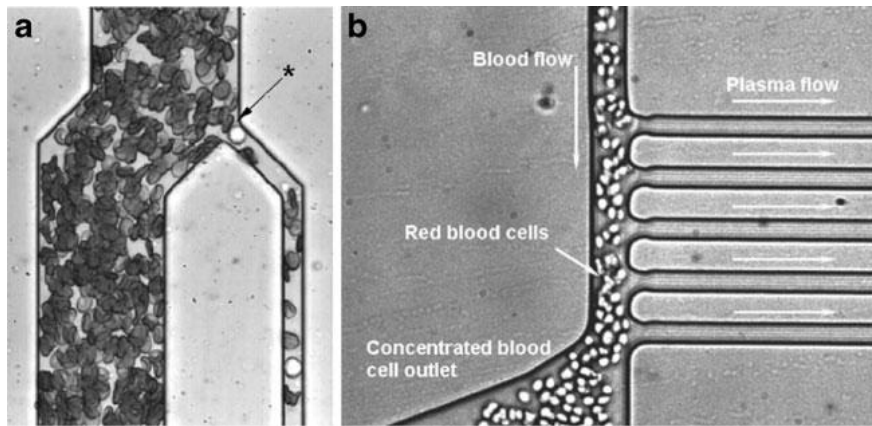


Figura 16: Microdispositivos que imitam as microvasculaturas através da biomimética. a) Associação dos leucócitos que é utilizada para isolar os leucócitos como eles são tipicamente encontrados nas regiões mais próximas das paredes do microcanal; b) Lei da bifurcação é manipulada para remover as células livres do plasma do sangue [42].

Capítulo 3

3. Microfabricação

Ao longo deste capítulo iremos apresentar todos os materiais e métodos utilizados para a produção dos microcanais. No capítulo 3 são explicadas todas as opções tomadas para a realização da actividade experimental na fabricação de microcanais. Estes possuíam secção rectangular com uma bifurcação e confluência. Foram produzidos com recurso a um equipamento utilizado na indústria gráfica (xurografia). Nesta secção, serão não só apresentados e discutidos os resultados obtidos mas também será efectuada uma comparação com os valores teóricos.

3.1.Procedimento Experimental

3.1.1. Materiais e Métodos

Foi desenvolvido um dispositivo com microcanais que beneficiasse o estudo dos fenómenos que ocorrem em bifurcações e respectivas confluências, bem como futuros projectos de microfabricação e modelagem computacional. Foram testadas diferentes geometrias, desta forma foram desenvolvidos diversos desenhos CAD de microcanais em formato vectorial. Estes microcanais têm como objectivo, posteriormente (Capitulo 3.2) simular um sistema de redes capilares simples de forma a analisar o comportamento das hemácias e fenómenos como a camada livre de células (CLC). Será observado a influências das bifurcações e as respectivas confluências na espessura da CLC. Os microcanais fabricados possuem paredes laterais rectas e verticais.

Depois de determinar a forma dos microcanais, foram também consideradas as dimensões. A metodologia utilizada foi baseada em estudos já apresentados anteriormente associados a plotters de corte. A largura mínima dos microcanais considerada foi limitada pelo processo de corte do molde com o recurso a três plotters. Foi considerada como largura máxima dos microcanais as largura utilizadas por outros autores e considerando que pretendíamos efectuar um estudo na escala micron. A espessura do microcanal estava também sujeito ao material que iríamos utilizar para a produção do molde. Todo o processo experimental estava dependente das condições utilizadas para recortar o molde. A precisão das diferentes plotters em efectuar o corte

das geometrias, assim como a precisão das lâminas de corte em efectuar o recorte dos diferentes materiais, influenciariam o processo de fabricação

Foi necessário desenhar-se as geometrias do sistema de escoamento num suporte informático CAD vectorial. O ficheiro seria necessário para o recorte das geometrias com a plotter. Desta forma foram utilizados três *softwares*, um software de desenho e dois *softwares* compatíveis com o equipamento, permitindo o corte. O *AutoCAD* foi utilizado para desenhar as geometrias em formato *CAD* vectorial, o *coreldraw* e *GreatCut* foram utilizados como *software* de compatibilidade entre o formato digital e as plotters de corte. Nas Figura 17, 18 e 19 são apresentadas as geometrias utilizadas para este estudo e as respectivas larguras dos microcanais em micron (μm).

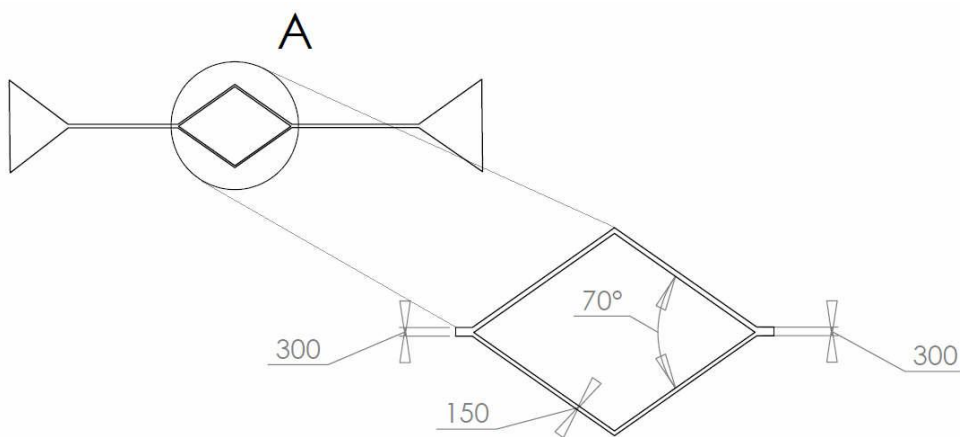


Figura 17: Desenho esquemático com pormenor da rede de microcanais e zonas de bifurcação e confluência da geometria A – Geometria com canal principal de 300 μm de largura e ramificações de 150 μm .

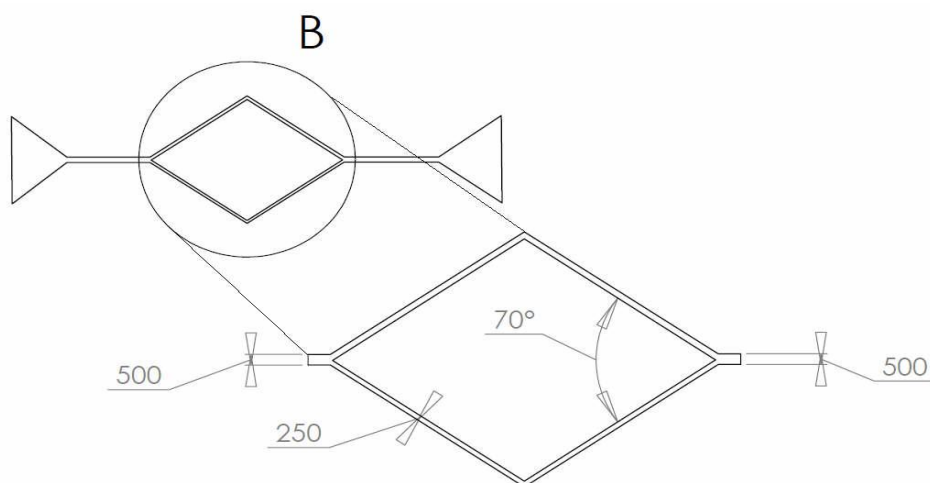


Figura 18: Desenho esquemático com pormenor da rede de microcanais e zonas de bifurcação e confluência da geometria B – Geometria com canal principal de 500 μm de largura e ramificações de 250 μm .

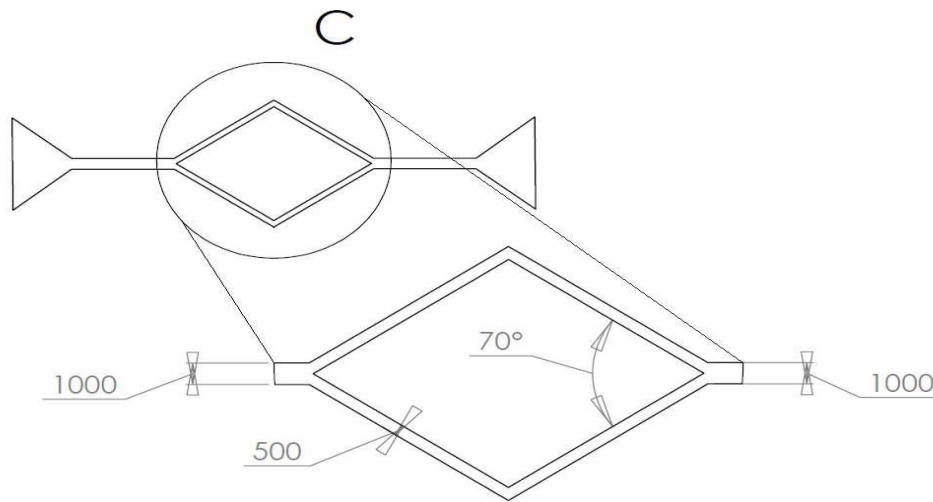


Figura 19: Desenho esquemático com pormenor da rede de microcanais e zonas de bifurcação e confluência da geometria C – Geometria com canal principal de 1000μm de largura e ramificações de 500 μm.

Para se efectuar o recorte das geometrias para a produção do molde e posteriormente fabricar-se os microcanais, foram utilizados diversos tipos de materiais e 3 diferentes plotters de corte. Assim seria permitido efectuar a comparação entre os equipamentos e analisar qual apresenta melhor qualidade de produção dos microcanais. Inicialmente utilizou-se uma plotter *Secabo Mini*. Permitiria efectuar testes preliminares e averiguar se o método seria plausível para se efectuar um estudo mais aprofundado, ou se não seria adequado para os objectivos propostos. Os materiais utilizados foram diversos, como vinil de diferentes cores e espessuras utilizados na indústria gráfica, acetato de diferentes espessuras e papel adesivo. Na Figura 20 podemos observar os diferentes materiais testados ao longo deste projecto. Mais à frente neste projecto serão apresentados de forma mais detalhada os materiais, as suas características e os resultados obtidos.



Figura 20: Diferentes materiais utilizados para a fabricação do molde.

A metodologia utilizada para a fabricação dos microcanais foi a mesma para todas as geometrias e todos os equipamentos utilizados. Inicialmente recortou-se algumas das geometrias já apresentadas e coloca-las em caixas de petri com o auxílio de um papel de transporte. Posteriormente seria necessário produzir-se PDMS que será depositado sobre o molde recortado e efectuar a sua cura. Este irá adquirir a forma da geometria recortada que poderá posteriormente ser selada com uma lâmina. Assim sendo, seria necessário produzir-se duas diferentes misturas de PDMS, uma para o molde (razão de 10:1) e outra a lâmina de selagem dos microcanais (20:1).

A mistura do PDMS com o agente de cura cria algumas bolhas na sua solução que são indesejáveis. Estas bolhas têm de ser removidas, caso contrário iria influenciar a visualização microscópica do escoamento de fluidos. Posteriormente, de forma a solucionar o problema, utilizou-se uma bomba de vácuo para a remoção das bolhas que se encontravam nas duas soluções de PDMS. Na Figura 21 é apresentado o equipamento utilizado (bomba de vácuo e exsicador).

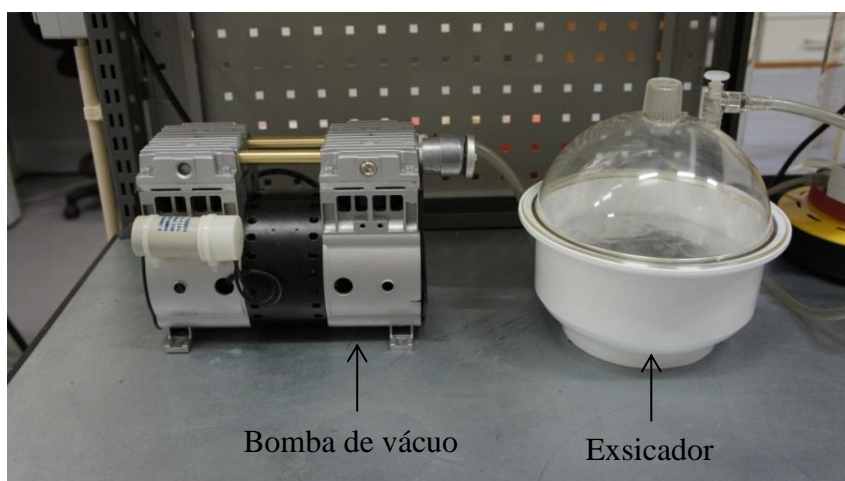


Figura 21: Bomba de vácuo e exsicador utilizado para remover as bolhas de ar presentes na mistura de PDMS.

Depois de removidas as bolhas de ar na mistura de PDMS com a razão de 10/1, esta seria colocada numa caixa de petri onde já teria sido colocada a geometria. Na Figura 22 podemos observar a deposição do PDMS na caixa de petri onde já teria sido colocada a geometria. O PDMS é um polímero que é possível acelerar o processo de cura com acção da temperatura. Assim de forma a acelerar o processo, colocou-se a mistura a 80°C numa estufa durante 20 minutos. Na Figura 22 podemos observar a estufa utilizada para acelerar o processo de cura.

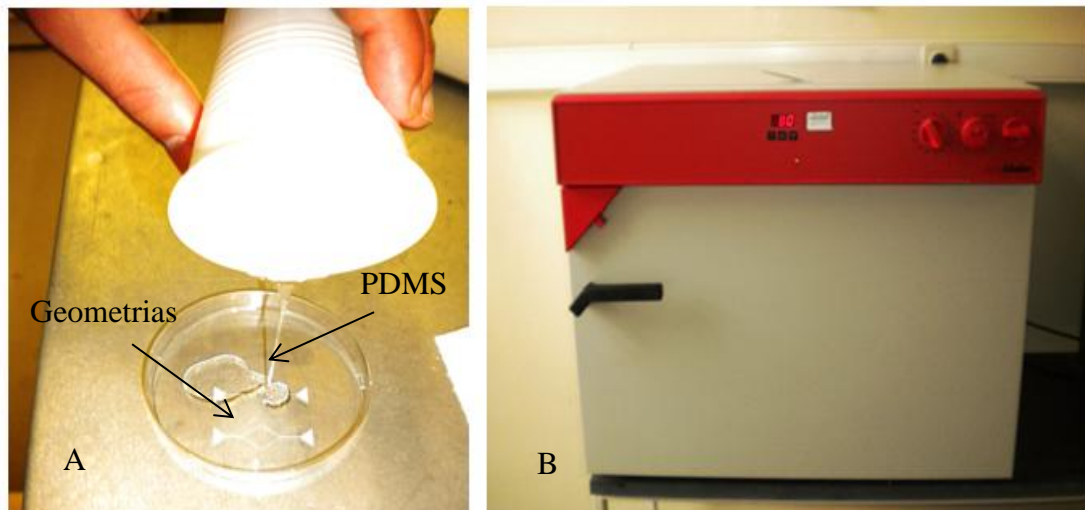


Figura 22: A - Deposição do PDMS no molde que possui geometria dos microcanais; B - Estufa utilizada para a acelerar processo de cura.

O processo de selagem dos microcanais normalmente recorre-se a lamelas de vidro. Estas são transparentes, tornando assim possível visualizar os fenómenos de escoamento de forma clara e nítida. Para se efectuar a selagem dos microcanais, é utilizada uma mistura de 20/1 de PDMS com agente de cura. São depositadas algumas gotas desta mistura na lâmina e posteriormente com o auxílio de um *spin coater*, esta é espalhada de forma uniforme por toda a sua superfície. Na Figura 23 é apresentado o *spin coater* (*VTC-100 Vacuum Spin Coater*) utilizado para a realização deste trabalho. O programa utilizado no *spin coater* para se espalhar o PDMS sobre a lâmina foi: 1º - 60 segundos a 3000 rotações por minuto; 2º - 60 segundos a 4000 rotações por minuto.



Figura 23: *Spin coater* utilizado para o espalhamento de PDMS nas lâminas utilizadas para selar os microcanais.

O *spin coater* atrás apresentado era especializado para lâminas comercializadas pela empresa que vendeu o equipamento. Foi necessário efectuar algumas adaptações para que fosse possível utilizarem-se todos os tipos de lâminas. Quando não se utilizavam as lâminas recomendadas pelo fornecedor do equipamento, existiam fugas na sucção da bomba de vácuo e as laminas não aderiam completamente ao prato giratório. Por forma a solucionar o problema, foi recortado um disco de acetato com um pequeno orifício. O disco iria permitir que a zona de contacto entre as lâminas e o prato giratório fosse mais pequena. A sucção da bomba seria apenas efectuada sobre a lâmina, permitindo a sua ficção completa. Em seguida na Figura 24 é apresentado o prato giratório e o disco utilizado para solucionar o problema.

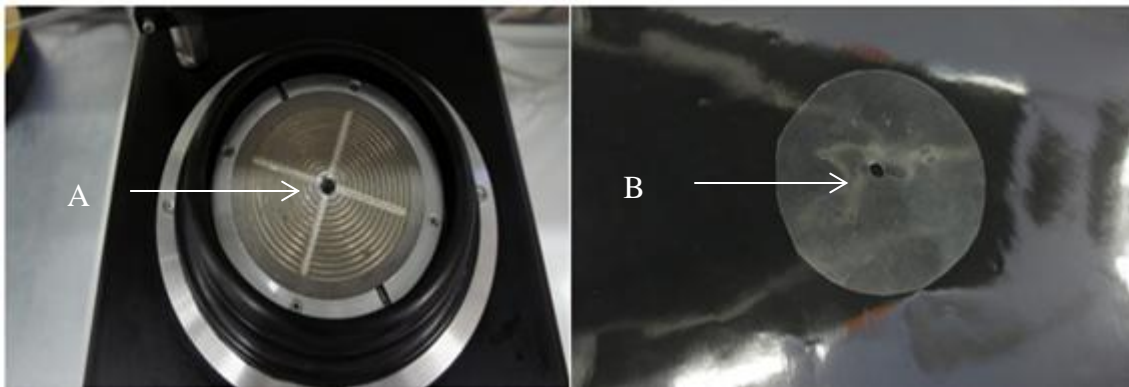


Figura 24: A - Disco giratório do spin coater; B - Disco fabricado em acetato de forma a solucionar o problema.

Foram efectuados testes com lâminas de diversos tamanhos e geometrias (serão mais à frente explicados detalhadamente), avaliando as que permitiam captar imagens com melhor qualidade. Na Figura 25 são apresentadas as lâminas utilizadas neste trabalho. A menor espessura facilitava a adesão no *spin coater* mas também possibilitava uma melhor visualização microscópica.

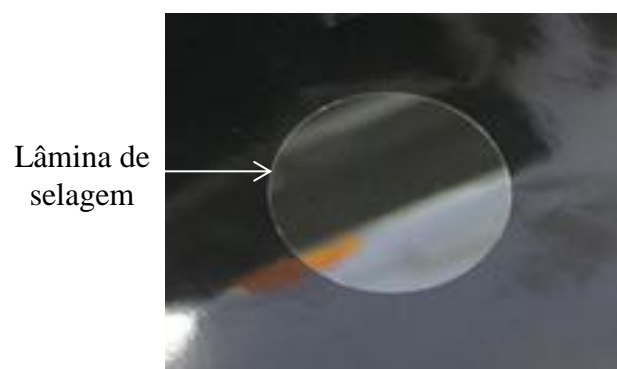


Figura 25: Lâmina utilizada para efectuar a selagem dos microcanais.

Da mesma forma que se procedeu anteriormente à cura do PDMS no molde, a lâmina onde se depositou o PDMS para a selagem, terá de ser inserida na estufa a 80°C durante 20 minutos.

