

**Desenvolvimento e estudo em microcanais de fluidos inovadores  
análogos ao sangue baseados em vesículas unilamelares gigantes**

**Denise Andreia Mota Carvalho**

Relatório Final do Trabalho de Projeto apresentado à

**Escola Superior de Tecnologia e Gestão**

**Instituto Politécnico de Bragança**

para obtenção do grau de Mestre em

**Tecnologia Biomédica**

Julho de 2016

**Desenvolvimento e estudo em microcanais de fluidos inovadores  
análogos ao sangue baseados em vesículas unilamelares gigantes**

**Denise Andreia Mota Carvalho**

Relatório Final do Trabalho de Projeto apresentado à

**Escola Superior de Tecnologia e Gestão**

**Instituto Politécnico de Bragança**

Para obtenção do grau de Mestre em

**Tecnologia Biomédica**

Este trabalho foi efetuado sob orientação de:

**Prof. Doutor Rui Alberto Madeira Macedo Lima (IPB/UMinho)**

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Elisabete M. S. Castanheira Coutinho (UMinho)**

Este trabalho foi realizado parcialmente na instituição:



**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências  
Centro de Física

“Este trabalho de projeto inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri”

Julho de 2016



*“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”*

*Mahatma Gandhi*



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Professor Rui Lima pela ajuda na escolha deste projeto de mestrado, bem como todo o apoio, disponibilidade, orientação, dedicação e simpatia que demonstrou durante o decorrer do mesmo. Gostaria ainda de lhe agradecer por acreditar sempre em mim e nas minhas capacidades para desenvolver este trabalho.

Agradeço igualmente à Professora Elisabete Castanheira Coutinho por me orientar neste projeto, por toda a disponibilidade e simpatia prestada e, acima de tudo, por continuar a acreditar em mim e no meu trabalho.

Não posso deixar de agradecer ainda à Professora Olga Ferreira por toda ajuda neste projeto também e por ter acreditado em mim desde o primeiro momento em que trabalhamos juntas.

Deixo também o meu agradecimento à Vera Faustino por toda ajuda que me prestou ao longo do desenvolvimento deste trabalho, uma vez que a sua ajuda foi essencial. Agradeço de igual forma à Rita Rodrigues pela ajuda que me deu e por todo o apoio quando o trabalho não corria como esperado. Agradeço ainda à Diana Pinho por estar sempre disponível para me ajudar em qualquer etapa do desenvolvimento deste trabalho.

Por último, agradeço à minha família, em especial aos meus pais e à minha irmã, mas de uma forma mais carinhosa e especial, agradeço à minha mãe por tudo que fez, faz e continua a fazer por mim, sem o apoio e a força que ela me transmite tudo teria sido muito mais difícil. Agradeço de igual forma ao meu namorado por todo o apoio que me deu e continua a dar, e mesmo quando as coisas se tornavam mais difíceis, nunca parou de me apoiar e incentivar. Agradeço ainda a todos os meus amigos e em especial aos amigos que fiz em Braga pelo apoio e pelos dias fantásticos que me proporcionaram ao trabalhar junto deles.



## Resumo

O escoamento sanguíneo é um dos temas de grande interesse para a comunidade científica. Assim, a busca de fluidos que sejam análogos ao sangue bem como o estudo do seu escoamento em microcanais, tal como acontece com o sangue nos capilares, continua a ser alvo de investigação.

Numa primeira fase deste trabalho, procedeu-se ao desenvolvimento de um modelo inovador para produzir glóbulos vermelhos artificiais, constituído por Vesículas Unilamelares Gigantes, vulgarmente designadas *Giant Unilamellar Vesicles* (GUVs), com três concentrações diferentes. Pretende-se que estas vesículas tenham um comportamento reológico idêntico ao escoamento dos glóbulos vermelhos (GVs) em microcanais, permitindo assim proceder a vários estudos hemodinâmicos. No desenvolvimento destas vesículas, foi verificado que as mais adequadas são constituídas por uma mistura natural de lípidos e lecitina de soja. Foi realizado um estudo relativamente à sua concentração, onde se verificou que, com o aumento da quantidade da lecitina de soja nas soluções, a concentração de GUVs tende a aumentar. Foi também realizado um estudo relativo aos diâmetros dos GUVs para verificar se estes se aproximavam em termos de tamanho dos GVs, onde foi verificado que a maioria dos GUVs possuem diâmetros com dimensões entre os 5 e 7  $\mu\text{m}$ , tal como os GVs. Foi ainda verificado que a solução com a menor concentração de lecitina de soja possui uma maior quantidade de GUVs com diâmetros entre os 5 e 7  $\mu\text{m}$ .

Na segunda fase, foi estudado experimentalmente o escoamento das três soluções de GUVs em microcanais hiperbólicos, com três caudais diferentes, com o objetivo de visualizar a Camada Livre de Células (CLC), determinar a deformação e estudar as velocidades destes. Foi verificado que existe a formação de CLC em todas as concentrações e que aumenta com o aumento do caudal. Relativamente à deformação, esta é bastante mais evidente na contração do microcanal onde a taxa de deformação é máxima. Para o caso da velocidade, foi observado um aumento bastante significativo e linear da velocidade na região da contração do microcanal hiperbólico e uma velocidade baixa e aproximadamente constante a montante e jusante da contração.

Por fim, foi também realizado o estudo reológico dos GUVs, de forma a investigar se estes têm uma viscosidade próxima do sangue. Foi verificado que os GUVs apresentam uma viscosidade inferior à do sangue total e que existe um ligeiro aumento da viscosidade dos GUVs com o aumento da sua concentração. Por último, também foi efetuada uma comparação da viscosidade da solução de GUVs com uma solução de 5% de Hematócrito (Hct) em soro fisiológico, onde foi verificado que ambas as viscosidades são muito próximas.

**Palavras-chave:** Análogos ao sangue, vesículas unilamelares gigantes, escoamento em microcanais, deformação de células, camada livre de células, microcirculação, hemo-reologia.

# Abstract

The blood flow is one of the major topics for the scientific community. The finding of fluids which are similar to the human blood and the study of their flow in microchannels, as it happens in blood vessels, is still under research.

Firstly, it was developed an innovative model to replace red blood cells (RBCs), made by Giant Unilamellar Vesicles (GUVs), with three different concentrations. It was expected that these vesicles had a behavior identical to the flow of RBCs, allowing the possibility to make more studies. During the development of these vesicles, it was observed that the better ones are the ones made of a blend of natural lipids and soy lecithin. In addition, a study to investigate the concentration of GUVs was made and we have observed that the concentration increases as the quantity of soy lecithin increase in the solution. Another study was made to compare the GUVs diameters with the size of the human RBCs. In this latter study it was shown that GUVs have diameters between 5 to 7 $\mu\text{m}$ , like the majority of the human RBCs and with a lower quantity of soy lecithin, the solution has a higher concentration of GUVs with the previous diameters.

Secondly, it was conducted an experimental study of the flow of three GUVs solutions in microchannels, with three different volumes with the objective of observing the existence of the Cell Free Layer (CFL), the existence of deformation and to study the GUVs velocities. It has been observed the existence of CFL for all the tested concentrations. However, the CFL increases as the volume increases. Regarding the deformation, it is higher at the contraction region of the hyperbolic microchannel. As for the velocity, it has been observed a major linear increase at the hyperbolic contraction region and a nearly constant velocity at the upstream and downstream of the microchannel.

Lastly, another study was made concerning the rheology behavior of the GUVs. It was shown that they have low viscosity and viscosity tends to increase as the concentration increases. Moreover, it was made a comparison between the GUVs solution viscosity and a saline solution with low Hematocrit (Hct). The results have shown that both viscosities were in close agreement.

**Keywords:** Blood analogues, Giant Unilamellar Vesicles, blood flow in microchannels, cell deformability, cell free layer, microcirculation, hemorheology.