No final dos 20 minutos o molde e a lâmina são retirados da estufa. Ao molde retiram-se os microcanais em PDMS e são efectuados furos de entrada e saída de fluidos. Posteriormente os microcanais são colocados sobre a lâmina e é efectuando assim a selagem, como podemos observar na Figura 26. Por fim os microcanais são colocados na estufa a 80°C por mais 24h para que ocorra a adesão dos materiais e a cura completa do PDMS

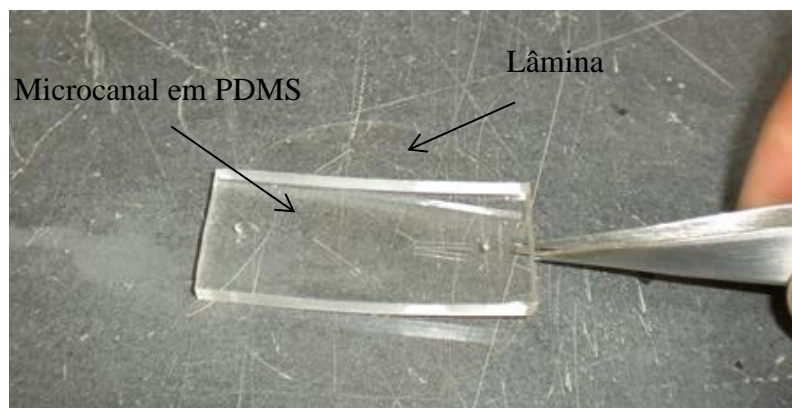


Figura 26: Selagem de microcanal de 500µm.

No final do processo de fabricação é calculado o erro da fabricação dos microcanais. Foram recolhidos dados dos moldes produzidos e dados dos microcanais, que serão posteriormente apresentados neste projecto. De forma a calcular o erro que o microcanal produzida em comparação com a geometria teórica utilizou-se a seguinte equação:

$$E_{Fab}(\%) = \left[\frac{\frac{1}{N} \times \sum_{i=1}^N (L_R - L_T)}{\frac{1}{N} \times \sum_{i=1}^N L_T} \right] \times 100$$

onde N é o numero das secções do microcanal em estudo, L_R é a largura do microcanal produzido e L_T é a largura do microcanal teórico.

3.1.1.1. *Plotter Secabo Mini*

Como já foi referido anteriormente, foram utilizadas 3 plotters de corte para efectuar o recorte do molde para a produção dos microcanais. Era importante avaliar precisão de corte do equipamento no processo de microfabricação. Inicialmente utilizou-se uma *plotter Secabo Mini* com o objectivo de se efectuarem testes preliminares e validar a metodologia utilizada. Na Figura 27 podemos observar a *plotter Secabo Mini* utilizada para se efectuarem os testes preliminares. Na *plotter secabo mini* foram também utilizados todos os tipos de materiais disponíveis (essencialmente vinis e papel aderente). Foram também efectuados testes com as lâminas de corte que o equipamento dispunha e verificado quais ofereciam melhor qualidade de corte. A *plotter* não possuía software especializado na interface informática com o equipamento mecânico e não possui um display digital que permitisse ajustar parâmetros como a velocidade e a pressão de corte. Foi utilizado o *coreldraw* como *software* de interface, permitindo o corte das geometrias com o equipamento.



Figura 27: Plotter de corte *Secabo Mini*.

Os materiais utilizados que foram já referidos neste trabalho, eram bastante diferentes na sua composição, na sua cor e sobretudo diferentes na compatibilidade que estes possuíam quando estavam em contacto com o PDMS. Desta forma, foram colocadas diversas geometrias recortadas com os diferentes tipos de materiais disponíveis, em contacto com PDMS de forma a verificar quais apresentavam melhor compatibilidade. Foram também considerados factores como o tempo e a temperatura

de cura. Foram efectuados testes com o processo de cura a 80° durante duas hora e meia e à temperatura ambiente para todos os materiais. Na Figura 28 são apresentados apenas alguns dos materiais que foram colocados a curar juntamente com o PDMS de forma a avaliar a sua compatibilidade.

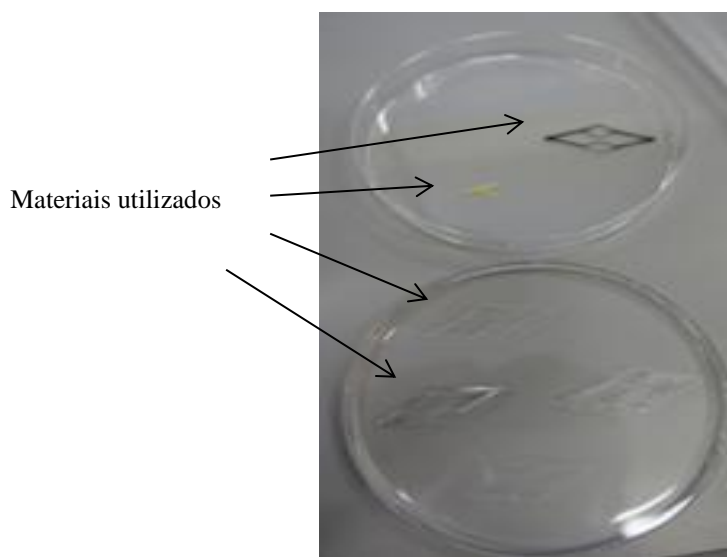


Figura 28: Materiais utilizados para avaliação da compatibilidade com o PDMS durante o processo de cura.

Depois de efectuada a validação do material, iniciou-se o recorte das geometrias com a plotter *secabo mini* com a velocidade mínima de corte que esta dispunha e com uma lâmina de maior precisão. As geometrias foram desenhadas em *AutoCAD* como já foi referido anteriormente e foi utilizado o *coreldraw* como *software* de corte. Depois de recordadas, utilizou-se uma pinça de pontas para remoção de material em excesso. Em seguida foi utilizado um papel de transporte para passar a geometria para uma caixa de petri, que iria funcionar como reservatório para a deposição do PDMS. O papel de passagem permitiu não só facilitar o processo, mas sobre tudo permitiu que toda a geometria (especialmente o angulo das bifurcações e confluências) possuísse todas as informações que lhe foram atribuídas no formato informático. As etapas anteriores de recorte e de passagem da geometria para caixa de petri, foram utilizadas para todos os materiais de corte disponíveis. Posteriormente à passagem das geometrias para caixas de petri, foi produzido PDMS na razão de 10/1 e foram utilizados dois métodos distintos de cura: 80°C durante duas horas e meia; e à temperatura ambiente durante 2 dias. No final da cura foram removidas do molde como podemos observar na Figura 29.

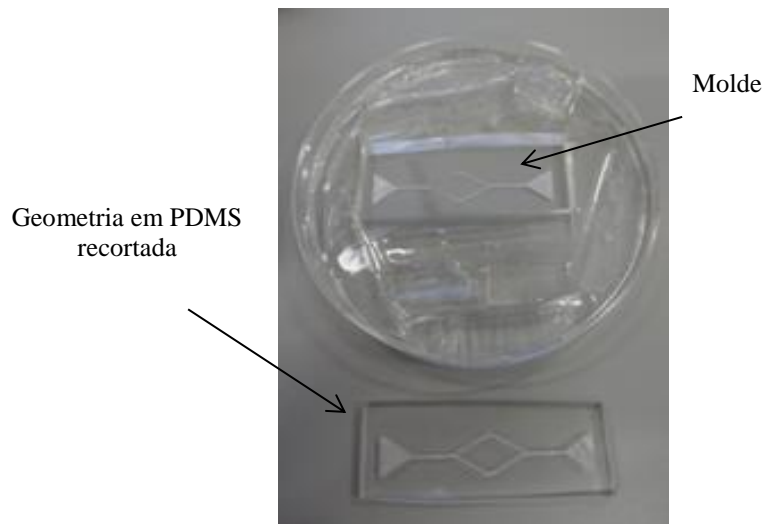


Figura 29: Recorte da geometria e recolha do PDMS que possui o microcanal.

Depois de removidas as geometrias foi observado se o PDMS curou, se era fácil a remoção das geometrias e a qualidade que estas adquiriam com a variação do material e a com o processo de cura. Se o molde não tivesse sofrido qualquer dano estrutural, este poderia ser utilizado para uma nova tentativa. Na Figura 30 podemos observar um molde obtido durante os testes efectuados (geometria colocada com PDMS a curar a 80°C durante duas horas e meia, recortada na plotter *Secabo Mini*).

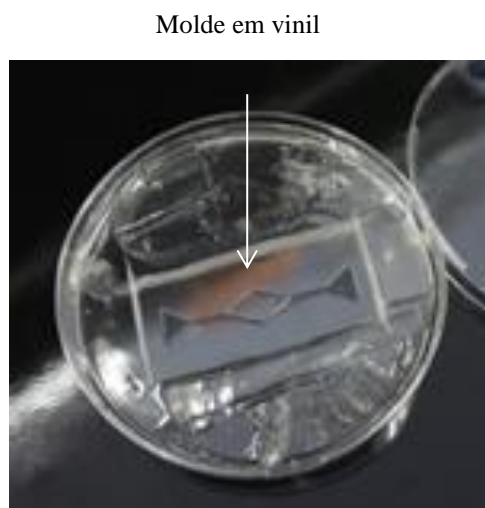


Figura 30: Molde da geometria em vinil, depois de removido o PDMS que possuía o microcanal.

Alguns dos matérias que pretendíamos testar não nos permitiam utilizar a metodologia referida anteriormente. Alguns dos materiais não possuíam parte adesiva, tornando impossível efectuar a sua colagem na caixa de petri. De forma a solucionar o problema utilizou-se uma fita-cola que possuía adesão nas suas duas faces. Uma das

faces era utilizada para aderir à geometria e outra iria efectuar o contacto com a caixa de petri, como podemos observar na Figura 31.

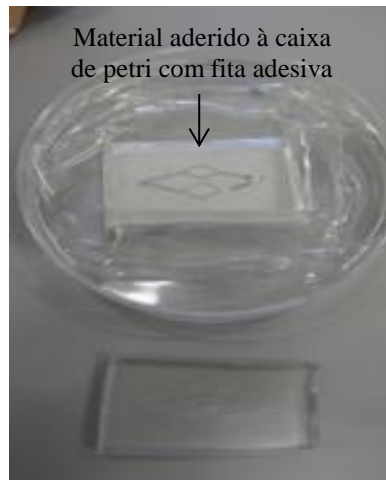


Figura 31: Utilização de fita adesiva para solucionar problema com a colagem do papel.

Alguns dos moldes utilizados não permitiu a cura adequada do PDMS. Isso foi verificado nas zonas de contacto com os moldes de alguns materiais. Procurou-se solucionar o problema, efectuando a cura do PDMS a temperaturas mais elevadas. Como as placas de petri eram de plástico e estas não suportam temperaturas muito superiores a 80°C, a alternativa encontrada foi a apresentada na Figura 32. Utilizou-se um reservatório em alumínio onde se colou o molde e o PDMS. Foi assim efectuada a cura do PDMS a 150°C durante 10 minutos.

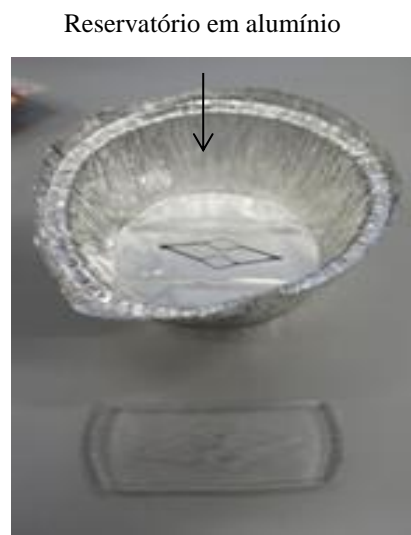


Figura 32: Reservatório em alumínio com o objectivo de solucionar o problema de cura de PDMS nas zonas de contacto com alguns moldes.

Neste trabalho foi também testado o acetato como material para fabricação de molde. A principal vantagem deste material é a possibilidade de este ser adquirido com várias espessuras. Isto iria permitir que fossem fabricados microcanais de diferentes alturas. Foi assim recortado com a plotter acetatos de diferentes espessuras e colocou-se na caixa de petri com PDMS. Na Figura 33 podemos observar o molde em acetato e o microcanal produzido.

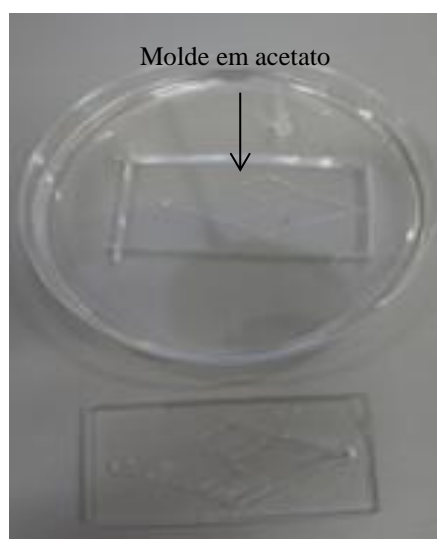


Figura 33: Na parte superior da imagem encontra-se o molde do acetato e na inferior o respectivo microcanal produzido.

Depois de analisados os materiais, apesar de se verificarem algumas incompatibilidades e dificuldades na produção dos moldes com o recorte das geometrias, alguns vinis eram compatíveis com o processo de cura. Estes possibilitavam o recorte das geometrias com as lâminas da plotter de corte com boa qualidade, possuíam na parte posterior cola adesiva que permitia a colagem na caixa de petri de forma eficaz e eram totalmente compatíveis com a cura do PDMS.

O vinil KEMICA TECMARK serie 3000 de cor branca apresentado na Figura 34 foi o que apresentou melhores resultados ao longo dos testes efectuados, assim sendo foi o material utilizado para a fabricação dos moldes.

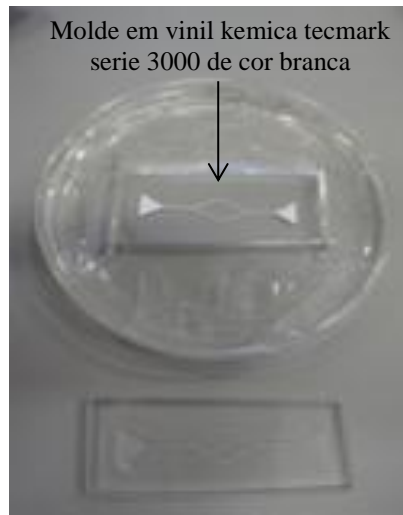


Figura 34: Vinil Tekmark colado na caixa de petri que funcionou como molde para produção do microcanal da imagem.

3.1.1.2. *Plotter Jaguar II*

A plotter *Jaguar II* é um equipamento mais avançado comparativamente com o que foi utilizado anteriormente. Possui um display de interface com o utilizador no qual podem ser seleccionados diversos parâmetros como a velocidade de corte, a força aplicada sobre o material, seleccionar o local do rolo onde pretendemos cortar a geometria, entre outros parâmetros. É um equipamento que possui uma resolução mecânica de $6,25\mu\text{m}$ e permite seleccionar velocidades reduzidas de corte (velocidade mínima de 3cm/s). Juntamente com o equipamento mecânico existe um *software* de interface com o utilizador (*GreatCut*) que permite igualmente alterar os parâmetros de corte. É possível também manipular o desenho da geometria de várias formas (esticar, encolher, multiplicar, entre outros). Na Figura 35 podemos observar a *plotter* de corte *Jaguar II* associada a um computador que possui o *software* de interface.

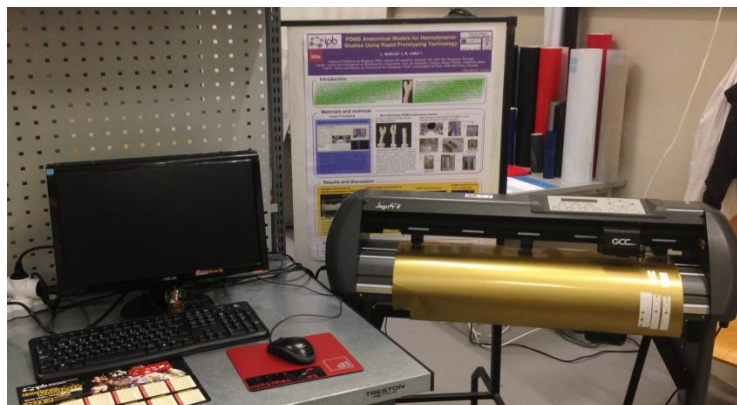


Figura 35: Equipamento utilizado para corte das geometrias para fabricação do molde.

Para o corte das geometrias foram considerados os desenhos *CAD* já apresentados neste trabalho, mas foram também efectuados testes para a obtenção de geometrias de menor tamanho de forma a avaliar os limites de corte da plotter *Jaguar II*. Para a avaliação dos limites do equipamento foi considerado a qualidade das geometrias e sobretudo se era possível o transporte destas para a caixa de petri sem existir rotura de material. Foram considerados como parâmetros adequados para o corte do vinil, a velocidade mínima de 3cm/s, uma pressão de 80g e uma lâmina de *offset* =0,175mm.

Da mesma forma que se procedeu com a plotter *Secabo Mini*, recortaram-se as geometrias com a plotter *Jaguar II*. Posteriormente com o auxílio de papel de transporte foram coladas em caixas de petri como podemos observar na Figura 36.

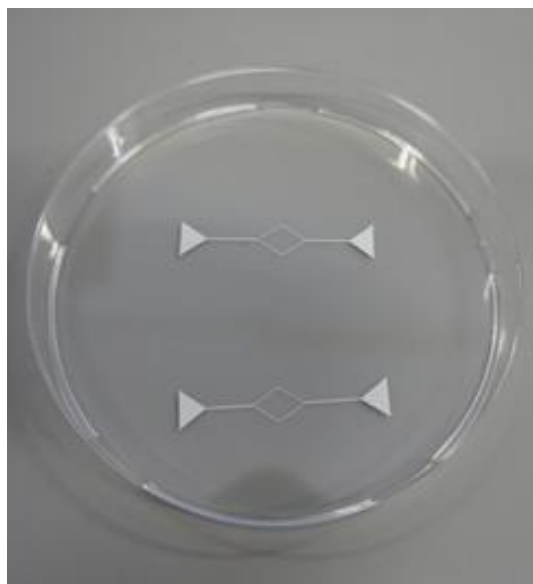


Figura 36: Moldes de geometria recortadas com plotter *Jaguar II*, colocadas numa caixa de petri.

Depois foi depositado o PDMS com razão de 10/1 no molde este foi colocado numa estufa a 80°C durante 20 minutos. Foi colocada uma lâmina no *spin coater* com algumas gotas de PDMS com uma de razão de 20/1 e posteriormente foi colocada igualmente na estufa a 80°C durante 20 minutos. No final dos 20 minutos foi recortado o PDMS que possuía os microcanais (Figura 37), efectuados os furos de entrada e saída de fluidos e a respectiva selagem dos microcanais.

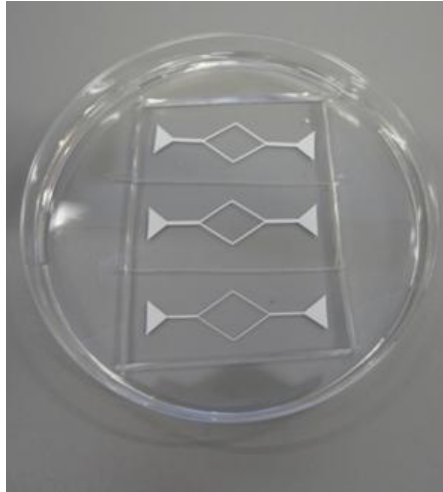


Figura 37: Molde dos microcanais no final dos 20 minutos na estufa a 80°C e depois de removidos os microcanais no PDMS.

Relativamente à etapa de selagem dos microcanais também foram efectuados testes de forma a melhorar a visualização em microscópio, mas também tentar diminuir os custos de fabricação. Foram testados 3 tipos de materiais para selagem, as lâminas de microscópio de 1,2mm, as lâminas de 0,4mm e lâminas em acetato.

Utilizou-se o *spin coater* para efectuar o espalhamento uniforme de PDMS com a razão de 20/1 sobre as diferentes lâminas. Para as 3 lâminas foi utilizado o mesmo processo de cura, colocadas durante 20 minutos a 80°C numa estufa. Posteriormente era efectuada a selagem de microcanais com as 3 diferentes lâminas. No fim eram colocadas 24h a 80°C para ocorrer a adesão do PDMS da lâmina com o PDMS do microcanal. Na Figura 38, Figura 39 e Figura 40 podemos observar as várias opções testadas para efectuar a selagem de microcanais.

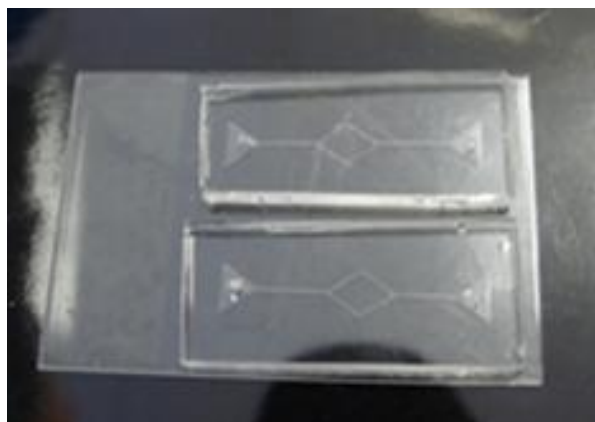


Figura 38: Microcanais selados com lâmina de 1,2mm de espessura.

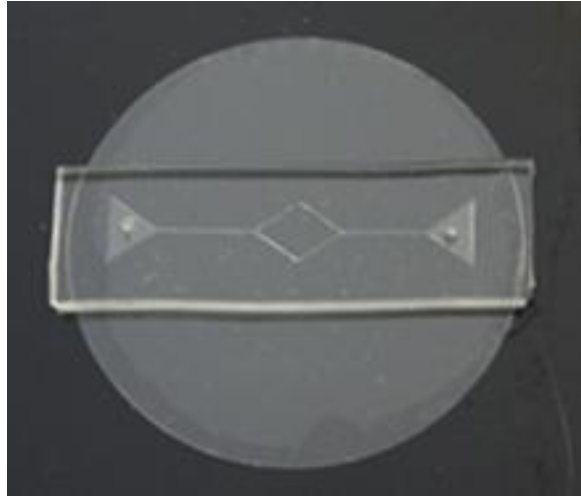


Figura 39: Microcanal selado com lâmina de 0,4mm de espessura.

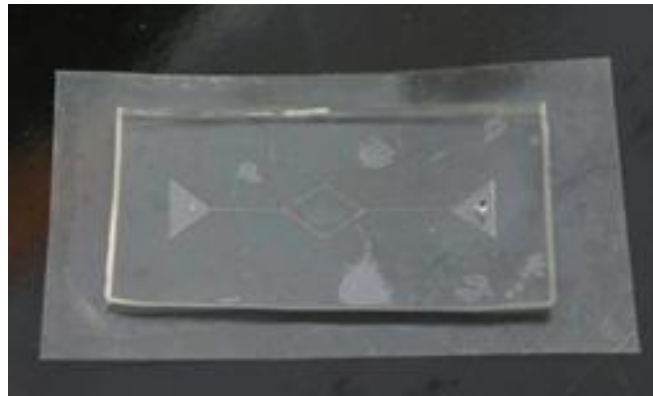


Figura 40: Microcanal selado em acetato.

3.1.1.3. *Plotter Rolland*

Depois de observados os resultados obtidos com a utilização das duas *plotters* anteriores, contactou-se uma empresa de artes gráficas que possuía uma *plotter Rolland GX* com uma precisão mecânica de $4,5\mu\text{m}$. Considerando que o equipamento possuía melhor resolução mecânica que os casos anteriores, o objectivo era obter o corte de microcanais com menores dimensões para a produção do molde. Em seguida seria avaliada a qualidade dos microcanais obtidos. Posteriormente seria efectuado o procedimento já anteriormente referido para a produção dos microcanais em PDMS. Na Figura 41 podemos observar o molde do microcanal recortado na *plotter Rolland*.

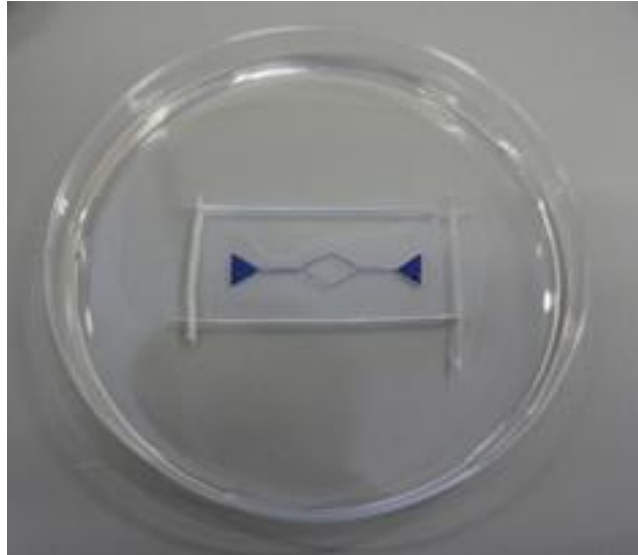


Figura 41: Molde com microcanal produzido na plotter de corte *Rolland*.

3.1.2. Apresentação e Discussão dos Resultados

O método utilizado para a fabricação de microcanais neste trabalho, foi testado em microcanais de diversas larguras. O objectivo relativo à fabricação passava por produzir-se microcanais com bifurcações no qual cada ramificação seria 50% menor que o canal que lhes deu origem, ou seja, o canal principal. Foi utilizada uma metodologia conhecida por xurografia que utiliza uma plotter de corte e diversos materiais usualmente utilizados na indústria das artes gráficas para a produção de moldes.

Considerando que é uma técnica ainda muito pouco utilizada na área da microfabricação, foram efectuados diversos testes para escolher os parâmetros de corte que melhor se adaptavam para os diferentes materiais. Também foi necessário verificar qual dos materiais oferecia melhores condições para a produção do molde e quais ofereciam melhor compatibilidade com o PDMS. Estas condições foram fundamentais para se poder produzir um molde para deposição do PDMS e consequentemente este adquirir a forma da geometria.

Ao longo deste tópico iremos apresentar os resultados obtidos no processo de fabricação do molde. Serão abordados temas como o comportamento do material em contacto com o PDMS e a qualidade dos materiais quando sujeitos ao corte das plotters para as diferentes geometrias. Serão apresentados os resultados obtidos na fabricação dos microcanais em PDMS, onde será feita uma análise detalhada da qualidade que estes apresentavam para os diferentes tamanhos das geometrias.

Como já foi referido ao longo do trabalho, existiram diversos materiais que não foram fáceis de manipular para a produção dos microcanais. Em diversos casos o PDMS em contacto com os materiais não permitia que ocorresse a cura. Alguns dos materiais não possuíam parte adesiva o que dificultava a produção do molde. As técnicas utilizadas para a fixação do material à caixa de petri possibilitaram a sua adesão porém a qualidade do molde produzido não era satisfatória.

Na Tabela 1 é apresentado um quadro resumo dos resultados obtidos com os testes efectuados com diferentes materiais.

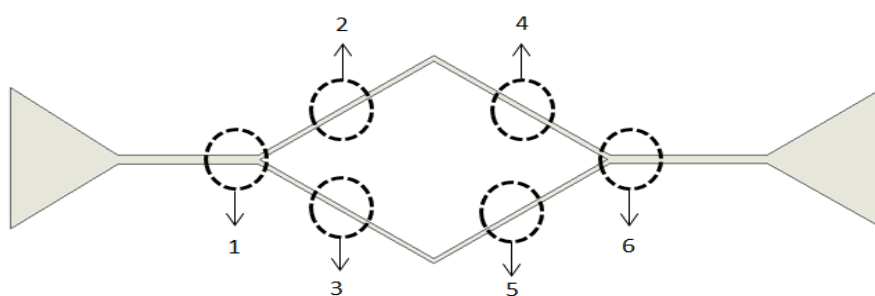
Tabela 1: Materiais e equipamentos testados na fabricação dos moldes dos microcanais. Apresentação de resultados obtidos e considerações alusivas à utilização dos materiais e equipamentos.

Nome	Marca	Serie	Cor	Adesivo	Espessura (mm)	Plotters Utilizadas	Força de corte (g)	Cura do PDMS	Observações
Vinil	KEMICA TECMARK	Serie 3000	Branco	Sim	90	Secabo Mini; Jaguar II	70	Sim	Boa compatibilidade com o PDMS e possuía bom acabamento.
Vinil	KEMICA TECMARK	Serie 3000	Vermelho brilhante	Sim	90	Jaguar II	70	Não	Permite bons detalhes de corte, mas não permite a cura do PDMS.
Vinil	KEMICA TECMARK	Serie 3000	Preto brilhante	Sim	90	Secabo Mini; Jaguar II	70	Não	
Vinil	METAMA RK	4 Series	Preto brilhante	Sim	85	Secabo Mini; Jaguar II	80	Não	Bom acabamento mas não permite a cura do PDMS.
Vinil	METAMA RK	E Series	Preto fosco	Sim	85	Secabo Mini; Jaguar II	80	Não	Apresentava rugosidade e não permite a cura do PDMS.
Vinil	LG Hausys	HI-CAL	Vermelho brilhante	Sim	*	Rolland; Jaguar II	70	Não	Bom acabamento mas não permite a cura do PDMS.
Vinil	LG Hausys	HI-CAL	Azul brilhante	Sim		Rolland; Jaguar II	70	Não	
Vinil	Avery graphics	400 Permanent	Branco	Sim		Secabo Mini; Jaguar II	80	Não	
Etiquetas multiusos	Staples	A4	Branca	Sim	*	Secabo Mini	*	Sim	Permite a cura do PDMS, mas ocorre transporte de fibras do material para o PDMS.
Etiquetas multiusos	Avery	3473	Amarela	Sim		Secabo Mini		Sim	
Vinil	Hexis	*	Vermelho	Sim	100	Jaguar II	80	Não	Não apresenta rugosidade, bons detalhes de corte, mas não permite a cura do PDMS.
Vinil	Hexis		Cinzentos	Sim		Jaguar II	80	Não	
Vinil	Hexis		Verde	Sim		Jaguar II	80	Não	
Vinil	Hexis		Dourado	Sim		Jaguar II	80	Sim	Boa compatibilidade com o PDMS e permite bom detalhe de corte.
Papel foto-sensível	*			Azul		Não	*	Secabo Mini	*
Vinil Flex	Fabriprint	Ref: 20	Cinzentos	Não	*	Secabo Mini	*	Sim	

* - Informação não disponível pelo fabricante/equipamento.

Verificou-se que grande parte dos materiais não podiam ser utilizados para a fabricação dos moldes dos microcanais. A inexistência de adesivo para efectuar a sua colagem na caixa de petri, a incompatibilidade com a cura do PDMS, o acabamento e a rugosidade do material, foram alguns dos factores que descartaram a utilização de alguns materiais. Relativamente à não ocorrência da cura do PDMS quando este está em contacto com alguns materiais, este fenómeno poderá ser justificado pelas propriedades químicas que estes poderão possuir.

O material que apresentou melhores condições para se produzir um molde com bom acabamento para a produção de microcanais em PDMS, foi o vinil KEMICA TECMARK serie 3000 de cor branca. Para este material, foi efectuada uma análise mais detalhada das diferentes etapas de fabricação de forma a investigar quais os processos que introduziam maior percentagem de erros. Recolheram-se diversas imagens microscópicas dos moldes produzidos e dos microcanais produzidos. Na Figura 42 podemos observar uma representação esquemática das secções das geometrias onde foram recolhidas as imagens microscópicas.



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

Figura 42: Representação esquemática da geometria do microcanal e localização das secções onde foram recolhidas as imagens para obtenção dos valores da largura do molde e do microcanal.

Nas Figuras 43, 44 e 45 são apresentados sob a forma gráfica os resultados obtidos referentes à largura dos diferentes microcanais nas secções já identificadas. Os resultados foram obtidos com o auxílio do *ImageJ* e foi calculada uma média dos valores da largura dos moldes e dos microcanais produzidos de forma a simplificar a comparação dos resultados. São também apresentados os valores teóricos obtidos do ficheiro informático CAD da geometria, permitindo efectuar uma comparação. Em seguida na Figura 43 são apresentados os resultados obtidos referentes às geometrias A, geometria com largura do canal principal de 300 μ m.

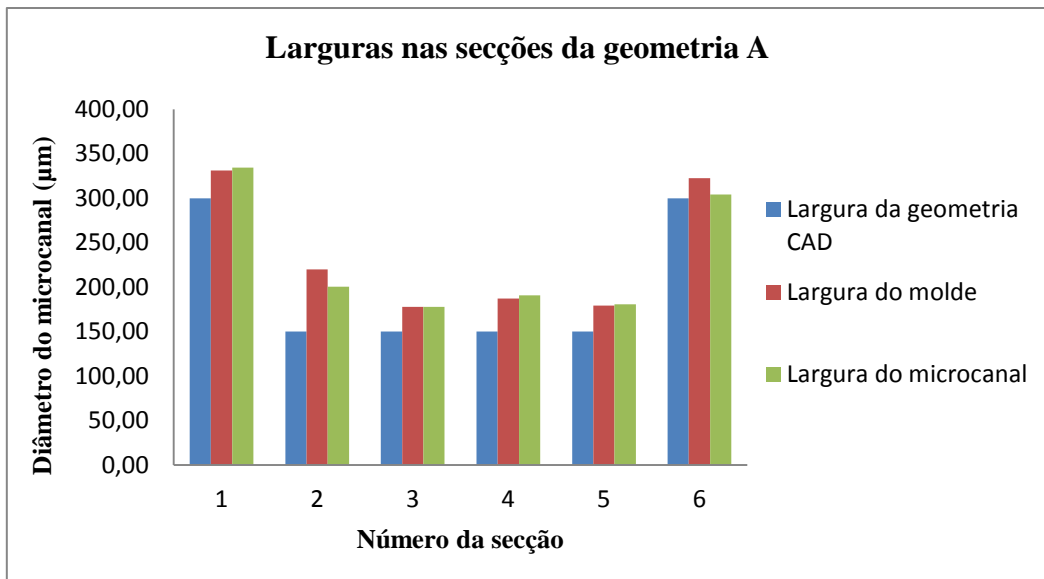


Figura 43: Comparação dos valores teóricos da geometria com largura do canal principal de 300µm com os moldes produzido com a plotter *Jaguar II* e os respectivos microcanaís fabricados.

Podemos verificar pelos resultados obtidos para a geometria com canal principal de 300µm (observar Figura 43), que existe alguma discrepância de valores dos resultados obtidos na produção do molde e do microcanal, comparativamente com os valores teóricos.

Verifica-se de uma forma geral que o molde produzido com a utilização da plotter de corte *Jaguar II*, possui dimensões superiores aos pretendidos. Relativamente as secções 2, 3, 4 e 5, estas secções deveriam possuir a mesma largura do molde, porém verifica-se uma alteração de sensivelmente 20µm entre o valor mais elevado e o valor mais baixo. A discrepância entre os valores obtidos e os teóricos poderá ser justificada pela capacidade de precisão do equipamento utilizado. Considerando que a geometria possui dimensões muito pequenas, seria de esperar que existisse alguma disparidade de valores.

Os microcanaís produzidos de um modo geral possuíam a mesma disparidade de valores que se observava na produção dos moldes. Na secção 6 os valores obtidos são próximos dos esperados, por sua vez na secção 2 existe um desvio de sensivelmente 50µm comparativamente com os valores teóricos. As secções 2 e 3 teoricamente deveriam ser duas ramificações simétricas da bifurcação lhes deu origem, porém verifica-se que existe uma assimetria. Esta assimetria deve-se à precisão que o equipamento possui para produzir microcanaís com a mesma largura.

Em termos gerais os microcanais produzidos possuem uma largura média superior aos moldes que lhe deram origem. Analisa-se também que existe uma discrepância média mínima de $4\mu\text{m}$ e máxima de $50\mu\text{m}$ entre o molde produzido e o microcanal final. O erro da diferença entre o valor teórico projectado em *AutoCAD* e o valor real do microcanal corresponde a 15,7%.

Na Figura 44 são apresentados os resultados obtidos referentes aos moldes e aos microcanais alusivos à geometria B, geometria com largura do canal principal de $500\mu\text{m}$.

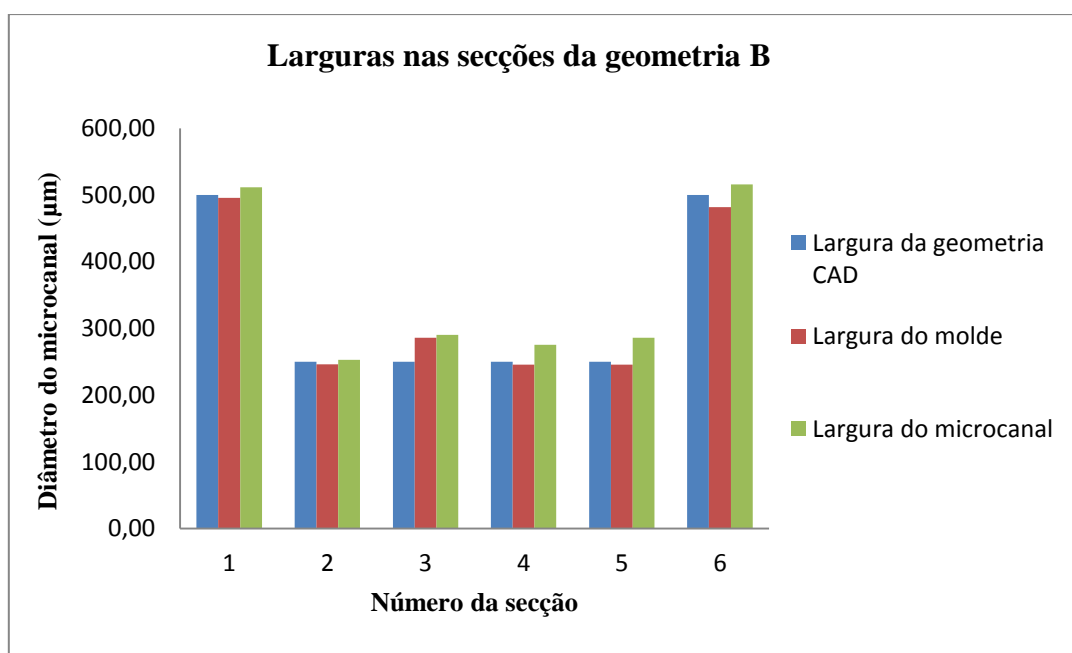


Figura 44: Comparação dos valores teóricos da geometria com canal principal de $500\mu\text{m}$ com os moldes produzidos com a plotter *Jaguar II* e os respectivos microcanais fabricados.

Verifica-se da mesma forma que ocorreu no caso anterior, que existe alguma discrepância entre os valores teóricos e os resultados obtidos na produção dos moldes e dos respectivos microcanais. Porém a diferença existente é inferior comparativamente com a geometria analisada anteriormente.

No que diz respeito aos moldes produzidos, a secção 1, 2, 4 e 5 apresentam valores muito próximos dos esperados, por sua vez as secções 3 e 6 apresentam variações significativas. Nos moldes da geometria A, todas as secções possuem valores médios inferiores aos valores teóricos, com excepção da secção 3 que possuía um desvio positivo de sensivelmente $30\mu\text{m}$. As secções 2, 3, 4 e 5 deveriam possuir os mesmos valores de largura (valor teórico de $250\mu\text{m}$), porém tal não ocorreu. Verificou-se que a

secção 2 apresenta um desvio insignificante, por sua vez as restantes ramificações possuem valores relativamente discrepantes relativamente com os esperados.

Relativamente aos microcanais produzidos podemos analisar que todas as secções possuem uma largura superior ao valor teórico. As secções de entrada e de saída (secção 1 e 6) de fluidos juntamente com a secção 2, são as que mais se aproximam dos valores teóricos. As ramificações (secções 3, 4 e 5) possuem um desvio médio positivo entre os 3 e os 40 μ m. Da mesma forma que os casos anteriores, a secção 3 foi a que apresentou maior discrepância.

Verificasse de uma forma geral que os microcanais de 500 μ m fabricados possuem um ligeiro desvio de dimensões comparativamente com os valores teóricos esperados. O erro da diferença entre o valor teórico projectado em *AutoCAD* e o valor real do microcanal corresponde a 6,63%. A diminuição da percentagem de erro deriva do aumento do tamanho da geometria, facilitando assim o recorte do molde por parte do equipamento.

Em seguida na Figura 45 são apresentadas os resultados numéricos obtidos alusivos aos moldes e aos microcanais produzidos com o desenho da geometria C, geometria com largura do canal principal de 1000 μ m.