# Conteúdo

Resumo .....	v
Abstract .....	vii
Conteúdo .....	ix
Lista de abreviaturas .....	xi
Lista de tabelas.....	xiii
Lista de figuras.....	xv
Capítulo 1 - Introdução .....	1
1.1 - Motivação e objetivos .....	3
1.2 - Estrutura da tese.....	4
Capítulo 2 - Revisão da literatura .....	5
2.1 - Desenvolvimento de partículas análogas aos glóbulos vermelhos .....	7
2.2 - Escoamento em microcanais.....	11
2.3 - Reologia .....	15
2.3.1 - Comportamento dos fluidos .....	15
2.3.2 - Velocidade de escoamento .....	16
2.3.3 - Comportamento reológico em microcanais.....	17
Capítulo 3 - Preparação e caracterização de GUVs.....	19
3.1 - Materiais e métodos de preparação.....	21
3.1.1 - Método experimental A .....	21
3.1.2 - Método experimental B .....	22

3.1.3	- Método experimental C .....	24
3.2	- Resultados e discussão .....	25
3.3	- Caracterização dos GUVs.....	28
3.3.1	- Fração volúmica .....	28
3.3.2	- Diâmetros .....	29
Capítulo 4	- Estudo do escoamento em microcanais e reologia dos GUVs.....	31
4.1	- Materiais e métodos .....	33
4.1.1	- Microcanais utilizados.....	33
4.1.2	- Equipamento de visualização dos escoamentos em microcanais .....	34
4.1.3	- <i>Software</i> utilizado para a análise de imagens .....	34
4.1.4	- Equipamento de estudo da reologia.....	39
4.2	- Resultados experimentais e discussão .....	40
4.2.1	- Camada Livre de Células (CLC) .....	40
4.2.2	- Deformação dos GUVs.....	42
4.2.3	- Velocidade dos GUVs .....	45
4.2.4	- Reologia dos GUVs .....	50
Capítulo 5	- Conclusões e trabalho futuro .....	53
5.1	- Conclusões .....	55
5.2	- Trabalho futuro .....	56
Referências	.....	57
Anexo A.	Imagens obtidas através do <i>software Image J</i> para o estudo da densidade .....	65
Anexo B.	Imagens obtidas através do <i>software Image J</i> para o estudo dos diâmetros .....	69

# Lista de abreviaturas

CLC – Camada Livre de Células

DODAB – brometo de dioctadecil-dimetilamônio (iniciais do nome em inglês)

GUVs – Vesículas Unilamelares Gigantes (iniciais do nome em inglês)

GVs – Glóbulos Vermelhos

Hct – Hematócrito

NaOH – Hidróxido de Sódio

N. D.\* – Não disponível

Trizma<sup>®</sup> base – 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol



## **Lista de tabelas**

**Tabela 1** - Reagentes utilizados na preparação dos GUVs, pelo método A..... 21

**Tabela 2** - Reagentes utilizados na preparação dos GUVs, pelo método B..... 23

**Tabela 3** - Reagentes utilizados na preparação dos GUVs, pelo método C..... 24



## Lista de figuras

- Figura 1** - Esquema ilustrativo do processo fundamental de auto-organização de moléculas individuais de fosfolípidos (a) em bicamadas membranares (b), seguido de uma transformação em lipossomas (c). Uma única bicamada apresenta normalmente ~ 5 a 7 nm de espessura e consiste em moléculas lipídicas individuais dispostas ordenadamente, com as suas caudas hidrofóbicas frente a frente, e as suas cabeças hidrofílicas viradas para o meio aquoso interno e externo (d). Figura conforme [4]..... 8
- Figura 2** - Representação esquemática da classificação vulgarmente aplicada para os lipossomas. Vesículas unilamelares pequenas (~ 0,02 µm a ~ 0,2 µm), vesículas unilamelares grandes (~0,2 µm a ~1 µm) e vesículas unilamelares gigantes (> 1 µm) são os três grupos mais importantes para aplicações analíticas. Os desenhos não estão à escala. Adaptado de [4]. ..... 9
- Figura 3** - Representação esquemática dos métodos de preparação de GUVs. Figura conforme [6]. ..... 10
- Figura 4** - Componentes de um dispositivo com um microcanal de secção quadrada. Figura conforme [7]. ..... 12
- Figura 5** - Diagrama esquemático descrevendo o procedimento de fabricação de microcanais circulares em PDMS e da técnica de micro-visualização usado para medir o escoamento sanguíneo. Figura conforme [8]..... 13
- Figura 6** - Diagrama que mostra os componentes do dispositivo de microcanal. Figura conforme [10]. ..... 14
- Figura 7** – Comportamento dos diferentes fluidos sujeitos a tensão de corte. Adaptado de [20]. ..... 16
- Figura 8** - Representação dos perfis de velocidade para Hct < 1 % e Hct superior. Figura conforme [21]. ..... 17

<b>Figura 9</b> - a) Efeito de Faharaeus em capilares de vidro; b) Distribuição do Hct. Figura conforme [21].	17
<b>Figura 10</b> - Efeito de Faharaeus-Lindqvist. Variação da viscosidade em função do diâmetro do microcanal. Figura conforme [21].	18
<b>Figura 11</b> - GUVs obtidos a partir do método experimental A: a) GUVs espontâneos preparados em água ultrapura; b) GUVs espontâneos preparados em solução tampão.	25
<b>Figura 12</b> - GUVs obtidos a partir do método experimental B.	26
<b>Figura 13</b> - GUVs obtidos a partir do método experimental C com três concentrações de lecitina de soja diferentes: a) $C = 1 \times 10^{-3}$ M; b) $C = 2 \times 10^{-3}$ M; c) $C = 4 \times 10^{-3}$ M.	27
<b>Figura 14</b> - Fração volúmica dos GUVs em função da concentração de lecitina de soja.	29
<b>Figura 15</b> - Diâmetro dos GUVs para a solução C1.	29
<b>Figura 16</b> - Diâmetro dos GUVs para a solução C2.	30
<b>Figura 17</b> - Diâmetro dos GUVs para a solução C3.	30
<b>Figura 18</b> – Esquema ilustrativo de uma visão de topo do microcanal. Adaptado de [32].	33
<b>Figura 19</b> - Equipamentos utilizados para a medição e visualização dos escoamentos: a) microscópio invertido (IX71, Olympus); b) câmara de alta velocidade (Olympus); c) bomba de seringa (Harvard Apparatus).	34
<b>Figura 20</b> - Esquematização do procedimento para o comando Z-Project.	35
<b>Figura 21</b> - Esquematização do procedimento para o comando Image Calculator.	36
<b>Figura 22</b> - Esquematização do procedimento para o comando Brightness/Contrast.	37
<b>Figura 23</b> - Esquematização do procedimento para o comando Threshold.	38

<b>Figura 24</b> - Esquemática do procedimento para o comando MTrackJ.....	38
<b>Figura 25</b> - Reómetro Bohlin CVO. ....	39
<b>Figura 26</b> - Imagens obtidas através do <i>software Image J</i> para a determinação da CLC a jusante da contração hiperbólica dos GUVs da solução C1, caudal 1 µl/min: a) Imagem Original; b) Imagem com intensidade máxima; c) Imagem com a intensidade máxima e determinação da CLC através de linhas paralelas ao longo do canal e apresentando o seu perfil no gráfico. ....	41
<b>Figura 27</b> - CLC das soluções de GUVs para cada um dos três caudais em função da concentração de lecitina de soja. ....	42
<b>Figura 28</b> - Imagens obtidas através do <i>software Image J</i> para o estudo da deformação dos GUVs da solução C1, caudal 1 µl/min: a) Imagem Original; b) Imagem com mediana; c) Imagem da subtração da imagem original pela imagem com a mediana através do plugin Image Calculator; d) Imagem subtraída aplicando o plugin Brightness/Contrast e Threshold. ....	43
<b>Figura 29</b> - Índice de deformação dos GUVs ao longo do microcanal para a solução C1 e nos três caudais estudados.....	44
<b>Figura 30</b> - Índice de deformação dos GUVs ao longo do microcanal para a solução C2 e nos três caudais estudados.....	44
<b>Figura 31</b> - Índice de deformação dos GUVs ao longo do microcanal para a solução C3 e nos três caudais estudados.....	44
<b>Figura 32</b> - Imagens obtidas através do <i>software Image J</i> para o estudo da velocidade dos GUVs da solução C1, caudal 1 µl/min: a) e b) Imagens Originais; c) e d) Imagens com mediana; e) e f) Imagens da subtração das imagens originais pelas imagens com a mediana através do plugin Image Calculator; g) e h) Imagens subtraídas aplicando o plugin Brightness/Contrast e Threshold e com o estudo da velocidade através do plugin MTrackJ.....	47

<b>Figura 33</b> - Velocidade dos GUVs para a solução C1 e caudal 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ : a) Montante da contração; b) Jusante da contração. ....	48
<b>Figura 34</b> - Velocidade dos GUVs para a solução C1 e caudal 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ : a) Montante da contração; b) Jusante da contração. ....	49
<b>Figura 35</b> - Velocidade dos GUVs para a solução C1 e caudal 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ : a) Montante da contração; b) Jusante da contração. ....	49
<b>Figura 36</b> - Viscosidade das soluções de GUVs em função da concentração de lecitina de soja: a) Tensão de corte em função da taxa de deformação; b) Viscosidade em função da taxa de deformação. ....	50
<b>Figura 37</b> - Viscosidade da solução de GUVs C1 e de 5 % de Hct em soro fisiológico. ....	51

# **Capítulo 1 - Introdução**



## **1.1 - Motivação e objetivos**

Um dos biofluidos mais importantes do ser humano é o sangue, pois este está presente em várias funções do organismo contribuindo assim para a sua homeostasia. O sangue é um fluido complexo que transporta inúmeras substâncias importantes para os tecidos celulares e órgãos do corpo [1].