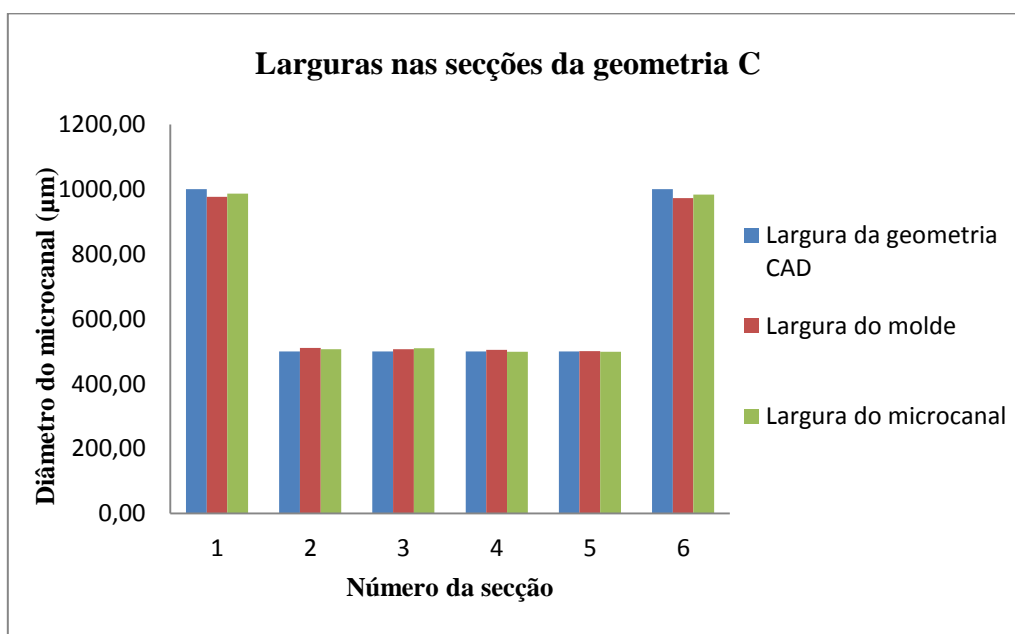


Figura 45: Comparação dos valores teóricos da geometria com canal principal de 1000 μ m com os moldes produzido com a plotter *Jaguar II* e os respectivos microcanais fabricados.

Comparativamente com os resultados anteriormente analisados, os moldes e os microcanais da geometria C possuem maior proximidade com os valores teóricos. Verifica-se alguma discrepância nas zonas de entrada e saída de fluidos (corresponde as secções 1 e 6), por sua vez as secções correspondentes as ramificações (secções 2, 3, 4 e 5) encontram-se próximas dos valores teóricos.

Relativamente aos moldes produzidos, a secção 6 é a que mais se distancia dos valores esperados (aproximadamente 28 μm), por outro lado a secção 5 possui um desvio médio de 1 μm , correspondendo à zona dos moldes que menor erro possui.

. Tal como se observou anteriormente o aumento da dimensão da geometria traduziu-se numa diminuição da percentagem de erro no processo de fabricação do molde por parte do equipamento e uma consequente diminuição de erro na fabricação dos microcanais. Em termos gerais o microcanal que apresentou um menor erro foi o de 1000 μm de canal principal, com 1,23%.

Na Figura 46 podemos observar as percentagens de erro obtidas no processo de fabricação dos microcanais para as três diferentes geometrias.

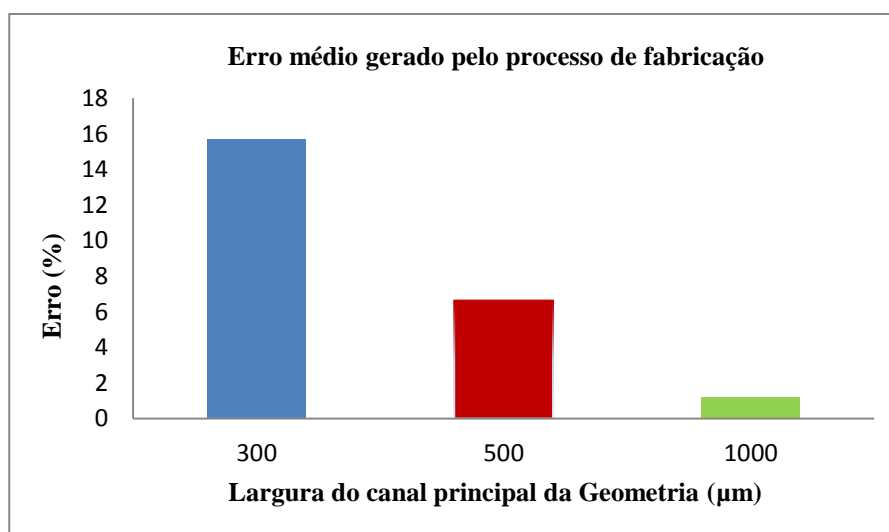


Figura 46: Percentagens de erro entre os microcanais produzidos e os valores teóricos esperados.

De forma geral verificou-se que com a diminuição da dimensão dos moldes produzidos, existia um aumento de discrepância de formas e detalhes comparativamente com o formato CAD. Estes factores verificam-se posteriormente na fabricação dos microcanais, tal como podemos observar na Figura 46 pela percentagem de erro obtida.

Verificou-se também que por vezes existia alguma diferença entre o molde e o microcanal final.

Em seguida são apresentados alguns moldes e microcanais em diferentes secções e iremos efectuar uma análise entre o molde e o microcanal de forma a comprovar o que foi referido anteriormente.

Na Figura 47 podemos observar um dos microcanais de 500 μ m produzidos na zona das bifurcações e o molde que lhe deu origem.

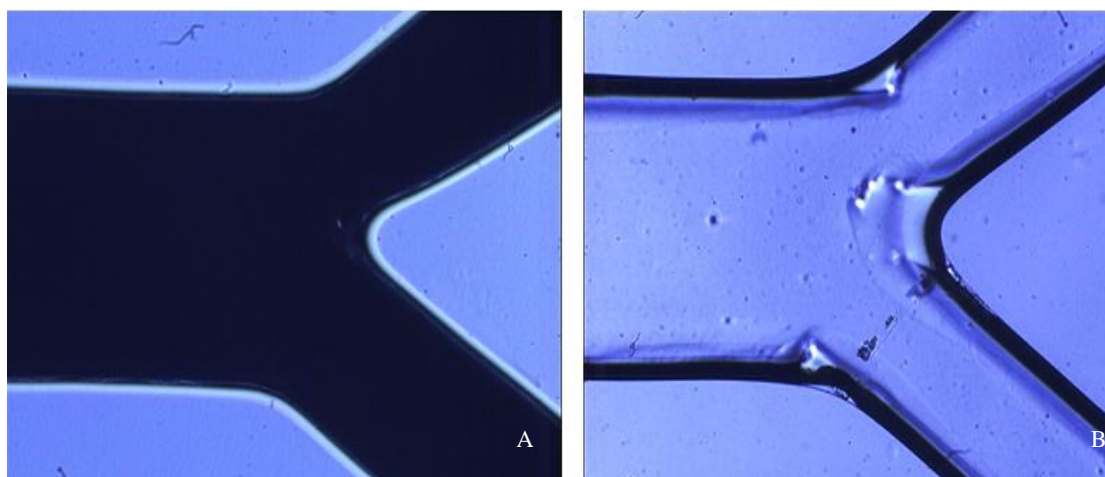


Figura 47: Imagens obtidas em microscópio invertido com objectiva de 10x: A- Molde produzido com a plotter *Jaguar II* da geometria com largura do canal principal de 500 μ m, na zona de bifurcação; B – Microcanal na zona de bifurcação da geometria B, fabricado com o molde apresentado em A.

Podemos observar que os microcanais e o molde possuem paredes regulares na zona de bifurcação. É possível também observar que durante o processo de fabricação do molde, ocorreu o arredondamento das arestas. A ocorrência deste fenómeno manifestou-se na produção dos microcanais com arestas arredondadas. Junto à zona de bifurcação do microcanal é possível analisar que existe alguma rugosidade. Este fenómeno ocorre na zona onde a plotter poderá ser menos precisa em efectuar o corte.

Foram comparados diversos moldes e microcanais na zona das ramificações e foi observado que quase todos apresentavam o mesmo perfil. Desta forma, será apresentado na Figura 48 um molde e um microcanal da secção 2, da geometria de 500 μ m de entrada.

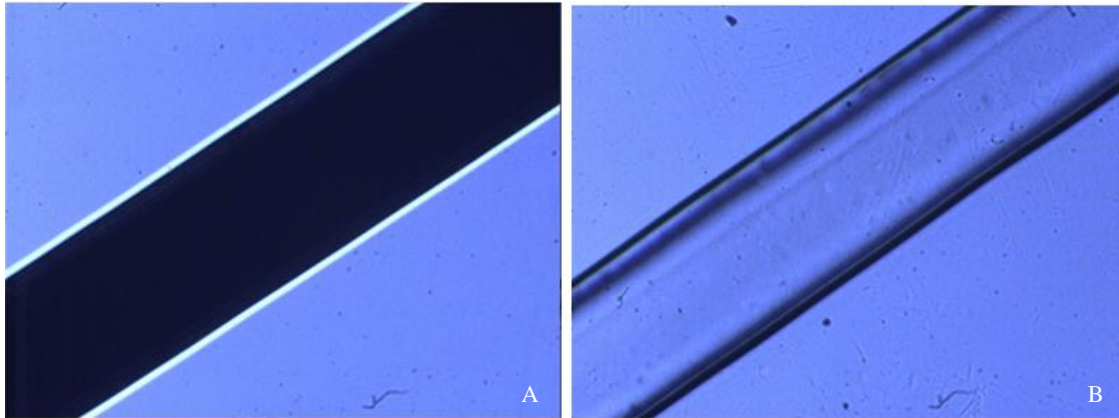


Figura 48: Imagens obtidas em microscópio invertido com objectiva de 10x: A- Molde produzido com a plotter *Jaguar II* da geometria com largura do canal principal de 500 μ m, na zona de ramificação (250 μ m de largura); B – Microcanal na zona de ramificação (250 μ m) da geometria B, fabricado com o molde apresentado em A.

Na Figura 48 podemos analisar que as paredes do molde são bastante regulares, por sua vez as paredes do microcanal possui ligeiras deformações. Relativamente as paredes dos microcanais é possível observarem-se duas linhas que acompanham ambas as paredes. Poderá significar que a parede não possui um perfil vertical, ou que poderá ter sido efectuada uma selagem imperfeita. É importante referir que o microcanal da Figura 48 possui 250 μ m, observando-se uma ligeira diminuição da qualidade do microcanal.

Posteriormente as ramificações unem-se formando uma confluência, como já foi referido ao longo deste trabalho. Desta forma, na Figura 49 podemos observar um molde e um microcanal da geometria B na zona de confluência.

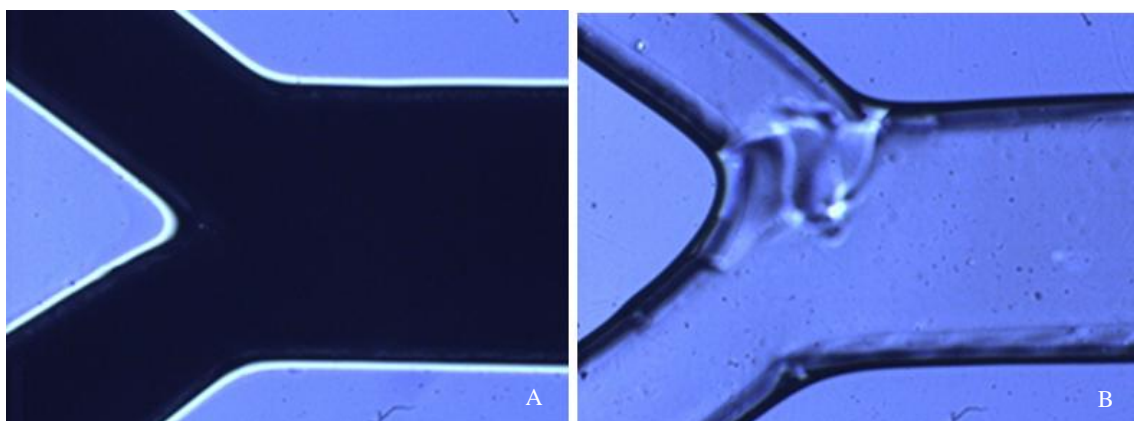


Figura 49: Imagens obtidas em microscópio invertido com objectiva de 10x: A- Molde produzido com a plotter *Jaguar II* da geometria com largura do canal principal de 500 μ m, na zona de confluência; B – Microcanal na zona de confluência da geometria com entrada de 500 μ m, fabricado com o molde apresentado em A.

Observa-se na Figura 49 que o molde possui paredes regulares, por sua vez o microcanal produzido possui algumas irregularidades. É possível verificar que ao longo da fabricação do molde ocorreu um ligeiro arredondamento das arestas, esse efeito foi acentuado na fabricação no microcanal na zona de confluência. É possível também examinar-se alguma rugosidade no microcanal na zona superior da confluência. Na parede inferior existe também uma ligeira rugosidade.

Na Figura 50 e 51 iremos apresentar as geometrias referentes ao microcanal de 300 e de 1000 μm na zona de confluência de forma a verificar a influência do tamanho do microcanal na qualidade de fabricação.

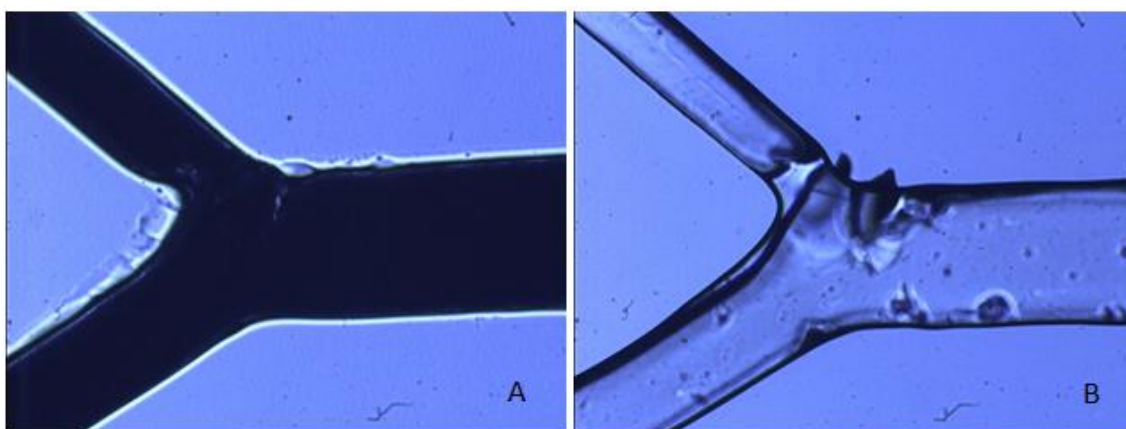


Figura 50: Imagens obtidas em microscópio invertido com objectiva de 20x: A- Molde produzido com a plotter *Jaguar II* da geometria com largura do canal principal de 300 μm , na zona de confluência; B – Microcanal na zona de confluência da geometria com entrada de 300 μm , fabricado com o molde apresentado em A.

Podemos verificar na Figura 50 que o microcanal de 300 μm na zona de confluência possui vários artefactos de fabricação. Pode-se observar diversas rugosidades no microcanal final. Analisa-se também na zona de confluência, as ramificações possuem assimetria. É possível averiguar que se produziram arestas arredondadas no processo de fabricação do molde, traduzindo-se no microcanal final.

Em seguida na Figura 51 podemos observar o molde e o microcanal de 1000 μm na zona de confluência.

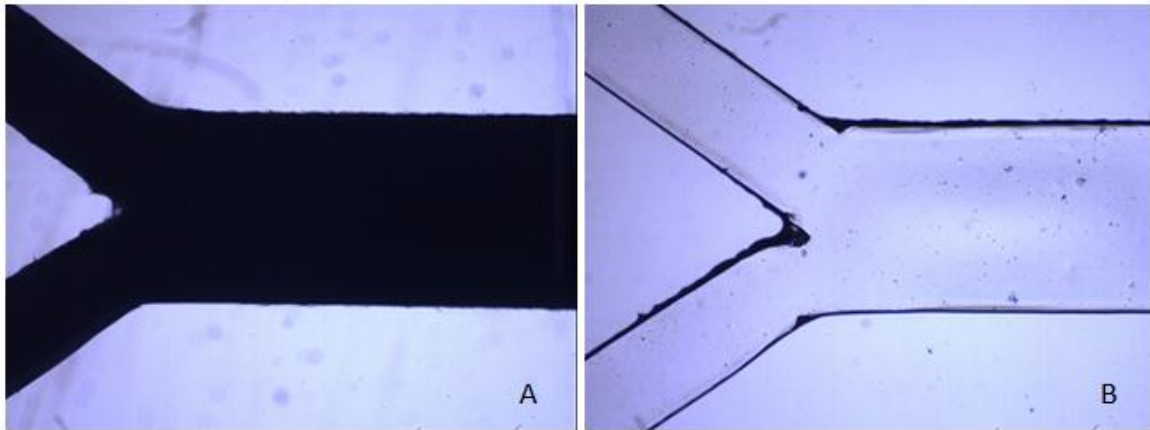


Figura 51: Imagens obtidas em microscópio invertido com objectiva de 4x: A- Molde produzido com a plotter *Jaguar II* da geometria com largura do canal principal de 1000 μ m, na zona de confluência; B – Microcanal na zona de confluência da geometria com entrada de 1000 μ m, fabricado com o molde apresentado em A.

Relativamente aos moldes e microcanais de 1000 μ m obteram-se arestas menos arredondadas comparativamente com os casos anteriores. É possível verificar que a zona de confluência possui muito melhor acabamento comparativamente com os outros microcanais fabricados. É importante também referir que os microcanais que originam a zona de confluência possuem aparentemente simetria.

Verificou-se claramente que a diminuição da dimensão dos microcanais traduzia-se numa diminuição clara da qualidade dos microcanais. Este facto está associado claramente à incapacidade do equipamento manter a qualidade do corte para geometrias de dimensões mais pequenas.

Considerando que foram utilizados diversos equipamentos para a fabricação do molde, era de todo interessante analisar a influência do equipamento no corte do molde. Na Figura 52 são apresentados cortes de perfil de dois microcanais com os dois equipamentos que disponhamos no laboratório, a plotter *Secabo Mini* e *Jaguar II*.

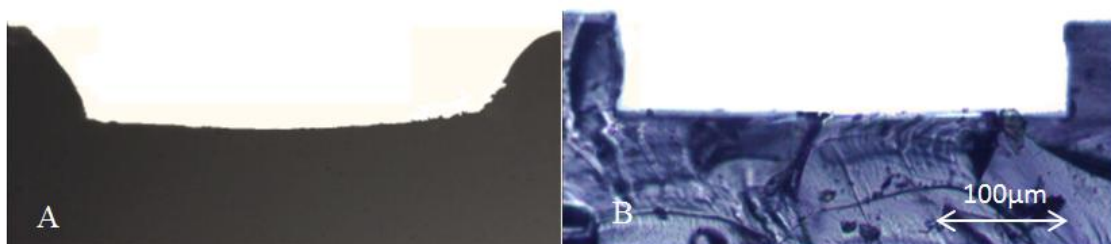


Figura 52: Cortes de perfil de microcanais da Geometria B com duas diferentes plotters de corte: A – Plotter *Secabo Mini*; B – Plotter *Jaguar II*.

Podemos observar pelos cortes de perfil dos microcanais, que os moldes produzidos com a plotter *Secabo Mini* geraram microcanais de paredes não rectas. Relativamente aos microcanais produzidos com a plotter *Jaguar II*, possuem nitidamente paredes rectas como era pretendido neste trabalho. É também possível analisar pelas imagens que a plotter *Jaguar II* possui maior precisão de corte. Este factor permite uma visualização microscópica das paredes do microcanal mais detalhada e consequentemente uma análise numérica num *software* informático pormenorizada e fiável.

Capítulo 4

4. Escoamento Sanguíneo em Microcanais

Neste capítulo serão apresentadas as metodologias e equipamentos utilizados para o estudo do escoamento sanguíneo no microcanais produzidos. Posteriormente serão apresentados e discutidos os resultados obtidos.