Na base do fluxo microreológico e das propriedades do sangue a um nível microscópico está o comportamento das células individuais do sangue e as suas interações a nível da microcirculação, que compreende as pequenas veias, artérias e capilares. Assim sendo, na microcirculação é importante estudar o comportamento do sangue a nível celular [2].

Para a maioria dos estudos sobre o sangue, principalmente reológicos, utilizam-se fluidos análogos do sangue, pois estes possuem propriedades físicas muito próximas das do sangue, como é o caso da viscosidade, densidade e índice de refração.

São várias as características vantajosas destes análogos do sangue, para além das citadas anteriormente, desde a sua não toxicidade, o seu baixo custo e a sua transparência. Estes fluidos apresentam características reológicas semelhantes às do sangue humano e são na maioria das vezes baseados em soluções de polímeros [1].

Este estudo pretende contribuir para melhorar o conhecimento do escoamento sanguíneo em arteríolas e capilares; assim, torna-se fulcral o desenvolvimento de fluidos análogos ao sangue. Esta necessidade deve-se ao fato do sangue ser um fluido muito complexo e que necessita de cuidados especiais na sua colheita, manuseamento e armazenamento. Apesar da sua utilização em pequenas quantidades ser bastante comum em estudos laboratoriais, o mesmo não acontece quando se pretende utilizar grandes quantidades deste biofluido.

Assim, para estudos que envolvam grandes volumes, torna-se necessário e importante o desenvolvimento de fluidos com características reológicas semelhantes ao sangue. Um destes estudos é o escoamento em microcanais, tal como acontece com o sangue nas arteríolas e nos capilares. Tendo em conta esta realidade, o principal objetivo deste trabalho

é o desenvolvimento de fluidos inovadores análogos ao sangue baseados em vesículas unilamelares gigantes e o estudo do seu escoamento em microcanais.

## **1.2 - Estrutura da tese**

Para este trabalho, foi implementada uma metodologia experimental composta por diversas etapas, as quais estão descritas nos vários capítulos deste relatório.

No presente capítulo, capítulo 1, é feita uma introdução ao tema em estudo neste trabalho, onde se apresentam os objetivos do mesmo e a sua estrutura.

No capítulo 2 é feita uma revisão da literatura, onde são descritos os principais fundamentos teóricos deste trabalho, assim como trabalhos que já foram desenvolvidos anteriormente nesta área de estudo.

No capítulo 3, apresentam-se os protocolos de preparação dos GUVs, com as várias formulações testadas e alterações às mesmas, a fim de que estes possuam as características tanto físicas como reológicas idênticas aos GV. Neste mesmo capítulo, também é feita a caracterização dos GUVs em termos de concentração e diâmetros.

No capítulo 4 descrevem-se detalhadamente os ensaios de escoamento realizados com os GUVs em microcanais, a fim de se estudar vários parâmetros de escoamento, tais como o índice de deformação, a espessura da CLC e a velocidade dos GUVs. Neste capítulo, apresentam-se também vários resultados reológicos dos fluidos análogos ao sangue desenvolvidos neste trabalho.

Por fim, no capítulo 5, apresentam-se as principais conclusões obtidas com o desenvolvimento deste trabalho, bem como algumas sugestões de trabalho futuro.

## **Capítulo 2 - Revisão da literatura**



## 2.1 - Desenvolvimento de partículas análogas aos glóbulos vermelhos

O desenvolvimento e estudo de fluidos análogos ao sangue continua a chamar muito a atenção de investigadores por todo o mundo, pois conseguir um fluido análogo com as características tanto físicas como reológicas, do sangue seria de extrema relevância.

Contudo, não seria um fluido totalmente eficaz se não possuísse na sua composição elementos celulares, como é o caso dos GVs do sangue, que realizam funções indispensáveis à vida, como o transporte de gases e nutrientes por todo o corpo, e que têm a capacidade de se deformarem para continuar o seu escoamento até no capilar mais estreito do nosso corpo. Assim, não se pode pensar apenas no desenvolvimento do fluido como um todo; também é necessário focalizar a nossa atenção nos elementos celulares presentes no sangue humano e tentar recriá-los experimentalmente.

Trabalhos anteriores de outros autores [3], estudaram vários fluidos análogos ao sangue contendo partículas de poliestireno e polimetilmetacrilato, com o objetivo de recriar o escoamento dos GVs. No entanto, estas partículas apresentam uma grande desvantagem, que é o facto de serem rígidas e em escoamento não se comportarem da mesma maneira que os GVs. Para se ultrapassar esta desvantagem, optou-se por tentar preparar laboratorialmente formulações que tivessem um comportamento mais próximo dos GVs.

Focados em alcançar este objetivo, este trabalho centrou-se no desenvolvimento de sistemas preparados laboratorialmente, as vesículas unilamelares gigantes (*Giant Unilamellar Vesicles*, GUVs), a fim de que estes tivessem um comportamento em escoamento muito próximo dos GVs. Por essa razão, de seguida, aborda-se alguns conceitos tais como, os lipossomas existentes, de entre eles os GUVs, a constituição destes, como podem ser desenvolvidos e algumas das suas aplicações.

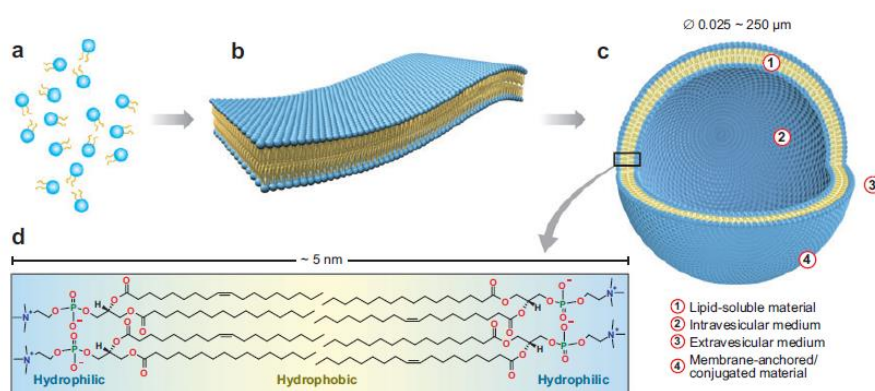
### Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs)

Os lipossomas, na sua generalidade, são estruturalmente e funcionalmente alguns dos mais versáteis agregados supramoleculares existentes [4].

A primeira observação de lipossomas, foi feita por *Bangham* e colegas no ano de 1965 [4], onde efetivamente determinaram o caráter de membrana lipídica fechada e a sua similaridade com a membrana das células biológicas. Desde esse momento que, na literatura, se tornou comum encontrar tópicos relacionados com os lipossomas [4].

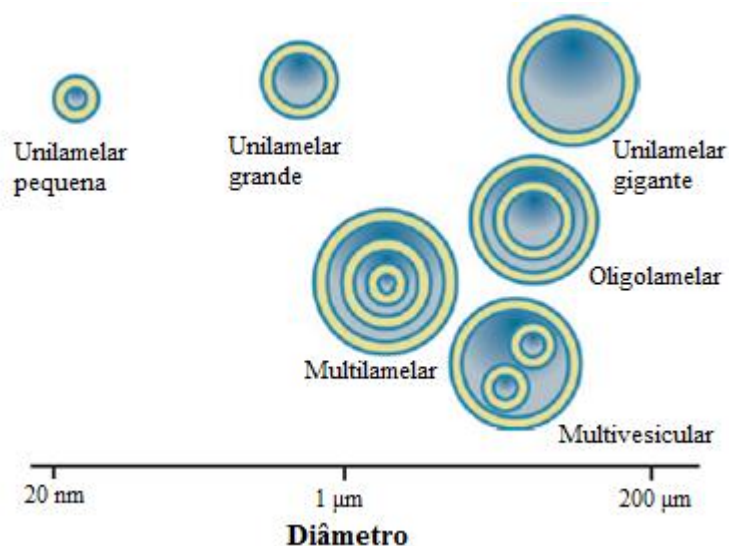
Os lipossomas têm sido alvo de intensa investigação e aplicações nos mais diversos campos, devido à natureza das vesículas lipídicas e à sua relevância em ambientes biológicos. Realizados vários estudos, verificou-se que os lipossomas são partículas esféricas de matéria macia, constituídos por uma ou mais bicamadas membranares normalmente compostas por fosfolípidos, que encapsulam um volume interior aquoso. Normalmente, este meio aquoso é o mesmo onde os lipossomas estão suspensos; contudo, este pode ser trocado individualmente, por exemplo, por microinjeção ou diálise [4].

Os lipossomas são facilmente preparados em laboratório. Na formação destes, moléculas de lípidos dissolvidos, constituídos por um grupo hidrofílico (a “cabeça”) e um grupo hidrofóbico (a “cauda”), formam um agregado molecular organizado em bicamadas lipídicas. Os lipossomas, como análogos de membranas naturais, são geralmente formados pela auto-organização espontânea de lípidos puros ou de misturas de lípidos. A Figura 1 descreve esquematicamente o processo fundamental de agregação, neste caso de uma vesícula unilamelar [4].



**Figura 1** - Esquema ilustrativo do processo fundamental de auto-organização de moléculas individuais de fosfolípidos (a) em bicamadas membranares (b), seguido de uma transformação em lipossomas (c). Uma única bicamada apresenta normalmente ~ 5 a 7 nm de espessura e consiste em moléculas lipídicas individuais dispostas ordenadamente, com as suas caudas hidrofóbicas frente a frente, e as suas cabeças hidrofílicas viradas para o meio aquoso interno e externo (d). Figura conforme [4].

De um ponto de vista morfológico, os lipossomas são frequentemente classificados pela sua dimensão e pelo número de bicamadas membranares (lamelas), como se pode observar na Figura 2.



**Figura 2** - Representação esquemática da classificação vulgarmente aplicada para os lipossomas. Vesículas unilamelares pequenas ( $\sim 0,02 \mu\text{m}$  a  $\sim 0,2 \mu\text{m}$ ), vesículas unilamelares grandes ( $\sim 0,2 \mu\text{m}$  a  $\sim 1 \mu\text{m}$ ) e vesículas unilamelares gigantes ( $> 1 \mu\text{m}$ ) são os três grupos mais importantes para aplicações analíticas. Os desenhos não estão à escala. Adaptado de [4].

As vesículas unilamelares têm um interesse especial na investigação, devido às suas propriedades membranares bem caracterizadas e à sua preparação fácil. Elas são divididas em três tipos de tamanhos: pequenas, grandes e gigantes. Processos controlados para a formação de vesículas oligolamelares são raros. Contudo, foi já relatado um exemplo de transformação induzida de um agregado polimérico de unilamelar a bilamelar [5]. As vesículas multilamelares mostram, muitas vezes, propriedades físicas e comportamento que são muito diferentes de espécies unilamelares [4].

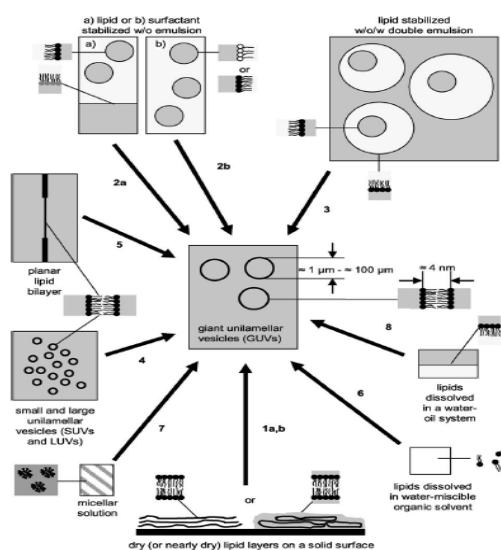
Tal como referido anteriormente, as vesículas unilamelares, devido às suas características membranares bem conhecidas e à sua fácil preparação, são muito utilizadas em investigação e aplicações. Para o desenvolvimento deste trabalho, com a necessidade de conseguir formulações em ambiente laboratorial com propriedades próximas dos GVs, também se utilizaram as vesículas unilamelares. Atendendo ao objetivo de obter sistemas com propriedades próximas dos GVs, teve-se em atenção o tipo de vesículas mais adequado para os estudos a desenvolver. Tendo em atenção a classificação dos lipossomas

(Figura 2), concluiu-se que as vesículas que mais se aproximavam, em termos de tamanho, dos GV's seriam as vesículas unilamelares gigantes (GUV's), pois estas podem apresentar um diâmetro superior a 1  $\mu\text{m}$ , o que é ideal, pois o tamanho médio dos GV's humanos é cerca de 6 a 7  $\mu\text{m}$ .

São diversos os métodos descritos para a preparação de GUV's, tais como [6]:

- a) Hidratação de um filme lipídico (método 1);
- b) A partir de um lípido estabilizador (método 2a) ou formação a partir de uma emulsão estabilizadora água-em-óleo (*water in oil, w/o*) de tensoativo (método 2b);
- c) A partir de uma dupla emulsão w/o/w de um lípido estabilizado (método 3);
- d) A partir da fusão de pequenas vesículas (método 4);
- e) A partir de uma bicamada inicialmente planar (método 5);
- f) Usando lípidos dissolvidos num solvente miscível com a água (método 6);
- g) A partir de uma solução micelar de lípidos (método 7); e ainda
- h) Usando um método relacionado com o método 3, que consiste na remoção de um "óleo" volátil (em geral, um solvente não polar), a partir de uma dupla emulsão w/o/w (método 8).

Na Figura 3 estão representados esquematicamente todos os métodos de preparação.



**Figura 3** - Representação esquemática dos métodos de preparação de GUV's. Figura conforme [6].

Hoje em dia, as tecnologias derivadas de lipossomas são estabelecidas como um dos pilares da bionanotecnologia, pois a versatilidade única destas vesículas no que diz respeito à variedade de tamanho, composição e a capacidade de incorporação e encapsulamento, levou a que estas vesículas lipídicas fossem aplicadas em análises químicas e bioquímicas e até aplicações em escala industrial, como é o caso da administração de medicamentos, em cosméticos, na tecnologia dos alimentos e em proteômica [4].

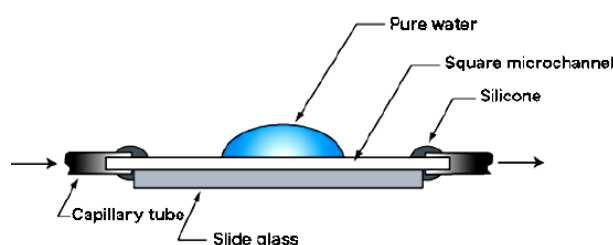
Contudo, como o nosso estudo recai sobre os GUVs, é importante focar algumas das suas aplicações. Estes podem ser usados para várias finalidades, tais como: na investigação no campo das proteínas membranares; como sistemas de modelos simples para o estudo físico-químico de certas propriedades das membranas biológicas; também servem para realizar estudos sobre o efeito de substâncias antimicrobianas; são utilizados ainda em investigação que visa preparar sistemas que possuem pelo menos algumas das características básicas de células-vivas; e ainda podem ser aplicados no campo dos biossensores [6].

## **2.2 - Escoamento em microcanais**

Tal como foi referido anteriormente na secção 2.1, para além de se tentar desenvolver um fluido análogo ao sangue, também se pretendem desenvolver laboratorialmente formulações que tenham um comportamento próximo dos elementos celulares no sangue, neste caso dos GVs. Contudo, para se perceber o comportamento destas novas formulações e se se aproximam dos GVs em escoamento torna-se fulcral ter estruturas que simulem as nossas veias e artérias. Assim sendo, posteriormente são abordados estudos envolvendo o escoamento sanguíneo em microcanais e diferentes técnicas para a fabricação de microcanais.

A medição detalhada do perfil da velocidade do escoamento sanguíneo em microcanais *in vitro*, é de extrema importância para entender diversos fenómenos fisiológicos da microcirculação [7]. São vários os investigadores que se têm focado neste tipo de estudos, melhorando cada vez mais os microcanais fabricados de modo a que o escoamento seja o mais próximo possível do escoamento sanguíneo realizado em ambientes *in vivo*.