4.1.Procedimento Experimental

4.1.1. Materiais e Métodos

Para a realização do escoamento sanguíneo em bifurcações e respectivas confluências, recorreu-se aos microcanais em PDMS produzidos ao longo deste projecto. Com a utilização dos microcanais produzidos foi possível analisar os diferentes fenómenos associados ao escoamento sanguíneo em bifurcações. O sangue utilizado é de origem ovina, foi recolhido e colocado num tubo de ensaio com anticoagulante. Para a análise do escoamento foram consideradas 3 amostras de sangue (5%, 10% e 15% de hematócrito (Hct) em dextrano 40) de forma a observar a influência da variação da percentagem de Hct no escoamento sanguíneo em bifurcações.

Considerando que se pretendia analisar os fenómenos de escoamento sanguíneo em bifurcações e confluências nos microcanais produzidos, recorreu-se a diversos equipamentos disponíveis no laboratório. Foram utilizadas pipetas, micropipetas e tubos de ensaio para transporte e armazenamento do sangue. Utilizou-se uma centrifugadora para se efectuarem as lavagens do sangue de forma a removeu plasma, leucócitos e todos os constituintes celulares não desejados, utilizando apenas o Hct necessário para se efectuar a análise de escoamento. Recorreu-se também a uma bomba de seringa e a um microscópio invertido que estava associado com camara de alta velocidade. Esta montagem permitiu bombear o sangue para o interior dos microcanais, efectuar a visualização do escoamento no interior dos microcanais e captar filmes e imagens para posterior análise. O sangue foi bombeado com caudal de 5, 10 e 15 $\mu\text{L}/\text{min}$. Foram também efectuados testes complementares com outros caudais e percentagens de Hct de forma a analisar os fenómenos associados.

Como preparação do sangue para se realizarem os testes, procederam-se a duas lavagens para a obtenção do Hct. Inicialmente recolheram-se 3mL da amostra de sangue e foram colocados num tubo de ensaio juntamente com 3mL de soro fisiológico. Agitou-se calmamente a amostra e foi colocada na centrífugadora com uma velocidade de 2000rpm durante 15min a 4°C. No final da centrifugação foi removido a parte superior da amostra, que possuía o soro e os constituintes celulares não desejados. Efectuou-se novamente uma lavagem à amostra com a adição de 3mL de soro e a respectiva centrifugação com os parâmetros já anteriormente indicados. Em seguida podemos observar na Figura 53 o equipamento utilizado para centrifugar as amostras com os parâmetros de centrifugação indicados.



Figura 53: Centrífugadora utilizada para efectuar separação do Hct.

De forma a preparar as amostras de fluido com 1%, 5% e 15% de Hct, foram colocados em 3 tubos de ensaio distintos 5 μ L, 25 μ L e 75 μ L de hematócrito e adicionou-se dextrano 40 até se completar os 5 mL de amostra. Agitaram-se de forma suave as amostras e foram colocadas no frigorífico durante 2 horas.

Durante o espaço de tempo em que as amostras se encontravam no frigorífico, foi efectuada a montagem que podemos observar na Figura 54.

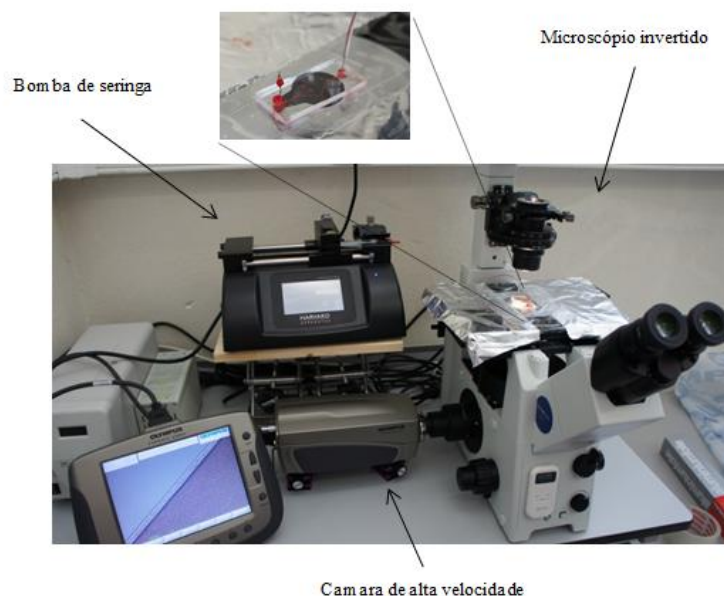


Figura 54: Montagem realizada para visualizar o escoamento dos fluidos nos microcanais produzidos.

De forma a se visualizar o escoamento das amostras anteriormente preparadas, foram seleccionados os equipamentos que melhor se adequavam. Iniciou-se a montagem com o isolamento do microscópio (*IX71, Olympus*) com papel de alumínio com o objectivo de proteger o equipamento de possíveis fugas de fluidos. Posteriormente colocou-se o microcanal no microscópio invertido e foi fixado com fita-cola adesiva. Esta etapa permitiu que durante o processo de visualização, as imagens e filmes de escoamento fossem captados com a mesma disposição, sem qualquer tipo de alteração angular dos microcanais. Recorreu-se a uma camara de alta velocidade (*i-SPEED LT*) não só para se visualizar o escoamento e o comportamento do escoamento, mas também para efectuar a captação de vídeos do escoamento ao longo dos microcanais. Utilizou-se também uma bomba de seringa (*Harvard Apparatus PHD ULTRATM*) para bombear o sangue com caudais de 5, 10 e 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ de todas as amostras anteriormente preparadas.

No final das duas horas e depois de se efectuar a montagem de equipamento, recolheu-se com o auxílio de uma seringa de 5mL (*TERUMO[®] SYRING*) alguns mililitros da amostra de sangue com 1% de sangue que foi previamente agitada para esta fosse totalmente homogénea. Foi colocado um tudo na saída da seringa e ligado à entrada do microcanal. A seringa foi colocada na bomba de seringa e procedeu-se à bombagem de sangue com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Depois de o escoamento ser visível em microscópio, aguardaram-se alguns minutos para que o escoamento estivesse

totalmente estabilizado. Posteriormente procedeu-se à captação de filmes do escoamento do sangue na zona imediatamente antes do início da curvatura da bifurcação e na zona logo após à confluência, onde o canal já se encontra rectilíneo. O procedimento anteriormente descrito foi utilizado para caudais de 5, 10 e 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ para todas as amostras produzidas (1%, 5% e 15% de hematócrito) e para os três tipos de geometrias fabricadas (geometria A, B e C)

Na Figura 55 podemos observar a ligação do tubo ao microcanal que estava conectado na extremidade oposta à seringa, assim como o início do escoamento de sangue no interior dos microcanais.

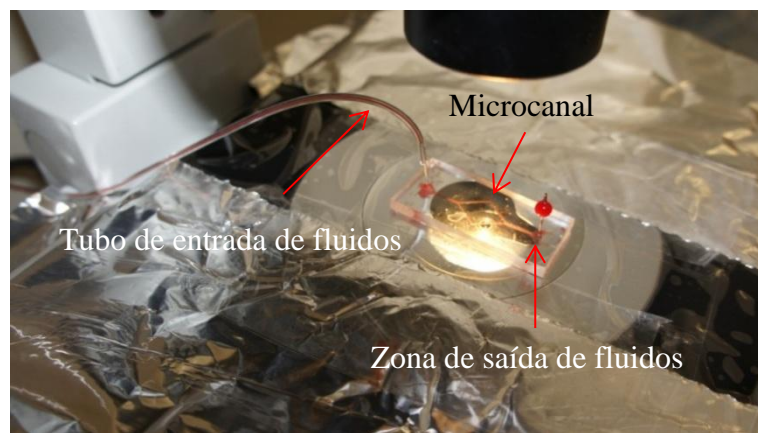


Figura 55: Montagem efectuada junto do microcanal para se realizar o escoamento dos fluidos.

Os vídeos foram obtidos através de um microscópio invertido combinado com um sistema confocal, com uma câmara de alta velocidade. Todas as imagens adquiridas pelo sistema, foram captadas no centro dos microcanais, utilizando uma taxa de 100 frames/segundo e um tempo de exposição de sensivelmente 2,5 segundos.

As imagens foram transferidas para o computador e com o auxílio do *ImageJ* efectuou-se a recolha de resultados numéricos referentes as imagens captadas. O *ImageJ* é um *software* de processamento de imagem desenvolvido por *Wayne Rasband* no *National Institute of Mental Health*. Este *software* permite efectuar processamento e análise de imagens. O número de imagens trabalhadas depende unicamente da memória disponível já que este suporta um número infinito de imagens. O *ImageJ* permite ainda que sejam adicionados diversos *plugins*, o *MTrack J* é um *plugin* que permite efectuar um *tracking* manual do percurso de células ou componentes em estudo, marcando consecutivamente os pontos que pretendemos. No final são obtidas as coordenadas x e y

de todos os pontos mascarados permitindo efectuar o acompanhamento da trajectória de células, ou efectuar tratamentos numéricos para a determinação CLC.

Considerando os conceitos anteriormente referidos, recorreu-se ao *plugin Mtrack J* para efectuar o *tracking* de 50 *frames* dos vídeos captados para cada região de interesse. Inicialmente efectuou-se um ajuste de contraste de imagem, permitindo uma fácil detecção da linha de separação do plasma. Em seguida realizou-se *tracking* das paredes dos microcanais e posteriormente realizou-se um *tracking* da linha representativa da camada de plasma *layer*. Na Figura 56 podemos observar o *tracking* efectuado na entrada do microcanal de 300 μ m, assim como a função de ajuste de brilho e o *plugin Mtrack J*.

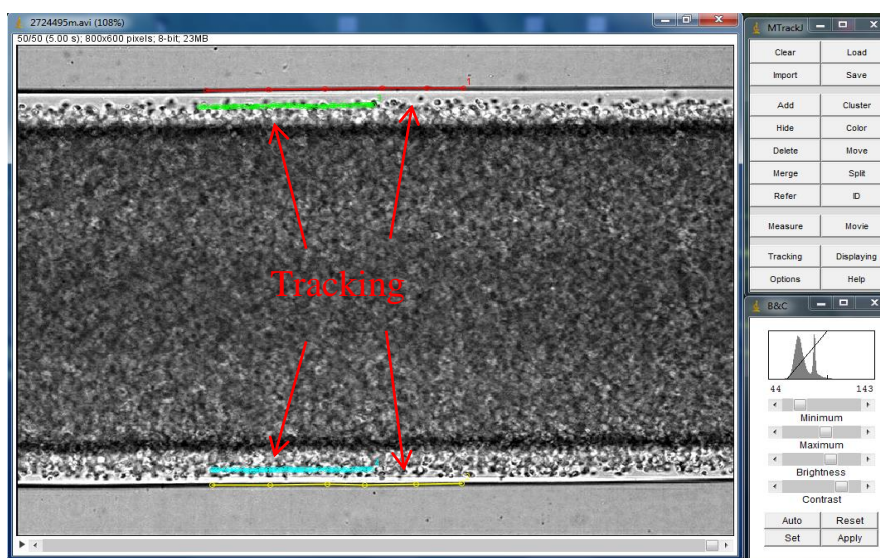


Figura 56: *Tracking* efectuado em *ImageJ* com o *plugin Mtrack J* na entrada de um dos microcanais produzidos.

Os valores das coordenadas x e y referentes aos pontos do *tracking* foram guardados e posteriormente tratados numericamente em *Excel*. Foi calculada a média da CLC nas diferentes zonas. Posteriormente foi calculado o desvio padrão com um intervalo de confiança de 95%.

Ao longo dos testes efectuados, verificou-se que ocorria formação da CLC no escoamento de Hct de 15% no microcanal com canal principal de 500 μ m na zona de confluência. Observou-se também que ocorria variação da espessura da CLC com a variação do caudal. Seria de todo interessante quantificar a variação da CLC com a alteração do caudal. Recorreu-se ao *ImageJ* para se efectuar um tratamento de imagem adequado de forma a facilitar a recolha dos dados com utilização do mesmo *software*.

Em seguida na Figura 57 é apresentada uma representação esquemática das etapas/funções utilizadas em *ImageJ* de forma a cumprir os objectivos.

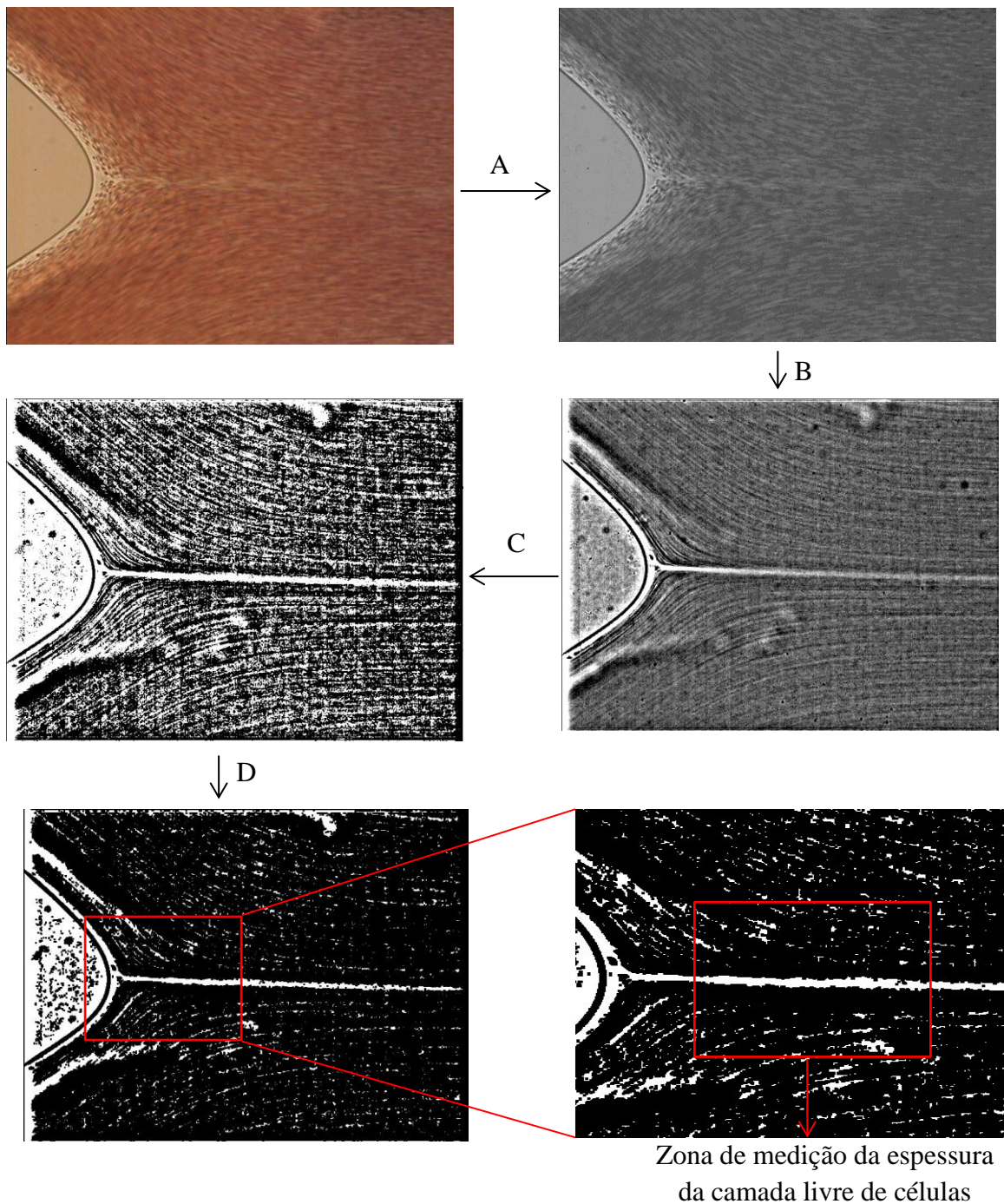


Figura 57: Representação esquemática das etapas/funções desenvolvidas em *ImageJ* para a quantificação da CLC na zona central da confluência: A – Convert to Grayscale; B – Image → Stacks → Z Project → Average Intensity; C – Process → Filters → Unsharp Mask (Radius → 9 e Mask → 0,95); D – Process → Make Binary → Dilate.

Depois de efectuado o tratamento das imagens, era recolhida a espessura da CLC com o auxílio do *ImageJ*. Posteriormente eram efectuados os tratamentos dos dados em *Excel*.

4.1.2. Apresentação e Discussão dos Resultados

O escoamento sanguíneo foi testado nos microcanais produzidos de forma a validar o método de fabricação utilizado. Como já foi referido anteriormente, foram efectuados escoamentos sanguíneo com variação de caudais, variação de percentagens de Hct e para microcanais de diferentes larguras.

De forma a cumprir os objectivos propostos, foram captados filmes dos escoamentos de fluidos na zona imediatamente antes do início da bifurcação e na zona imediatamente apos da confluência. A recolha destes dados permitiu uma análise numérica com o auxílio do *ImageJ*, quantificando a camada livre de células (CLC) junto as paredes dos microcanais. Nas Figuras 58, 59 e 60 são apresentadas imagens de escoamento sanguíneo num microcanal produzido com a geometria B. Na Figura 58 é apresentada uma imagem do escoamento sanguíneo na zona de bifurcação.

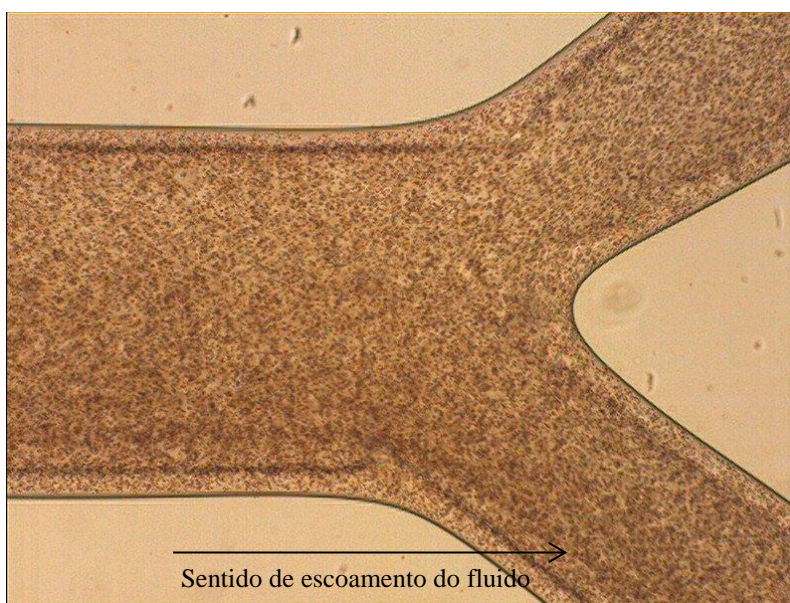


Figura 58: Escoamento sanguíneo da zona de bifurcação com Hct de 5% e uma velocidade de $10\mu\text{L}/\text{min}$.

Podemos verificar na Figura 58 que o microcanal possuía uma bifurcação simétrica. O escoamento sanguíneo era uniforme ao longo de toda a largura do microcanal. Relativamente ao escoamento apos a bifurcação, este possuía total simetria nas duas ramificações. A ocorrência da simetria do escoamento deve-se a regularidade que os canais possuíam, na sua construção. Possuíam paredes rectas e a bifurcação era simétrica.

É possível analisar que existe uma CLC junto à parede superior e na parede inferior do microcanal. Como já vimos neste trabalho, as forças de corte são máximas na zona junto à parede, como consequente as hemácias têm tendência em migrar para a zona axial do escoamento de forma a reduzir o atrito do escoamento. Deste modo é importante analisar ao longo das ramificações e na zona de confluência a variação da CLC e alguns fenómenos associados ao escoamento sanguíneo.

Verificou-se na análise dos resultados da geometria de $300\mu\text{m}$ que em grande parte dos casos, as bifurcações eram assimétricas. Um dos ramos formados possuía sempre larguras inferiores às esperadas e o outro possui dimensões superiores. Este fenómeno poderá influenciar o escoamento posterior à bifurcação.

Na Figura 59 podemos observar uma das ramificações com os parâmetros já anteriormente referidos.