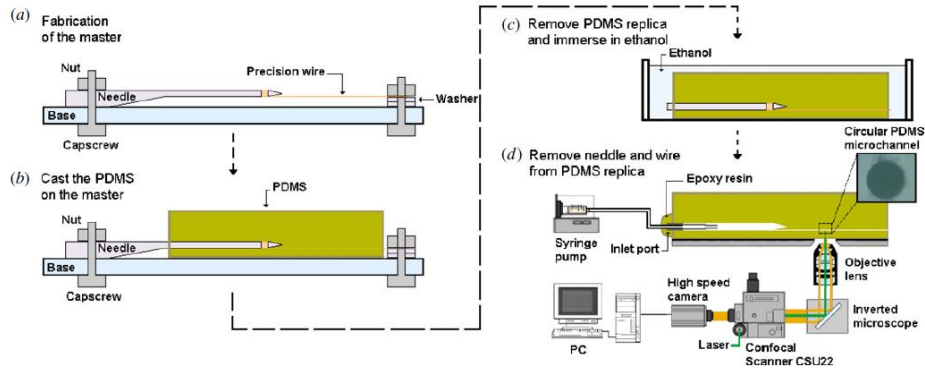
Existem vários estudos que descrevem diversas formas de fabricação e escoamentos em microcanais. Fazendo uma breve revisão bibliográfica, tem-se em 2006 um estudo que se focou na medição das velocidades de escoamento sanguíneo em capilares de secção quadrada, ou seja, mediu-se o escoamento de glóbulos vermelhos suspensos num fluido fisiológico dentro de um microcanal com secção quadrada usando um sistema micro-PTV confocal e comparou-se com água destilada. Para a fabricação deste microcanal, colocou-se o capilar de vidro quadrangular em cima de uma lamela, colocando-se em cada ponta do microcanal um tubo *tygon* vedado com silicone, tal como é ilustrado na Figura 4 [7].



**Figura 4** - Componentes de um dispositivo com um microcanal de secção quadrada. Figura conforme [7].

Recentemente, em 2009 [8], foi realizado um estudo que se centrava essencialmente na visualização do escoamento de dextrano 40, contendo várias percentagens de hematócritos, mas desta vez em microcanais circulares de poli(dimetilsiloxano) (PDMS). A fabricação destes microcanais consistiu em quatro passos essenciais. Em primeiro lugar (a), fabricou-se o molde usando uma base de acrílico, uma agulha, parafusos, porcas e anilhas ou vários anéis de vedação. Fios de precisão foram inseridos dentro de uma agulha e esticados através da rotação de um parafuso. Dependendo dos diâmetros e das características requeridas, os materiais testados foram aço inoxidável, alumínio ou poliéster (Riken). De seguida (b), o pré-polímero de PDMS foi preparado através de uma mistura de um pré-polímero comercial e um catalisador (184 Silpot; Dow Corning, EUA), numa razão ponderal de 10:1. A mistura de PDMS foi vazada para o molde e curado numa placa quente cerca de 2 horas a uma temperatura de 60 °C. Tanto o molde como o PDMS foram, em seguida, arrefecidos até à temperatura ambiente e o PDMS foi retirado do molde. Posteriormente (c), o PDMS contendo a agulha e o fio de precisão foram imersos em etanol durante um período de 1-4 horas, a 4 °C. Este processo é extremamente importante, a fim de permitir uma extração suave do fio de precisão. Por fim (d), a agulha e o fio

foram retirados com cuidado [8]. O procedimento de fabricação encontra-se ilustrado na Figura 5.

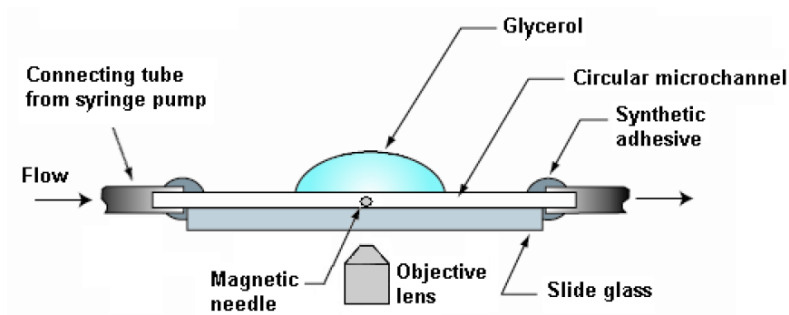


**Figura 5** - Diagrama esquemático descrevendo o procedimento de fabricação de microcanais circulares em PDMS e da técnica de micro-visualização usado para medir o escoamento sanguíneo. Figura conforme [8].

Em complemento ao estudo descrito anteriormente, em 2009, foi utilizada a mesma técnica de fabricação dos microcanais com um objetivo diferente. Para além de se visualizar o escoamento de dextrano 40 com várias percentagens de hematócritos, também se fez a medição da camada de plasma e as trajetórias dos GVs, usando um sistema de micro-PTV confocal [9].

Mais recentemente, em 2012, foi realizado um estudo para medir o comportamento do fluxo de nanopartículas magnéticas através de um microcanal de 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Para criar o campo magnético utilizou-se um íman permanente externo, tal como ilustrado na Figura 6. Utilizando um sistema de micro-PTV, foi possível medir o comportamento do fluxo de nanopartículas magnéticas para diferentes caudais e campos magnéticos. O fluido usado para este estudo foi uma solução aquosa de Dextrano 40, contendo nanopartículas magnéticas com 25 nm de diâmetro. O microcanal utilizado para este estudo foi

um microcanal de vidro com 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro colocado numa lâmina, onde um tubo *tygon* foi utilizado para a entrada e a saída do fluido [10].



**Figura 6** - Diagrama que mostra os componentes do dispositivo de microcanal. Figura conforme [10].

A técnica de litografia suave é o método mais utilizado para fabricar microcanais transparentes e de secção retangular. Este tipo de microcanais têm sido bastante utilizados para estudar o escoamento e deformação das células sanguíneas [8, 11-14].

Estudos mais recentes [15-17] utilizaram uma técnica mais económica para a fabricação de microcanais em PDMS, a xurografia. Em comparação com a litografia suave, esta técnica usa materiais e equipamentos utilizados na indústria de impressão, tal como *plotters* de corte e vinil. Na xurografia as geometrias são desenhadas recorrendo ao *software* CAD e, posteriormente, os moldes são fabricados em vinil, através de uma *plotter* de corte. Estes moldes são usados para a fabricação dos microcanais em PDMS. A xurografia apresenta como principais vantagens ser uma técnica rápida e pouco dispendiosa [15], [18].

Como se pode concluir pelos estudos citados anteriormente, ao longo do tempo tem havido um interesse cada vez maior da comunidade científica, em desenvolver microdispositivos que sirvam como ferramentas alternativas para realizar testes de escoamento, com a finalidade de ajudar no diagnóstico de doenças do foro cardíaco e cancerígeno. Assim, torna-se fundamental, compreender o escoamento sanguíneo neste tipo de microdispositivos [19].

O escoamento sanguíneo varia dentro do sistema circulatório, consoante os tecidos onde atravessa e as funções que exerce.

Este tipo de escoamento obedece aos princípios físicos do escoamento dentro de uma conduta, ou seja, ao princípio da conservação da massa, da energia e da quantidade de movimento. O sangue escoa devido à variação de pressão ao longo dos vasos sanguíneos gerada pelo coração; contudo, existem resistências ao escoamento do sangue que resultam das forças de corte exercidas no fluido pelas paredes dos vasos sanguíneos [20].

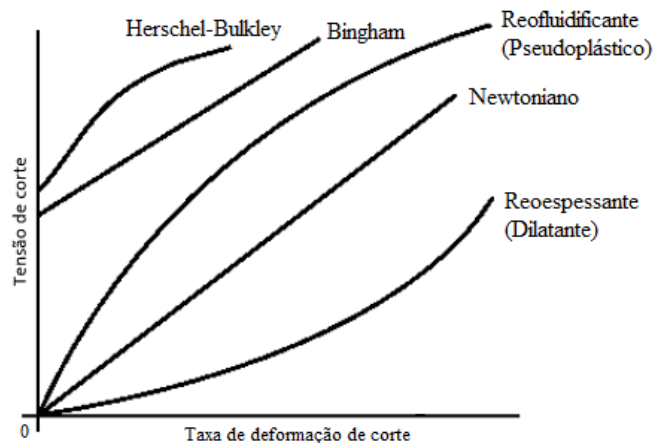
Um escoamento sanguíneo é um escoamento contínuo e oscilatório, que pode ser caracterizado de duas formas, como sendo laminar ou turbulento. O escoamento é laminar quando o fluido escoar em camadas ordenadas; logo, a velocidade tem, por norma, uma componente ao longo do eixo de escoamento. Neste tipo de escoamento o número de Reynolds ( $Re = \frac{\rho U D_H}{\mu}$ , em que  $\rho$  é a massa volúmica do fluido,  $U$  a velocidade média,  $D_H$  é o diâmetro hidráulico e  $\mu$  é a viscosidade do fluido) é inferior a 2300. O escoamento é considerado turbulento quando as partículas do fluido se movimentam de forma irregular; conseqüentemente, a velocidade tem componentes transientes transversais ao escoamento global do fluido. Num escoamento turbulento o número de Reynolds é superior a 2300 e a dissipação de energia é mais elevada que em escoamento laminar [20].

## **2.3 - Reologia**

Para além de conceber microdispositivos que sirvam como ferramentas alternativas para a realização de testes de escoamento, com o objetivo de ajudar no diagnóstico de doenças cardiovasculares e cancerígenas, também a compreensão do escoamento sanguíneo neste tipo de microdispositivos é muito importante, tema abordado na secção anterior (secção 2.2). Além disso, é fundamental ter conhecimentos sobre a reologia dos fluidos. Assim, de seguida, são abordados alguns conceitos sobre este tema.

### **2.3.1 - Comportamento dos fluidos**

Dependendo do comportamento dos fluidos, estes podem ser Newtonianos ou Não-Newtonianos. Os fluidos podem ser classificados com a relação entre a tensão de corte,  $\tau$ , e a taxa de deformação de corte,  $\gamma$ , como está demonstrado na Figura 7 [20].



**Figura 7** – Comportamento dos diferentes fluidos sujeitos a tensão de corte. Adaptado de [20].

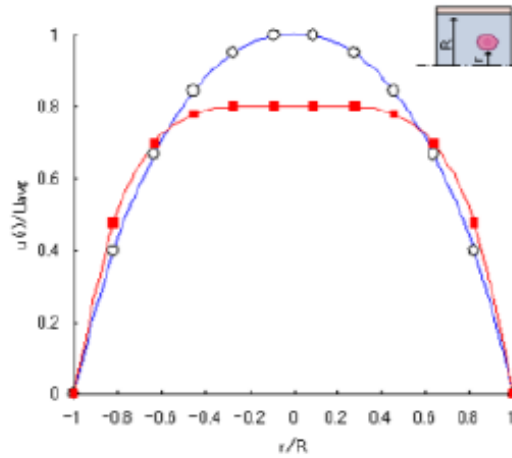
Os fluidos Newtonianos são fluidos que, para uma dada temperatura, mantêm a sua viscosidade em qualquer velocidade do escoamento. Uma vez que a sua viscosidade é constante, têm uma viscosidade ideal, ou seja, a variação da tensão de corte em relação ao gradiente de velocidade é linear.

Os fluidos Não-Newtonianos são fluidos em que a viscosidade varia com o grau de deformação exercido. Neste caso, a variação da tensão de corte em relação ao gradiente de velocidade é não linear. O sangue é um fluido Não-Newtoniano [20].

### 2.3.2 - Velocidade de escoamento

No decorrer dos anos, têm sido feitos vários estudos acerca da velocidade de escoamento do sangue que revelam resultados dispersos, refletindo a complexidade dos fenómenos que ocorrem na microcirculação. A dispersão dos resultados deve-se ao facto de a velocidade de escoamento ser afetada por vários parâmetros combinados, como é o caso do Hct, do diâmetro do microcanal, da taxa de deformação, do fluido em suspensão (plasma, soro fisiológico ou dextrano), e de erros experimentais, entre outros [21].

Goldsmith *et al.* [22] determinaram um perfil de velocidades para soluções diluídas, com um Hct de cerca de 1%, sendo que este perfil se aproxima de uma parabólica. Para Hcts superiores, o perfil de velocidades assemelha-se a um perfil tipo “pistão” (perfil horizontal perpendicular às paredes do microcanal), como se pode observar na Figura 8.

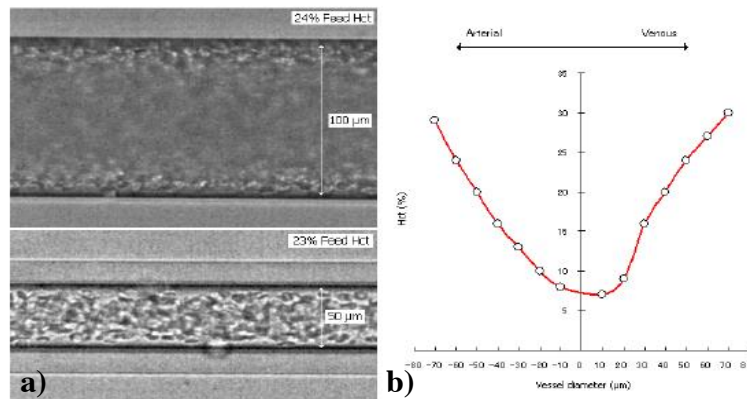


**Figura 8** - Representação dos perfis de velocidade para Hct < 1 % e Hct superior. Figura conforme [21].

### 2.3.3 - Comportamento reológico em microcanais

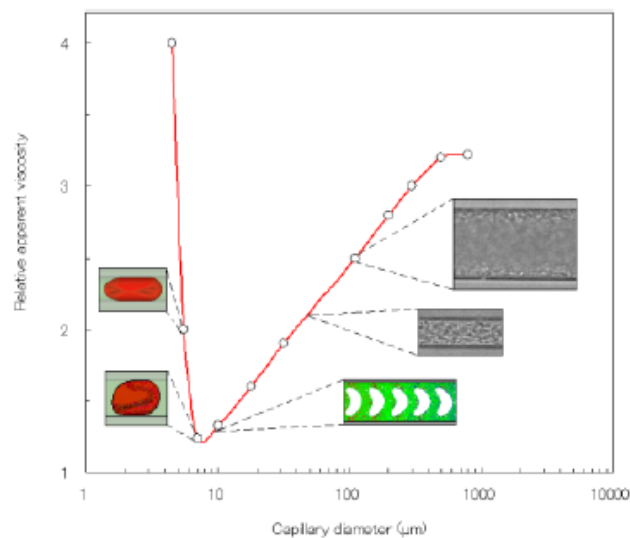
Investigações efetuadas para estudar o comportamento do sangue em microcanais com diferentes diâmetros e para diferentes Hcts, observou-se o efeito de Faharaeus e o efeito de Faharaeus-Lindqvist [21].

Faharaeus observou que para microcanais com diâmetro inferior a 300  $\mu\text{m}$  o comportamento sanguíneo e o Hct são fortemente afetados. Faharaeus demonstrou que para microcanais estreitos ocorre a migração axial dos GVs para o centro do microcanal e existe a formação de uma camada CLC junto das paredes. Na Figura 9 está demonstrado este efeito.



**Figura 9** - a) Efeito de Faharaeus em capilares de vidro; b) Distribuição do Hct. Figura conforme [21].

No efeito de Faharaeus-Lindqvist, que também ocorre em microcanais com diâmetro inferior a 300  $\mu\text{m}$ , observou-se que a viscosidade aparente decresce com a diminuição do diâmetro do microcanal. Contudo, na Figura 10 pode observar-se que, para microcanais com diâmetros inferiores a 7  $\mu\text{m}$ , o efeito de Faharaeus-Lindqvist é invertido, devido à dificuldade dos GVs (7 a 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro) escoarem em canais com diâmetros inferiores a 7  $\mu\text{m}$ .



**Figura 10** - Efeito de Faharaeus-Lindqvist. Variação da viscosidade em função do diâmetro do microcanal. Figura conforme [21].

Em termos gerais, o efeito de Faharaeus-Lindqvist pode ser explicado pela formação de uma CLC junto às paredes do microcanal, pela diminuição do Hct e consequente diminuição da viscosidade. A existência da CLC reduz o atrito entre os GVs e as paredes do microcanal e, conseqüentemente, diminui a resistência ao escoamento, contribuindo assim para a redução da viscosidade do sangue [21].

## **Capítulo 3 - Preparação e caracterização de GUVs**



Neste capítulo descreve-se a primeira etapa do trabalho que consistiu no estudo dos melhores métodos de preparação de GUVs e na sua caracterização em termos de tamanho e densidade. Em primeiro lugar, na secção 3.1, é feita uma descrição dos três métodos experimentais testados:

- Método de preparação de GUVs espontâneos de DODAB em solução aquosa, usado por Alves *et al.* [23] (Método A);
- Método de preparação de GUVs por hidratação de um filme lipídico e posterior incubação numa solução de glucose – método descrito em Tamba *et al.* [24] e em Tanaka *et al.* [25] (Método B);
- Método de preparação de GUVs por hidratação de um filme lipídico utilizado por Baptista *et al.* [26] (Método C).

Em seguida, na secção 3.2, comparam-se os resultados obtidos pelos três métodos usados, discutindo quais os GUVs mais adequados para simular o comportamento dos GVs.

Finalmente, na secção 3.3, faz-se a caracterização do tamanho e da fração volúmica dos GUVs selecionados na etapa anterior.

### 3.1 - Materiais e métodos de preparação

#### 3.1.1 - Método experimental A

##### 3.1.1.1 - *Reagentes utilizados*

Na Tabela 1, estão representados todos os reagentes utilizados para a preparação dos GUVs no método experimental A.