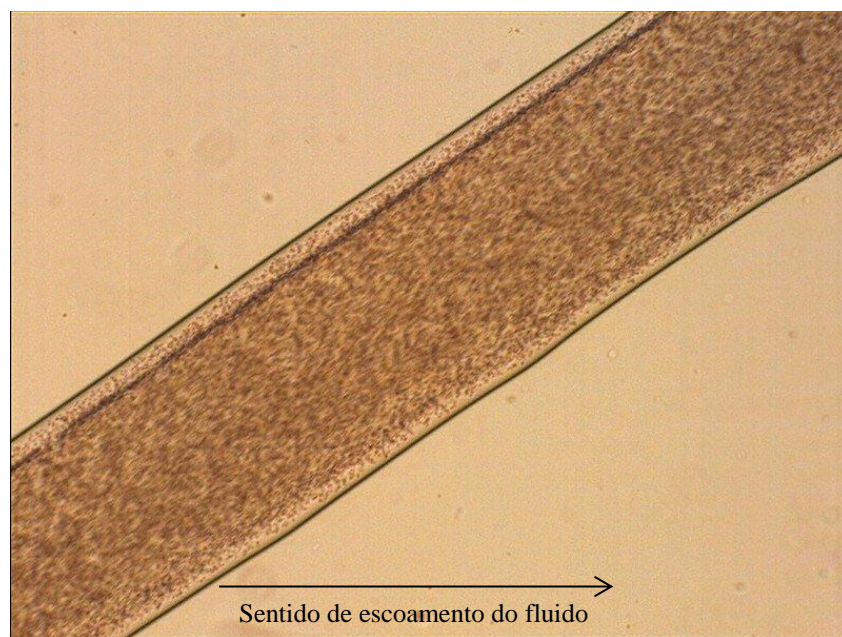


Figura 59: Escoamento sanguíneo da zona de ramificação com Hct de 5% e uma velocidade de $10\mu\text{L}/\text{min}$.

Verificamos que existe um aumento da CLC comparativamente com a zona anterior à bifurcação. É possível identificar que existe maior espessura da CLC na parede superior do que na parede inferior. Este facto dever-se-á à concavidade da curvatura formada na zona de bifurcação. Na zona central do escoamento é possível analisar que o escoamento possui perfil parabólico.

Depois das ramificações estas unem-se em zona de confluência, na Figura 60 podemos observar o escoamento na zona de confluência.

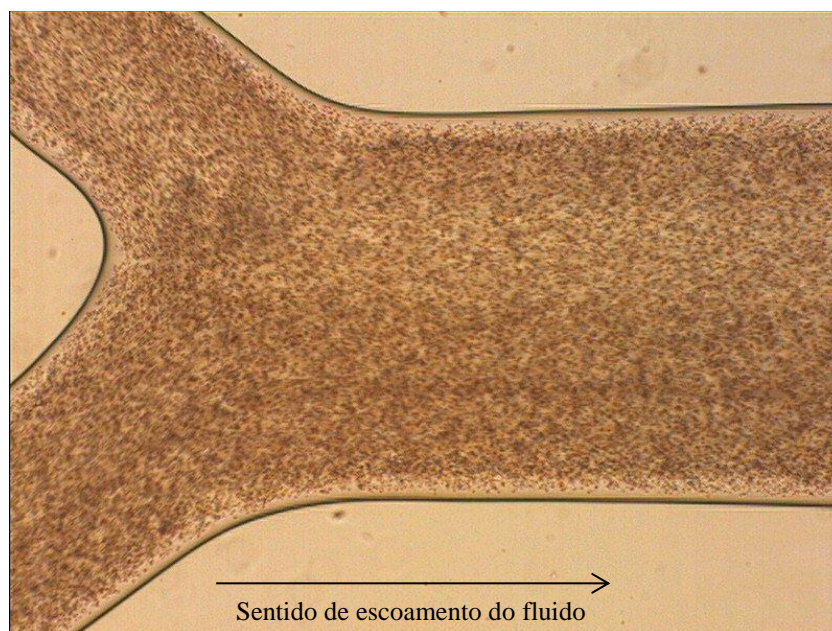


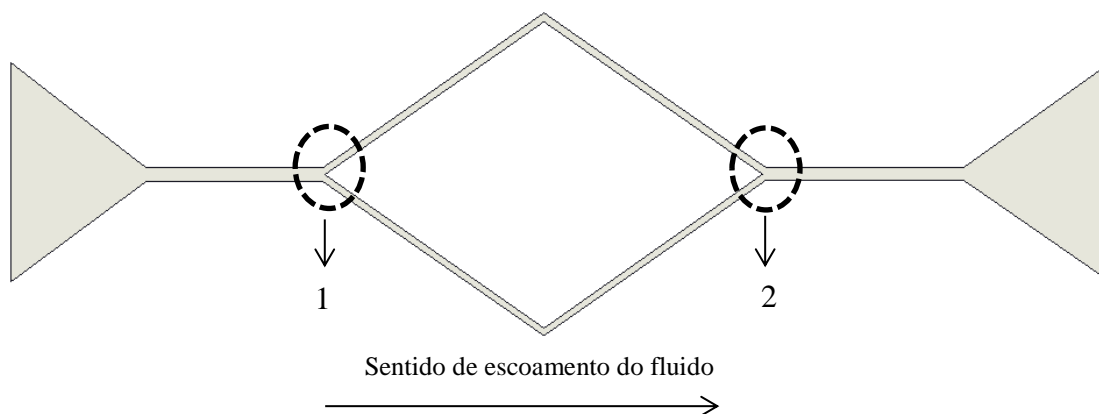
Figura 60: Escoamento sanguíneo da zona de confluência com Hct de 5% e uma velocidade de $10\mu\text{L}/\text{min}$.

Podemos analisar que na zona de confluência a CLC é superior comparativamente com todas as outras secções da rede de microcanais. Este fenómeno tal como já foi referido anteriormente, dever-se-á à forma como a concavidade foi inserida no microcanal. Este facto poderá também estar relacionado com a movimentação axial das células ao longo do escoamento e poderá estar interligado com o escoamento associado a bifurcações e confluências.

É possível verificar que existe também uma simetria da camada de plasma entre a parede superior e a parede inferior do microcanal. Este acontecimento era esperado considerando que a todo o sistema possuía uma simetria. Depois das ramificações unirem-se, verifica-se uma maior concentração de células na parte inferior do microcanal comparativamente com a parte superior. É possível que esteja ligado com coagulação de sangue na zona de entrada do microcanal.

Ao longo dos diversos teste efectuados com a variação dos caudais, das percentagens de Hct e das diferentes geometrias, verificou-se que na zona das ramificações não ocorriam grandes alterações da CLC. O escoamento era constante em todos os testes efectuados. Considerando os factos anteriormente descritos, achou-se de todo interessante analisar a variação da CLC na zona imediatamente antes da curvatura

da bifurcação e na zona imediatamente após a confluência, onde o canal já é rectilíneo. Posteriormente à recolha dos filmes nas zonas referidas procedeu-se à quantificação da variação da CLC com o auxílio do *ImageJ*. Na Figura 61 podemos observar as duas zonas onde se efectuou uma análise mais cuidada das CLC junto às paredes dos microcanais.



1 – Imediatamente antes da bifurcação;

2 – Imediatamente após a confluência.

Figura 61: Representação esquemática das zonas de medição da camada livre de células (CLC).

Nas próximas Figuras iremos apresentar os resultados obtidos nas zonas 1 (antes da bifurcação) e na zona 2 (após a confluência) das CLC dos testes de escoamento realizados. É importante denotar que foram medidas CLC para 3 caudais, para 3 percentagens de Hct e 3 geometrias diferentes. Nas Figuras os 3 pontos referentes às espessuras das CLC para os respectivos caudais dos 3 diferentes fluidos, são unidos apenas para melhor se visualizar a tendência da CLC com o caudal. Na Figura 62 e 63 podemos observar em forma gráfica as variações das espessuras das CLC na zona 1 e 2 respectivamente, para o microcanal de 300 μ m de largura.

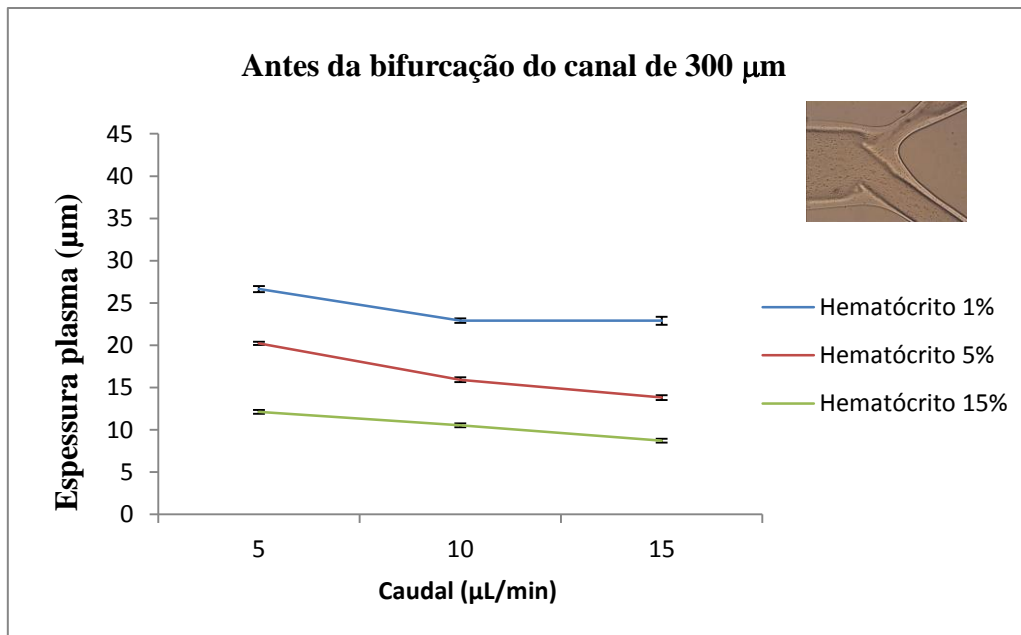


Figura 62: Espessura da CLC em função do caudal do fluido, para 3 valores de Hct, na zona imediatamente antes da bifurcação do microcanal de 300 μm , e respectivo desvio padrão.

Na Figura 62 podemos observar que a CLC varia com o caudal e com a percentagem de Hct. Podemos verificar que a CLC para os 3 Hct diminui com o aumento do caudal. O aumento do caudal provoca um aumento de pressão no interior dos microcanais e por consequente as células que se encontram na zona central do mesmo, irão exercer pressão sobre a zona de CLC.

Verifica-se também que o aumento da percentagem de Hct proporciona uma diminuição da CLC junto das paredes dos microcanais. Este fenómeno está associado à percentagem de células presentes no escoamento. As hemácias têm tendência a migrar para a zona axial do microcanal ao longo do escoamento. O aumento do número de células presentes no escoamento diminui o espaço disponível na zona axial, provocando um aumento de pressão da CLC e a sua consequente diminuição.

Obteve-se uma espessura de CLC máxima de 27 μm quando se efectuou um escoamento de Hct a 1% com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A espessura mínima de CLC obtida foi de 9 μm com escoamento de Hct a 15% e um caudal de 15 $\mu\text{L}/\text{min}$.

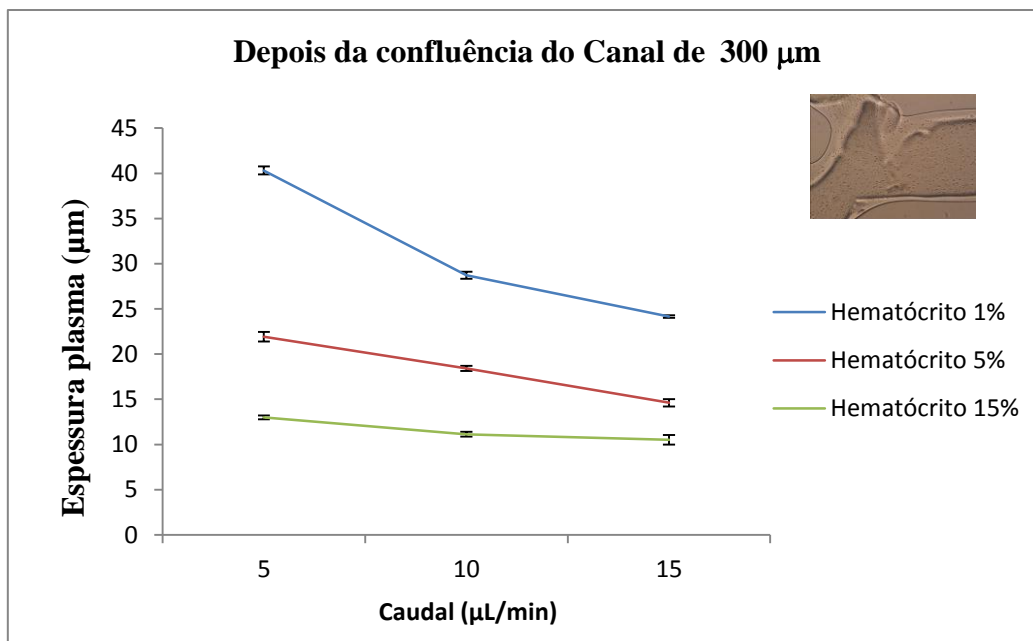


Figura 63: Espessura da CLC em função do caudal do fluido, para 3 valores de Hct, na zona imediatamente após da confluência do microcanal de 300µm, e respectivo desvio padrão.

Relativamente aos resultados obtidos depois da confluência (Figura 63), verifica-se igualmente uma diminuição da espessura da CLC com o aumento do caudal e com o aumento da percentagem de Hct. A diminuição da CLC com a alteração dos parâmetros deveria estar associada aos motivos apresentados anteriormente.

A CLC é máxima com escoamento de Hct de 1% a 5µL/min. Podemos observar que existiu um decréscimo mais acentuado com o aumento do caudal de 5 para 10µL/min para o Hct de 1% comparativamente com os outros testes efectuados.

Analisando os resultados obtidos antes da bifurcação e após a bifurcação para o microcanal de 300µm, verificamos que existiu um aumento da espessura da CLC nas diferentes situações. Esta ocorrência poderá ser justificada pela angulação que as curvaturas da bifurcação e da confluência apresentavam, mas poderá também estar associada à contínua migração das células para a zona axial ao longo do escoamento, como já foi referido anteriormente.

O aumento da CLC é mais perceptível no escoamento de Hct a 1%. Este facto poderá estar relacionado com o processo de fabricação de contracções na zona de bifurcação dos microcanais. Nas bifurcações da geometria A (microcanal principal de 300µm) grande parte das vezes ocorria uma assimetria e uma contracção em uma das ramificações.

A variação da percentagem de Hct produziu em ambas as zonas maior influência na espessura de CLC obtida do que a alteração do caudal.

Depois de analisadas as variações do escoamento sanguíneo em microcanais de 300 μm , nas Figuras 64 e 65 são apresentados os resultados obtidos na zona 1 e 2 para os microcanais de 500 μm .

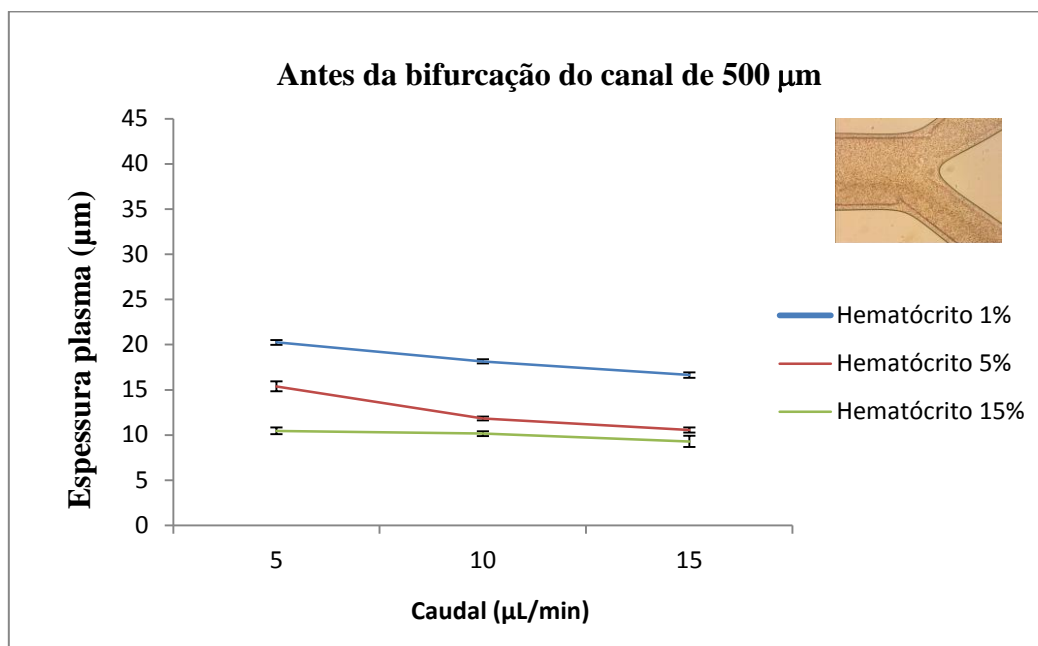


Figura 64: Espessura da CLC em função do caudal do fluido, para 3 valores de Hct, na zona imediatamente antes da bifurcação no microcanal de 500 μm , e respectivo desvio padrão.

Relativamente ao escoamento sanguíneo antes da bifurcação em microcanais de 500 μm , verificamos que o aumento do caudal e o aumento da percentagem de Hct traduziu-se numa pequena diminuição traduziu-se numa pequena diminuição da espessura da CLC junto das paredes. Os motivos que poderão justificar este decréscimo serão os já apresentados anteriormente.

Verifica-se que a CLC é máxima para o escoamento de Hct de 1% com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A espessura de CLC é mínima no escoamento de Hct a 15% com um caudal de 15 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Comparando com os resultados obtidos no escoamento em microcanais de 300 μm antes da zona de bifurcação, é possível analisar uma diminuição da espessura da CLC junto das paredes. Esta diminuição da CLC pode ser explicada pelo efeito de Fahraeus. O efeito de Fahraeus enuncia que as hemácias têm tendência a migrar axialmente em

microcanais de diâmetros inferiores a $300\mu\text{m}$. Considerando que nesta etapa utilizamos microcanais de $500\mu\text{m}$, poderá não ter ocorrido migração axial das hemácias de forma tão intensa como enuncia Fahraeus.

Em seguida são apresentados na Figura 65 a variação da CLC em função do caudal para 3 Hcts na zona posterior à confluência no microcanal de $500\mu\text{m}$.

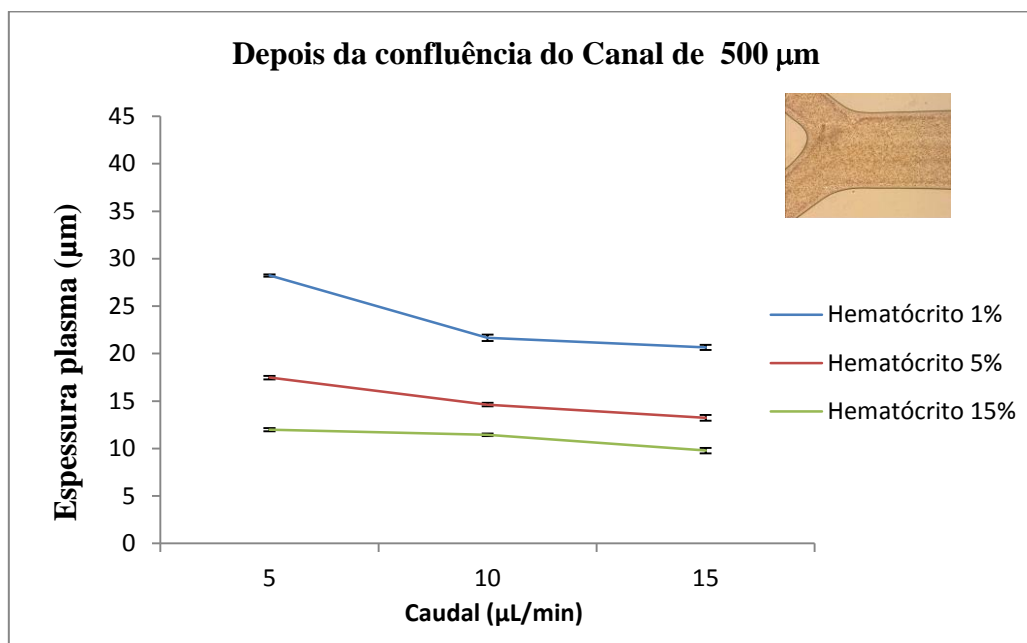


Figura 65: Espessura da CLC em função do caudal do fluido, para 3 valores de Hct, na zona imediatamente após da confluência do microcanal de $500\mu\text{m}$, e respectivo desvio padrão.

Relativamente aos resultados obtidos após a confluência, podemos observar na Figura 65 que a espessura da CLC é máxima para o escoamento de Hct a 1% com um caudal de $5\mu\text{L}/\text{min}$ e mínima no escoamento de Hct a 15% com caudal de $15\mu\text{L}/\text{min}$. Verifica-se que o aumento da percentagem de Hct e do caudal traduziu-se numa diminuição da espessura da CLC. Os motivos que poderão justificar estes dados são os já apresentados anteriormente, o aumento no número de células e o aumento do caudal provocam um aumento de pressão sobre a CLC e a sua consequente diminuição da CLC.

Comparativamente com os resultados obtidos antes da bifurcação observa-se um aumento da espessura da CLC. Poderá ter ocorrido migração axial das hemácias ao longo do escoamento, ou sucedida uma diminuição da pressão sobre a CLC.

Efectuando uma comparação com os resultados obtidos na zona 2 no microcanal de 300 μm com a zona 2 do microcanal de 500 μm , verifica-se uma diminuição da espessura da CLC. Como já foi referenciado anteriormente pelo efeito Fahraeus, a migração axial das hemácias é mais intensa para microcanais de diâmetro inferior ao de 300 μm . É plausível que a migração axial tenha sido mais intensa nos microcanais de 300 μm do que no de 500 μm ao longo de todo o escoamento. Este facto poderá explicar a diminuição da CLC com o aumento do diâmetro dos microcanais testados.

Posteriormente foi efectuado o escoamento sanguíneo nos microcanais de 1000 μm . Nas Figura 66 e 67 apresentamos os valores obtidos referentes às zonas 1 e 2.

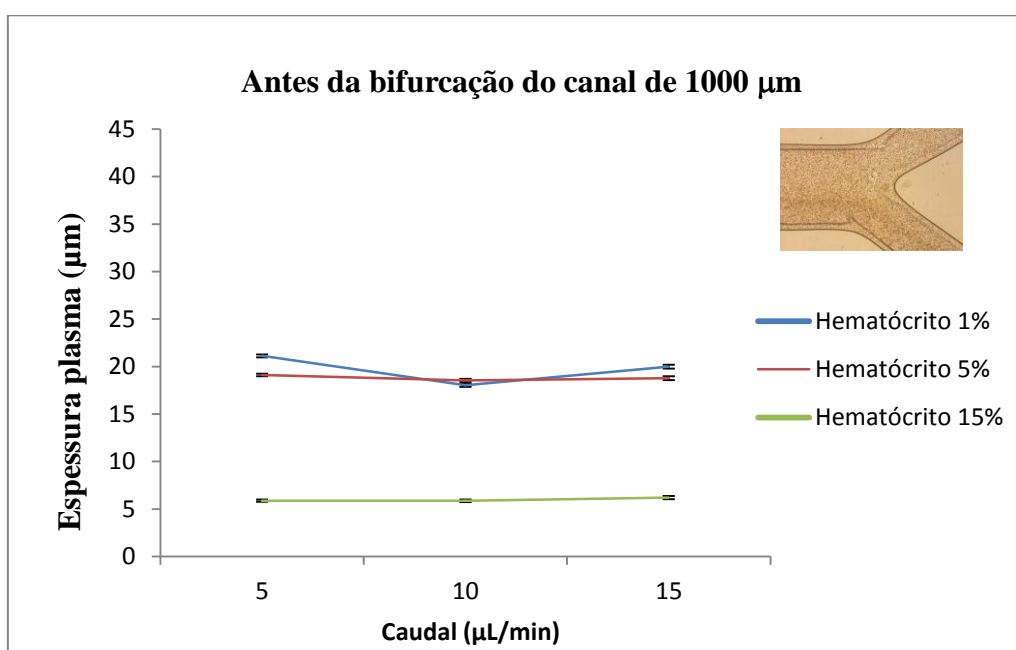


Figura 66: Espessura da CLC em função do caudal do fluido, para 3 valores de Hct, na zona imediatamente antes da bifurcação no microcanal de 1000 μm , e respectivo desvio padrão.

Podemos observar na Figura 66 que da mesma forma que ocorreu nos casos anteriores, a espessura CLC foi máxima no escoamento de Hct a 1% com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ e mínima no escoamento de Hct a 15% a 15 $\mu\text{L}/\text{min}$.

A alteração do Hct influenciou de forma mais acentuada a diminuição da espessura CLC, comparativamente com a modificação do caudal. Como estamos a abordar um microcanal de maiores dimensões, seria de esperar que o aumento da quantidade de células presentes no escoamento produzisse influência ainda mais acentuada na diminuição da CLC do que a variação do caudal. Como o microcanal é de

maiores dimensões e a pressão exercida sobre as paredes é inversamente proporcional com o diâmetro do microcanal, os resultados estão de acordo com o esperado.

É possível observar que a alteração da percentagem de Hct de 5% ou 10% para a percentagem de 15 %, provocou uma descida acentuada da espessura CLC. O aumento da quantidade de células aumentou a pressão exercida sobre a CLC.

Comparativamente com os resultados obtidos anteriormente observa-se que a CLC não variou de forma tão linear com a alteração do Hct e do caudal. Os valores obtidos para Hct de 1 e 5% são bastante próximos. Como a CLC era inferior comparativamente com os escoamentos anteriores, verificou-se alguma dificuldade em efectuar o *tracking* das células manualmente. As variações verificadas no gráfico poderão ser justificadas por erro humano da delimitação da CLC.

A CLC foi superior no escoamento a 10 μ L/min de Hct a 5% do que no escoamento de Hct a 1%.

Na Figura 67 podemos observar a espessura da CLC do escoamento dos diferentes Hct nos microcanais de 1000 μ m.

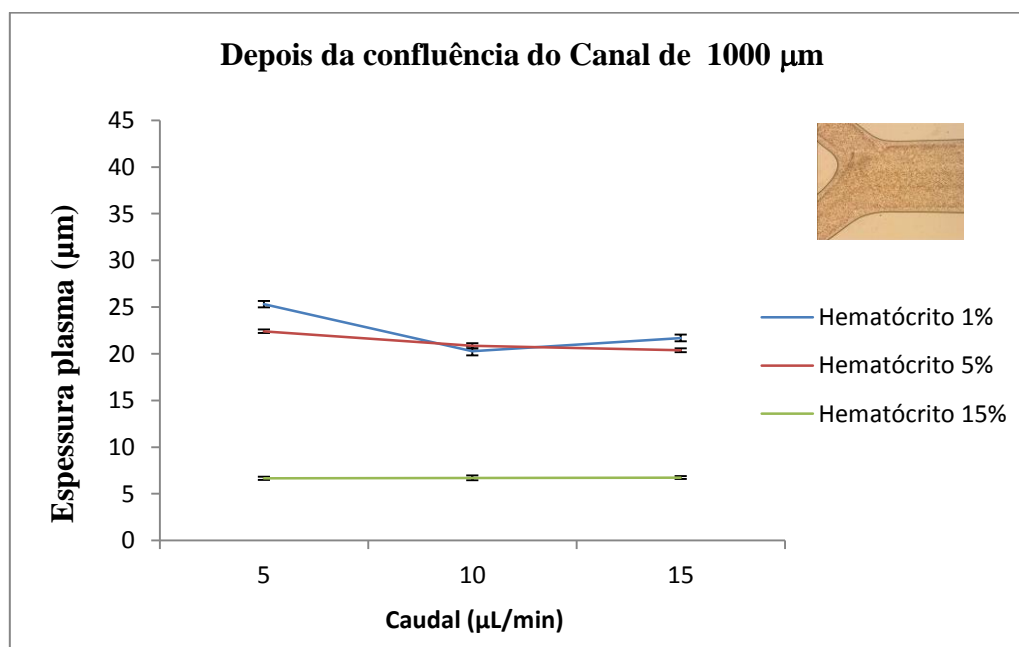


Figura 67: Espessura da CLC em função do caudal do fluido, para 3 valores de Hct, na zona imediatamente após da confluência do microcanal de 1000 μ m, e respectivo desvio padrão.

Analisa-se na Figura 67 que existiu um aumento muito ligeiro da CLC na zona 2 comparativamente com a zona 1. O aumento foi muito mais ligeiro que nos testes

efectuados para os microcanais de 300 e 500 μ m porque para microcanais de dimensões superiores não ocorre qualquer tipo de migração axial de hemácias.

Verifica-se que o aumento de Hct para 15% traduziu-se numa diminuição drástica da CLC tal como já tinha ocorrido na zona 1. É importante referir que a variação do caudal não produziu qualquer tipo de alteração à CLC no escoamento de Hct de 5 e 15%. No escoamento de Hct a 1%, o caudal influenciou de forma muito suave a CLC. Esta variação tal como já foi referido anteriormente, poderá estar associada a erros humanos na etapa de *tracking* de células.

Verificou-se que a CLC era máxima para o escoamento de Hct a 1% com um caudal de 5 μ L/min e era mínima para Hct a 15%.

Depois de efectuar uma análise pormenorizada da CLC no escoamento sanguíneo dos diferentes Hcts, nos 3 diferentes microcanais para duas diferentes zonas e com os diferentes caudais de uma forma pormenorizada, é importante efectuar uma análise global da variação da CLC. Na Figuras 68, 69 e 70 serão apresentados os resultados já apresentados, mas na forma de gráficos de barras. Iremos observar os escoamentos realizados em cada geometria e analisar os fenómenos associados à variação da CLC.

Na Figura 68 podemos observar as variações das CLCs obtidas no escoamento de fluidos no microcanal de 300 μ m. Podemos analisar a variação da CLC para os diferentes caudais, para as diferentes percentagens de Hct e nas duas zonas de interesse.

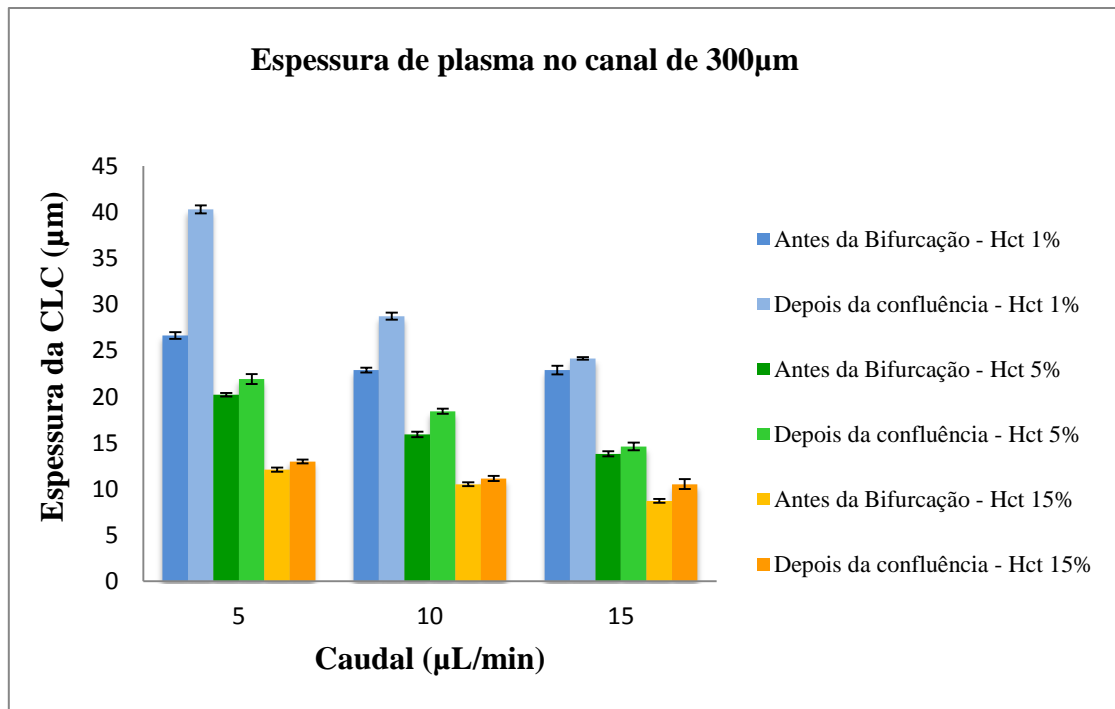


Figura 68: Espessura da CLC dos escoamentos fluídicos realizados no microcanal de 300µm.

Podemos observar na Figura 68 que o aumento do caudal no microcanal de 300µm produziu de forma relativamente linear uma diminuição da CLC. Esta diminuição é menos acentuada no escoamento de fluidos com maior percentagem de Hct. Estes acontecimentos, como já foi referido anteriormente, estão relacionados com a pressão exercida sobre a CLC pelo fluido e está sobretudo relacionado com a migração axial das hemácias.

Analisa-se também que o aumento da percentagem de Hct cria uma diminuição da CLC nos 3 diferentes caudais utilizados. É importante referir que o Hct a 1% foi o fluido que produziu maior CLC para os 3 caudais utilizados.

Relativamente aos resultados obtidos na zona 1 e zona 2, verificou-se que em todos os casos o sistema provocou um aumento da CLC. O aumento era claramente atenuado com o aumento do caudal e com o aumento da percentagem de Hct presente no escoamento. O aumento da CLC da zona 1 para a zona 2 poderá ser justificado pela migração axial das hemácias ao longo de todo o escoamento. Poderá também estar relacionado com a concavidade que a curvatura da confluência junto da zona 2.

Obteve-se uma CLC máxima nos testes efectuados no microcanal de 300µm na zona 2 com escoamento de Hct a 1% e um caudal de 5µL/min. Por sua vez, a CLC foi mínima com o escoamento de Hct a 15% e com um caudal de 15µL/min na zona 1.

Depois de analisados os resultados obtidos no microcanal de 300 μm , iremos examinar os resultados obtidos no microcanal de 500 μm de forma genérica. Na Figura 69 podemos observar a variação da CLC ao longo dos testes de escoamento de fluido efectuados.

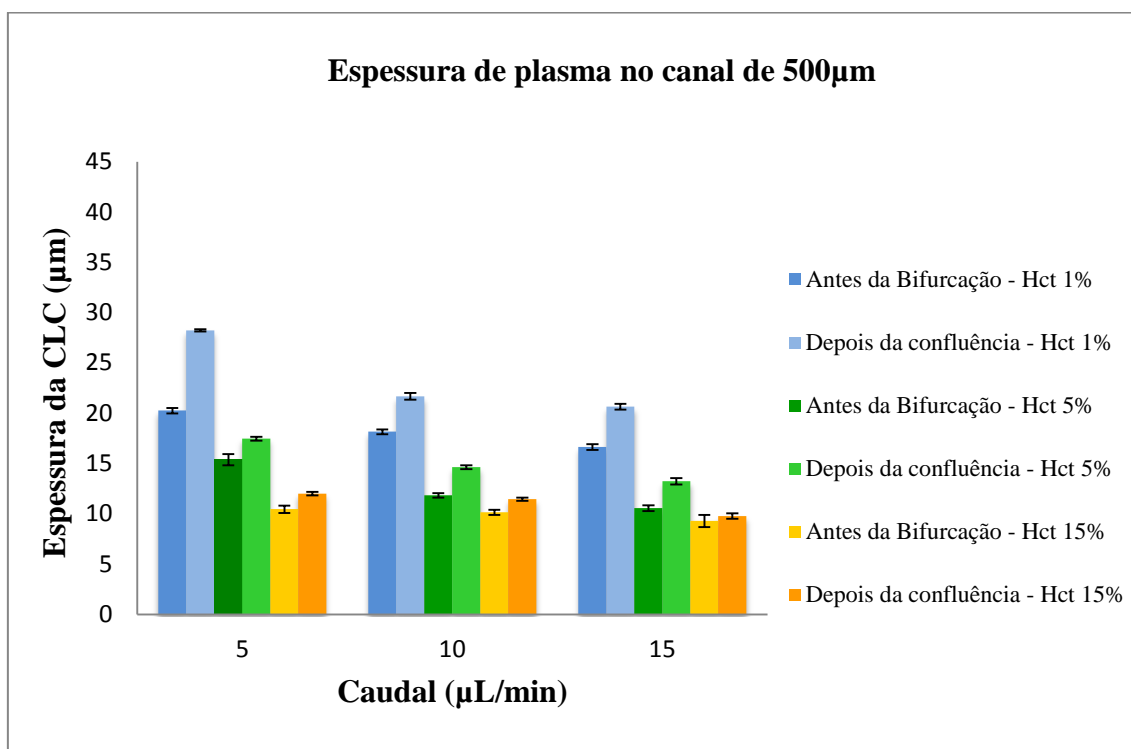


Figura 69: Espessura da CLC dos escoamentos fluídicos realizados no microcanal de 500 μm .

Comparativamente com os resultados obtidos nos microcanais de 300 μm é nítido que globalmente existiu uma diminuição da CLC em todos os escoamentos efectuados. É portanto perceptível que o aumento do diâmetro dos microcanais produz uma diminuição da CLC. Como já foi referido ao longo do trabalho, a diminuição da CLC com o aumento da largura do microcanal, está relacionada com o efeito de Fahraeus.

Relativamente à variação do Hct, verifica-se que o seu aumento gera uma diminuição da CLC. Este fenómeno ocorre para todos os caudais testados, sendo este mais acentuado para o menor caudal testado e menos perceptível em caudais mais elevados.

Analisando os fenómenos associados à variação do caudal, o seu aumento reduz a CLC para todas as percentagens de Hct testados. É possível observar que a influência do caudal provoca pela variação baixa. A diferença da CLC é quase imperceptível para o escoamento de fluidos a 10 e 15 $\mu\text{L}/\text{min}$.

No que diz respeito à comparação da zona 1 e 2, verifica-se um aumento da CLC para todos os escoamentos testados. Este aumento é mais perceptível para menores caudais e menores percentagens de Hct.

Verifica-se assim que a CLC é máxima para o escoamento de Hct a 1% com um caudal de 5 μ L/min na zona 2 e é mínimo para escoamento de Hct a 15% com um caudal de 15 μ L/min na zona 1.

Por fim iremos observar e analisar os resultados obtidos, associados ao escoamento sanguíneo em microcanais de 1000 μ m. Na Figura 70 podemos observar as CLC obtidas para os escoamentos realizados.

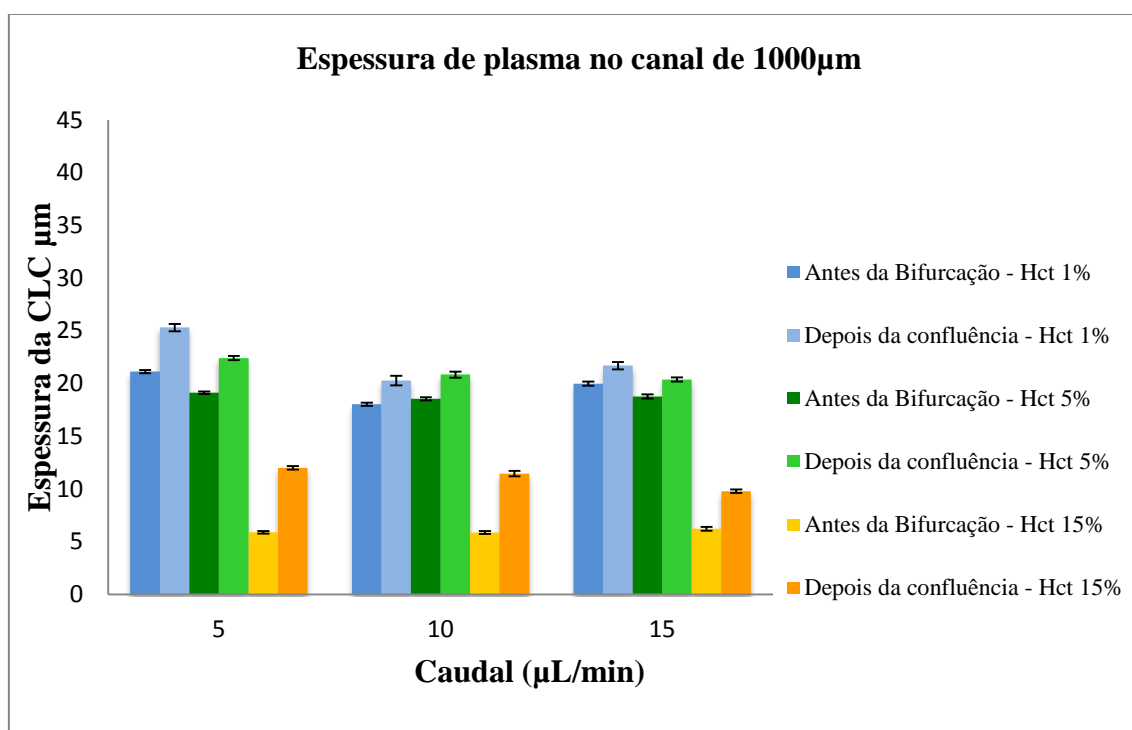


Figura 70: Espessura da CLC dos escoamentos fluídicos realizados no microcanal de 1000 μ m.