**Tabela 1** - Reagentes utilizados na preparação dos GUVs, pelo método A.

Composto	Fórmula Química	Peso Molecular	Pureza	Fabricante
Brometo de dioctadecil-dimetilamónio (DODAB)	C <sub>38</sub> H <sub>80</sub> NBr	630,95 g/mol	99 %	Avanti® Polar Lipids, Inc.
Trizma® base	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	121,14 g/mol	99.9 %	Sigma-Aldrich®
Vermelho de Nilo ( <i>Nile Red</i> )	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	318,37 g/mol	99.9 %	Fluka®

### 3.1.1.2 - Procedimento

Em primeiro lugar, preparou-se uma solução tampão num balão volumétrico de 250 ml, pesando 0,3025 g de Trizma<sup>®</sup> base numa balança e, posteriormente, com o auxílio de uma pipeta, foi-se adicionando água ultrapura (água desionizada de qualidade Millipore Milli-Q) até perfazer o volume final. Obteve-se uma solução básica (pH próximo de 10), sendo necessário acertar o seu pH até um valor de 7,4, utilizando uma solução diluída de ácido clorídrico. No final, armazenou-se a solução tampão num frasco de vidro.

Para produzir os GUVs espontâneos percorreram-se as seguintes etapas.

Inicialmente, para uma concentração final de  $1 \times 10^{-3}$  M e um volume final de 50 ml, pesou-se numa balança 0,03155 g de DODAB. De seguida, aqueceu-se 50 ml de solução tampão numa placa de aquecimento com agitação, até atingir a temperatura de 60 °C, e adicionou-se o DODAB pesado anteriormente. Deixou-se em agitação a 60 °C, até dissolução completa do DODAB e a solução se apresentar transparente.

Repetiu-se o procedimento anterior, usando água ultrapura em vez de solução tampão, para se proceder a estudos comparativos e concluir da influência do meio em que se prepararam os GUVs.

Para finalizar, retiraram-se, com uma pipeta, 5 ml de cada uma das soluções para dois tubos *Falcon* e coraram-se as soluções com o corante vermelho *Nile Red*, numa concentração de  $2 \times 10^{-3}$  M.

### 3.1.2 - Método experimental B

#### 3.1.2.1 - *Reagentes utilizados*

Na Tabela 2 apresentam-se todos os reagentes utilizados para a preparação dos GUVs pelo método B.

**Tabela 2** - Reagentes utilizados na preparação dos GUVs, pelo método B.

Composto	Fórmula Química	Peso Molecular	Pureza	Fabricante
Lecitina de Soja	C <sub>42</sub> H <sub>84</sub> NPO <sub>9</sub>	776,00 g/mol	N. D.*	Stern (USA)
Clorofórmio	CHCl <sub>3</sub>	119,38 g/mol	99.8 %	Sigma-Aldrich®
D – (+) – Glucose monoidratada	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> · H <sub>2</sub> O	198.17 g/mol	99 %	Sigma-Aldrich®
<i>Nile Red</i>	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	318,37 g/mol	N. D.*	Sigma-Aldrich®
Rodamina B	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	479,02 g/mol	90 %	Merck

### 3.1.2.2 - Procedimento

Em primeiro lugar, preparou-se num balão volumétrico uma solução-mãe de lecitina de soja em clorofórmio, de concentração  $3 \times 10^{-2}$  M. Assim, para um volume final de 10 ml, pesou-se numa balança 0,2328 g de lecitina de soja e posteriormente adicionou-se clorofórmio, até perfazer o volume final pretendido.

Em seguida, colocaram-se 333  $\mu$ l da solução-mãe de lecitina de soja num tubo de ensaio e evaporou-se lentamente o solvente com uma corrente de azoto gasoso ultrapuro (AirLiquide Alphagaz 1 Azoto), até se formar um filme lipídico. Após a obtenção do filme, fez-se uma pré-hidratação com cerca de 40  $\mu$ l de água desionizada ultrapura, mantendo a solução num banho de água a 45 °C com agitação magnética, durante cerca de 15 minutos. Depois, adicionaram-se 5 ml de uma solução aquosa de glucose 0,1 M, levando-se a incubar durante 2 horas a 37 °C, numa estufa de incubação. A solução assim preparada corresponde a uma concentração final de  $2 \times 10^{-3}$  M de lecitina de soja e um volume final de 5 ml.

Passado o período de incubação, transferiu-se a solução de GUVs para um tubo *Falcon*, e procedeu-se a uma centrifugação durante 30 minutos a 12000 rpm, para remover eventuais agregados e vesículas multilamelares. Após este procedimento, fez-se uma extrusão da solução a uma pressão de 3 bar, num extrusor (Modelo 10 da LIPEX™) da Northern Lipids. Para tal, usou-se uma membrana de extrusão de policarbonato de diâ-

metro de poro 8  $\mu\text{m}$ , para uniformizar o tamanho das vesículas preparadas. Por fim, adicionou-se à solução um corante vermelho a uma concentração de  $2 \times 10^{-3}$  M. Para testar qual o melhor corante, fizeram-se duas preparações idênticas de GUVs segundo este método, tendo a uma delas sido adicionado *Nile Red* e à outra o corante Rodamina B.

O corante *Nile Red* é uma molécula hidrofóbica, conhecida por sonda lipídica, corando assim a região hidrofóbica dos GUVs [27], [28], [29]. Já a Rodamina B é capaz de corar a parte hidrofílica, mantendo-se junto à região aquosa das vesículas.

### 3.1.3 - Método experimental C

#### 3.1.3.1 - *Reagentes utilizados*

Na Tabela 3 estão representados todos os reagentes utilizados para a preparação dos GUVs no método experimental C.

**Tabela 3** - Reagentes utilizados na preparação dos GUVs, pelo método C.

Composto	Fórmula Química	Peso Molecular	Pureza	Fabricante
Lecitina de Soja	$\text{C}_{42}\text{H}_{84}\text{NPO}_9$	776.00 g/mol	N. D.*	Stern (USA)
Clorofórmio	$\text{CHCl}_3$	119,38 g/mol	99.8 %	Sigma-Aldrich®
Trizma® base	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	121.14 g/mol	99.9 %	Sigma-Aldrich®
Nile Red	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$	318.37 g/mol	N. D.*	Sigma-Aldrich®

#### 3.1.3.2 - *Procedimento*

Neste método, prepararam-se três soluções de GUVs, com concentrações finais de  $1 \times 10^{-3}$  M,  $2 \times 10^{-3}$  M e  $4 \times 10^{-3}$  M. Para tal, evaporaram-se, com uma corrente de azoto, em três tubos de vidro, três volumes iniciais diferentes da solução-mãe de lecitina de soja (266  $\mu\text{l}$ , 533  $\mu\text{l}$  e 1066  $\mu\text{l}$ ), até se formar um filme lipídico. Após a obtenção do filme lipídico, adicionaram-se 8 ml de solução tampão preparada de maneira idêntica à descrita no método experimental A (secção 3.1.1.2). As soluções assim obtidas foram levadas ao banho de ultrassons (marca *Branson 320*) durante cerca de 1 a 2 minutos, até se obter uma solução homogênea. Em seguida, realizou-se a extrusão no extrusor (Modelo: 10 da

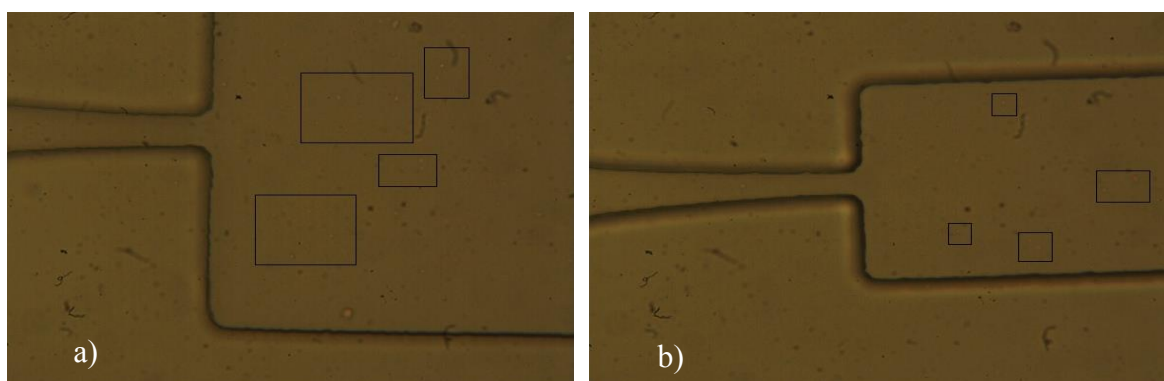
LIPEX™ do fabricante Northern Lipids), usando uma membrana de policarbonato de diâmetro de poro 8  $\mu\text{m}$ , a uma pressão de 1,5 bar. Aplicou-se uma pressão mais baixa que no caso anterior, para evitar o rebentamento dos GUVs, e realizaram-se três ciclos de extrusão para cada uma das soluções, para melhorar a uniformização de tamanhos.