Comparativamente com os resultados no escoamento sanguíneo nos outros microcanais é perceptível que existe uma diminuição da CLC. Mais uma vez com o aumento da largura do microcanal, não ocorre migração axial das hemácias, ocorrendo um aumento de pressão sobre as CLC e a conseqüente diminuição da sua espessura.

Relativamente à variação do caudal é possível verificar que com o seu aumento quase não existe alteração da CLC. Existe um pequeno decréscimo da CLC, mas se considerarmos o desvio padrão calculado, a diferença observável é insignificante.

Observando a variação do Hct analisa-se que existe um decréscimo acentuado da CLC, no escoamento de Hct de 15%. Relativamente ao Hct a 5 e 10% estes possuem semelhantes CLC.

Efectuando uma comparação da CLC na zona 1 e 2, verifica-se um ligeiro aumento na zona 2. Porém este aumento é muito inferior comparativamente com os escoamentos efectuados nos anteriores microcanais.

Da mesma forma que se sucedeu nos casos anteriores, a CLC foi máxima para o escoamento de Hct de 1% na zona 2 com caudal de 5 μ L/min e mínima para Hct a 15% na zona 1 com um caudal de 15 μ L/min.

Ao longo dos testes efectuados foram também observados fenómenos na zona central da confluência associados à geometria de 500 μ m e especificamente no escoamento de Hct a 15%. Verificamos que neste escoamento existia a formação de CLC na zona central da confluência (em inglês denominada *apex*), como podemos observar na Figura 71. Esta camada, que se prolonga para jusante, deve-se à junção das CLCs formadas nas paredes “interiores” dos microcanais que se unem na confluência.

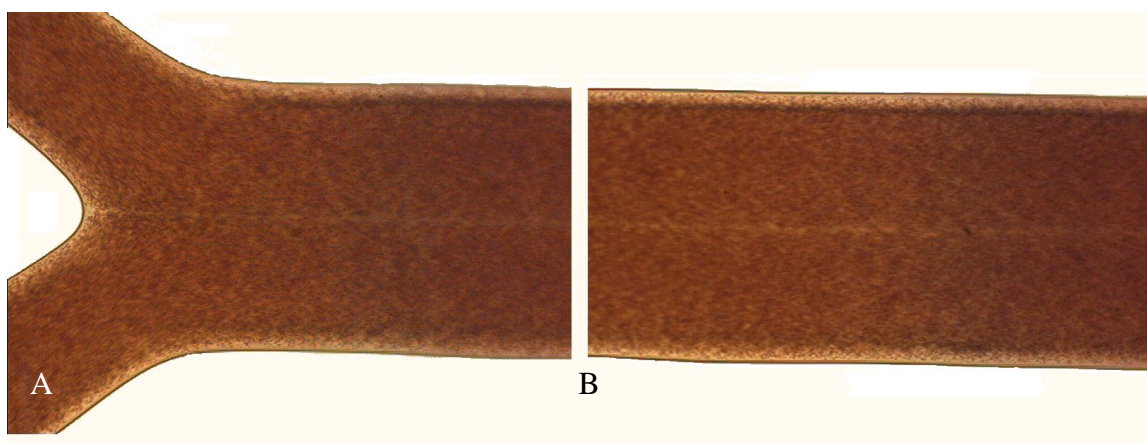


Figura 71: A - Formação da CLC na zona 2; B – Continuação da CLC ao longo do escoamento, na zona de saída do microcanal.

Como podemos observar na Figura 71-A, existe formação de CLC na zona central da confluência do microcanal. Verificou-se que a camada de CLC central continuava definida ao longo do escoamento como podemos observar na Figura 71-B. Analisou-se também a variação da espessura da CLC central em função do caudal de escoamento do fluido. Achou-se de todo interessante quantificar a variação desta CLC, neste caso

específico, e apresentar os resultados obtidos em função do Reynolds. Na Figura 72 podemos observar a variação da CLC em função do Reynolds na situação referida anteriormente.

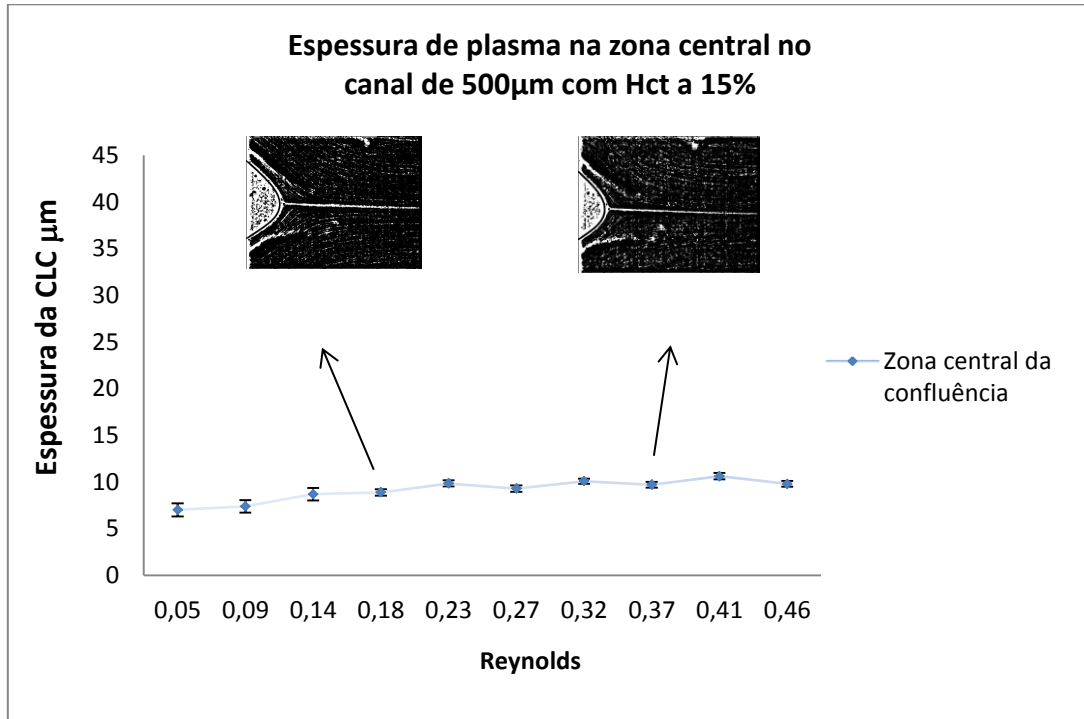


Figura 72: Variação da CLC da zona de confluência do microcanal de 500µm no escoamento de Hct a 15%, em função do Reynolds.

Relativamente à variação da CLC com o Reynolds nos caudais efectuados, constata-se pela Figura 72, que há um ligeiro aumento da espessura até um Reynolds aproximadamente de 0,3 e uma aparente estabilização para Reynolds superiores. Para se tirar conclusões mais definitivas será necessário realizar mais testes experimentais, utilizando outras dimensões de microcanais, outros valores de Hcts e outros caudais.

Capítulo 5

5. Conclusão

Realizou-se um projecto de natureza experimental na área da Tecnologia Biomédica, tendo-se procedido à fabricação de microcanais e ao estudo do escoamento de fluidos fisiológicos nos microcanais fabricados.

Relativamente à fabricação de microcanais as principais conclusões retiradas deste estudo são as seguintes:

- A técnica de fabricação dos microcanais desenvolvida neste projecto, designada por xurografia é válida, considerando que foi possível fabricarem-se microcanais de dimensões à escala micron e posteriormente efectuar o escoamento de fluidos fisiológicos;
- A xurografia apresenta vantagens relativamente a outras técnicas de microfabricação, por recorrer a equipamentos e materiais de menor custo, não necessitar de salas limpas e ser de mais fácil utilização;
- De entre os vários equipamentos e materiais utilizados na fabricação de moldes por xurografia, foi a plotter *Jaguar II* e o vinil *KEMICA TECMARK*, serie 300 de cor branca, que produziu moldes de maior precisão e melhor qualidade. A plotter *Jaguar II* permitiu também a fabricação de microcanais de secção recta como se pretendia;
- A diminuição da largura da geometria proporcionou a obtenção de microcanais com qualidade inferior, ocorrendo a fabricação de bifurcações e confluências assimétricas, assim como rugosidades no microcanal;
- A fabricação recorrendo à técnica de xurografia produziu microcanais com arestas arredondadas na zona de bifurcação e de confluência. Porém, com o aumento da dimensão dos microcanais, o arredondamento das arestas era menos acentuado;

Relativamente ao estudo efectuado do escoamento de fluidos fisiológicos nos microcanais fabricados, as principais conclusões são as seguintes:

- Existiu sempre formação de CLC junto das paredes dos microcanais no escoamento de fluidos nas condições ensaiadas (Hct a variar entre 1 e 15% e caudal entre 5 e 15 μ L/min);
- O aumento da largura das geometrias (300, 500 e 1000 μ m), provocou uma diminuição da CLC junto das paredes dos microcanais nas zonas imediatamente antes da bifurcação (referida no texto como zona 1) e na zona a seguir à confluência (referida como zona 2);
- O aumento da percentagem de Hct (1, 5 e 15%) originou uma diminuição da CLC junto das paredes dos microcanais nas zonas já referidas anteriormente;
- O aumento do caudal (5, 10 e 15 μ L/min) gerou uma diminuição da CLC junto das paredes dos microcanais testados, nas mesmas zonas já referidas;
- A CLC é sempre superior na zona 2 comparativamente com a zona 1, concluindo-se que, de um modo geral, ocorre migração das hemácias presentes no escoamento dos fluidos para o centro dos microcanais;
- Nas experiências efectuadas, a espessura máxima da CLC foi obtida na zona 2 do microcanal de 300 μ m, com um Hct de 1% e um caudal de 5 μ L/min. A espessura mínima foi obtida na zona 1 do microcanal de 1000 μ m com um Hct de 15% e caudal de 15 μ L/min;
- De entre os vários ensaios efectuados, verificou-se que no escoamento em microcanais com 500 μ m de largura e Hct de 15%, para os diferentes caudais testados, ocorreu formação de uma CLC no centro da zona 2 que continuou, no centro do microcanal subsequente à confluência.

Capítulo 6

6. Trabalhos Futuros

Este projecto de natureza experimental representa o início de um mundo de possibilidades por explorar. Tratando-se ainda de um estudo preliminar, são sugeridos os seguintes trabalhos futuros:

- Produção de moldes com o recurso a plotters de corte com maior precisão. Seria possível produzirem-se estruturas de menores dimensões e melhorar a qualidade dos moldes produzidos, assim como a obtenção de ramificações simétricas;
- Seria de grande importância encontrar-se o material mais adequado para a fabricação. É necessário um material que possua maior resistência de forma a não ocorrer quebra dos microcanais, que seja compatível com o processo de cura do PDMS e possuía adesivo na parte posterior;
- Utilização de resinas e ceras para a produção do molde. Seria interessante utilizar a técnica desenvolvida para fabricar o negativo da geometria pretendida e produzir-se um molde em cera ou resina para posterior deposição do PDMS. Iria permitir a fabricação de estruturas de menos dimensão;
- Verificar se a técnica é válida para geometrias com diferentes formas. É de todo importante efectuar a validação da técnica em diversos tipos de geometrias, com formas mais simples e mais complexas;
- Efectuar testes para diferentes Hct, caudais e geometrias, verificar e quantificar as CLC obtidas no escoamento dos fluidos;
- Seria de todo interessante observar de forma mais detalha a CLC formada na zona central do microcanal após confluência. Poder-se-ia observar a influência do caudal, da percentagem de Hct e das dimensões do microcanal na espessura da CLC e efectuar a sua quantificação. É sugerida a utilização de camaras de alta velocidade para a captação dos escoamentos com maior qualidade e a utilização de objectivas microscópicas com maiores resoluções.

Referências Bibliográficas

- [1] Chien, S., Usami, S., Skalak, R., *Blood flow in small tubes In: Handbook of Physiology – The cardiovascular system IV*, 1984, pp.217-249.
- [2] Maeda, N., *Erythrocyte rheology in microcirculation*. Japanese Journal of Physiology 1996, 46: 1-14.
- [3] Goldsmith, H., Turitto, V., *Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications*. ICTH-Report-Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Haemostasis. Thromb Haemost. 1986, 55(3): 415–435.
- [4] Nguyen, N. T., Wereley, S. T., *Fluid Mechanics Theory. Fundamentals and Applications of Microfluidics*. Boston. Artech House. 11-65. 2002.
- [5] Voldman, J., Gray, M.L., Schimdt, M.A., *Microfabrication in Biology and Medicine*. Annual Review of Biomedical Engineering, 1999. **1**: p. 401-425.
- [6] Senturia, S.D., *Microsystem Design*. 2001, Norwell, Massachusetts: Kluwer Academic Publisher.
- [7] Petersen, K.E., *Silicon as a Mechanical Material*. Proceedings of the IEEE, 1982. **70**(5): p. 420-457.
- [8] Kovacs, G.T.A., Maluf, N.I., and Petersen, KE., *Bulk Micromachining of Silicon*. Proceedings of the IEEE, 1998. **86**(8): p.1536-1551.
- [9] Williams, K.R., and Muller, R.S., *Etch Rates for Micromachining Processing*. Journal of Microelectricalmechanical Systems, 1996. **5**: p. 256-269.
- [10] El-Kareh, B., *Fundamentals of Semiconductor Processing Technologies*. 1995, Norwell, Massachusetts: Kluwer Academic Publisher.
- [11] McDonald, J.C., Duffy, D.C., Anderson, J.R., Chiu, D.T., Wu, H., Schueller, O.J.A., and Whitesides, G.M., *Fabrication of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)*. Electrophoresis, 2000. **21**: p. 27-40.
- [12] Branham, M.L., Tran-Son-Tay, R., Schoonover, C., Davis, P.S., Allen, S.D., Shyy, W., *Rapid Prototyping of Micropatterned Substrates using Conventional Laser Printer*. Journal of Material Research, 2002. **17**(7): p. 1559-1562.
- [13] Love, J.C., Wolfe, D.B., Jacobs, H.O., Whitesides, G.M., *Microscope Projection Photolithography for Rapid-Prototyping of Masters with Micro-scale Features for use in Soft Lithography*. Langmuir, 2001. **17**: p. 6005-6012.

- [14] Schmitz, T., Dagata, J., Dutterer, B., and Sawyer, W., *Nanolithography and Microfluidics: A Manufacturing Perspective*, 2003. Submitted to the Journal of Manufacturing Processes.
- [15] Tan, W., Fan, Z.H., Qiu, C.X., Ricco, A.J., Gibbons, I., *Miniaturized Electric Capillary Isoelectric focusing in Plastic Microfluidic Device*. *Electrophoresis*, 2002. **23**: p. 3638-3645.
- [16] Herr, A.E., Molho, J.I., Drouvalakis, K.A., Mikkelsen, J.C., Utz, P.J., Santiago, J.G., Kenny, T.W., *On-chip Coupling of Isoelectric Focusing and Free Solution Electrophoresis for Multidimensional Separations*. *Analytical Chemistry*, 2003. **75**: p. 1180-1187.
- [17] Gojo, R., Morimoto, Y., Takeuchi, S., *Quick and Easy Fabrication of Microfluidic Channels with Watersoluble Molds*. Institute of Industrial Science, The University of Tokyo. Japan. International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. October, 2008, San Diego, California, USA.
- [18] Daniel A. Bartholomeusz, Roland W. Boutté, Joseph D. Andrade. *Xurography: Rapid Prototyping of Microstructures Using a Cutting Plotter*. *Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 14, no.6, December 2005.
- [19] William C. Shiel, Jr., MD, FACP, FACR, Melissa Conrad Stöppler, MD. *Webster's New World™ Medical Dictionary*, 3rd Edition. New jersey, 2008.
- [20] Williams PL, Warwick R. *Gray's Anatomy*. 38th Edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1995. p. 1399-1450
- [21] Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 9ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 223-283
- [22] Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. 10th Edition. Philadelphia: WB Saunders Company; 2000. p. 264-278.
- [23] *Collier's Encyclopedia*. Macmillan. 1989. (Volume 4, 6 e 11).
- [24] Waite, L., Fine, J.. *Applied Biofluid Mechanics*. McGraw-Hill. USA. 2007.
- [25] Livraria digital *SCIENCEphotoLIBRARY*. Harrow Road, London. Disponível em: <http://www.sciencephoto.com/>. Consultado a 2 de Agosto de 2012.
- [26] Hoffbrand AV, Petit JE, Moss PAH. *Essential Hematology*. 4 th Edition. Massachussets: Blackwell Science; 2001. p.1-97.
- [27] Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper`s Illustred Biochemistry*. 26th Edition. New York: McGraw-Hill; 2003. p. 40-48.

- [28] Hoffbrand AV, Petit JE, Moss PAH. *Hematology*. 4 th Edition. Massachussets: Blackwell Science; 2001. p.113-288.
- [29] Standring . *Gray's Anatomy*. 39th Edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2004.
- [30] R. Lima, T. Ishikawa, Y. Imai, and T. Yamaguchi, *Blood flow behavior in microchannels: Past, current and future trends.*, Single and two-Phase Flows on Chemical and Biomedical Engineering (2010), pp. 1–2.
- [31] Waite, L., Fine, J.. *Applied Biofluid Mechanics*. McGraw-Hill. USA. 2007.
- [32] S. Rosa, *Sebenta teórica de biofluidos.*, ESTiG - IPB.
- [33] Santos, Nuno. *Estudo da Reologia de Fluidos Análogos ao Sangue*. BII. Faculdade de Engenharia do Porto. 2009.
- [34] Pinho, F.T.; *Alguns conceitos basicos de Hemodinamica; Biomecanica do Corpo Humano*. MIB, Departamento de Engenharia Mecanica, MIEM, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2009;
- [35] Goldsmith H., *Red cell motions and wall interactions in tube flow*. Federation Proceedings 1971, 30 (5) : 1578-1588.
- [36] Goldsmith, H., Marlow, J., *Flow behavior of erythrocytes*. II. Particles motions in concentrated suspensions of ghost cells, *Journal of Colloid and Interface Science* 1979, 71 (2): 383-407.
- [37] Parthasarathi A., Japee S., Pittman R., *Determination of red blood cell velocity by video shuttering and image analysis*. *Annals of Biomedical Engineering* 1999, 27: 313-325.
- [38] Chien, S., Usami, S., Skalak, R., *Blood flow in small tubes In: Handbook of Physiology – The cardiovascular system IV*, 1984, pp.217-249.
- [39] Maeda, N., *Erythrocyte rheology in microcirculation*. *Japanese Journal of Physiology* 1996, 46: 114.
- [40] Mchedlishvili, G., Maeda, N., *Blood flow structure related to red cell flow: a determination of blood fluidity in narrow microvessels*. *Japanese Journal of Physiology* 2001, 51: 19-30.

- [41] Gosstt, Daniel R., et al., et al. *Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems* . Los Angeles, USA : s.n., 25 de Abril de 2010.
- [42] Shevkoplyas, S.S., et al., et al. *Biomimetic autoseparation of leukocytes from whole blood in amicrofluidic device*. s.l. : Anal Chem, 2005.
- [43] Faivre, M., et al., et al. *Grometrical focusing of cells in a microfluidic device: an approach to separate blood plasma*. s.l. : Biorheology, 2006.
- [44] Sollier, E., et al., et al. *Chemical: passive microfluidic devices for plasma extraction from whole human blood*. 2009.