Para finalizar, adicionou-se às soluções o corante *nile red* a uma concentração de  $2 \times 10^{-3}$  M, com o objetivo de melhorar a visualização, pois tal como foi dito anteriormente, o *nile red* cora a parte hidrofóbica dos GUVs.

### 3.2 - Resultados e discussão

Depois de produzir os GUVs por cada um dos métodos descritos na secção anterior, analisaram-se os resultados obtidos num microscópio invertido (CKX41, *Olympus*), com uma ampliação de  $32\times$ . Como foi referido anteriormente, o objetivo desta etapa é a obtenção de GUVs que tenham o tamanho dos GVs, que se deformem como eles e que em escoamento em microcanais seja visível uma CLC.

Na Figura 11, apresentam-se os GUVs obtidos neste trabalho aplicando o método de preparação A. Como se pode verificar, estes são muito pequenos, com uma gama de tamanhos na ordem de 600-700 nm, como reportado na literatura [23]. A vantagem destes GUVs de DODAB era formarem-se espontaneamente, sendo bastante estáveis [23], além de não necessitarem de extrusão. Também se verifica que estes GUVs aparecem em quantidade reduzida.



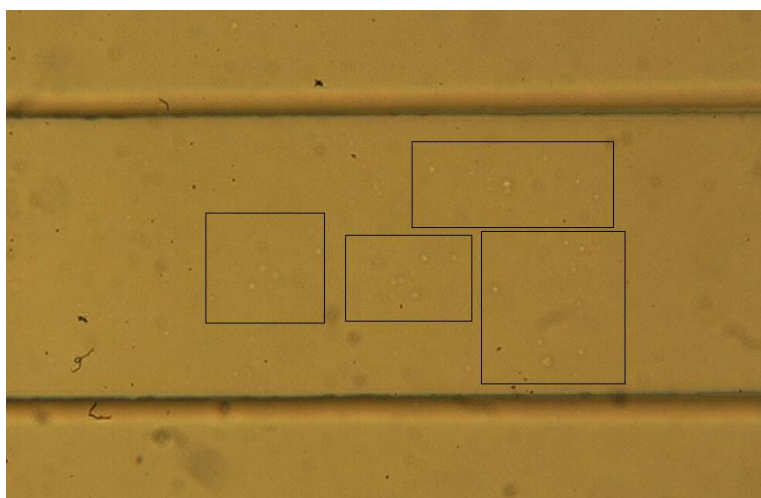
**Figura 11** - GUVs obtidos a partir do método experimental A: a) GUVs espontâneos preparados em água ultrapura; b) GUVs espontâneos preparados em solução tampão.

Mesmo aumentando a concentração de DODAB, não foi possível observar lipossomas com tamanhos na ordem dos  $\mu\text{m}$ .

Quanto ao método experimental B, após várias tentativas, verificou-se, uma vez mais, que os GUVs obtidos não possuíam as características pretendidas, ou seja, eram muito pequenos, com tamanhos na ordem dos 2 a 3  $\mu\text{m}$ , além de serem escassos.

No entanto, como os GUVs obtidos por este método [24-25] têm sido usados como modelos de membranas biológicas em estudos recentes [30-31], tentou-se melhorar os resultados obtidos por este método. Assim, variaram-se alguns parâmetros do procedimento experimental, tais como aumentar a concentração da mistura de lípidos (lecitina de soja) para o dobro; variar o tempo de preparação dos GUVs na estufa de 2 horas para 4 horas; optar pela preparação sem realizar extrusão; fazer a evaporação da lecitina por aquecimento num banho termostaticado a cerca de 80 °C (substituindo a evaporação rápida com corrente de azoto por uma forma de evaporação lenta); aumentar a concentração de corante para que a visualização fosse melhor; variar o tempo de incubação após a adição da glucose; e ainda usar filtros de separação de tipo Amicon® para concentrar os GUVs.

Mesmo com todas estas tentativas, os resultados foram insatisfatórios, obtendo-se sempre poucos GUVs e muito pequenos, tal como se pode observar na Figura 12.



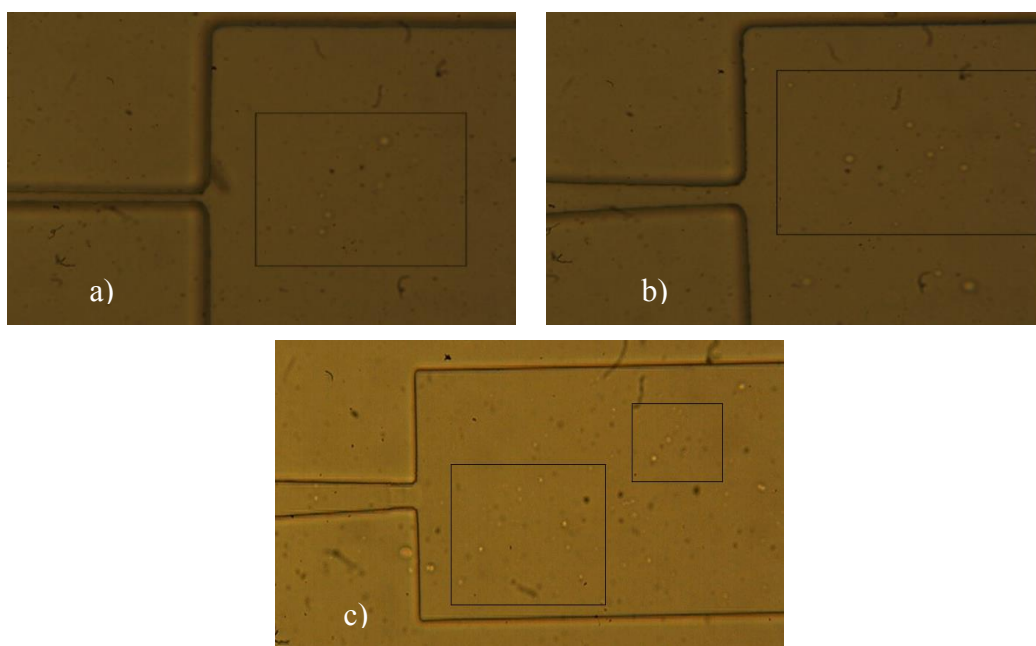
**Figura 12** - GUVs obtidos a partir do método experimental B.

É possível que estes GUVs diminuam de tamanho algum tempo após a preparação, ou que um maior tempo de incubação e maior concentração em relação ao descrito [24-25] possam contribuir para uma reorganização da membrana, com conseqüente diminuição de diâmetro. Por outro lado, demasiada quantidade de corante hidrofóbico pode contribuir para desestabilizar a membrana.

Finalmente, optou-se por explorar o método experimental C (secção 3.1.3). Como foi descrito anteriormente, foram preparadas três soluções de lecitina de soja, designadas por C1, C2 e C3 com concentração de  $1 \times 10^{-3}$  M,  $2 \times 10^{-3}$  M e  $4 \times 10^{-3}$  M, respetivamente.

Relativamente ao método experimental C, posteriormente à obtenção dos GUVs procedeu-se à visualização destes no microscópio invertido (CKX41, *Olympus*), na expectativa que estes fossem os GUVs com as características pretendidas.

Após a visualização dos GUVs obtidos por este método ao microscópio, verificou-se que estes apresentam um tamanho adequado para conseguirem visualizar-se em condições adequadas. De facto, estes GUVs apresentam tamanhos mais próximos dos GVs, que possuem um diâmetro na ordem dos 7  $\mu$ m, e também se encontram em quantidade suficiente para estudar o seu escoamento em microcanais, como se pode observar na Figura 13.



**Figura 13** - GUVs obtidos a partir do método experimental C com três concentrações de lecitina de soja diferentes: a)  $C = 1 \times 10^{-3}$  M; b)  $C = 2 \times 10^{-3}$  M; c)  $C = 4 \times 10^{-3}$  M.

### 3.3 - Caraterização dos GUVs

Após a preparação dos GUVs pelo método experimental C, método este onde numa primeira visualização ao microscópio se obtiveram GUVs em quantidade e tamanho adequados, procedeu-se ao estudo mais detalhado da sua fração volúmica e do seu tamanho (diâmetro).

Assim, para se proceder a este estudo, fez-se a visualização do escoamento dos GUVs em microcanais através de um sistema de microscopia invertida e, posteriormente, realizou-se a análise de imagens recorrendo ao *software Image J*. Este sistema de microscopia, assim como o *software Image J*, serão abordados com mais detalhe na secção 4.1.2 e 4.1.3, respetivamente.

Nas secções seguintes apresentam-se assim os resultados destes estudos.

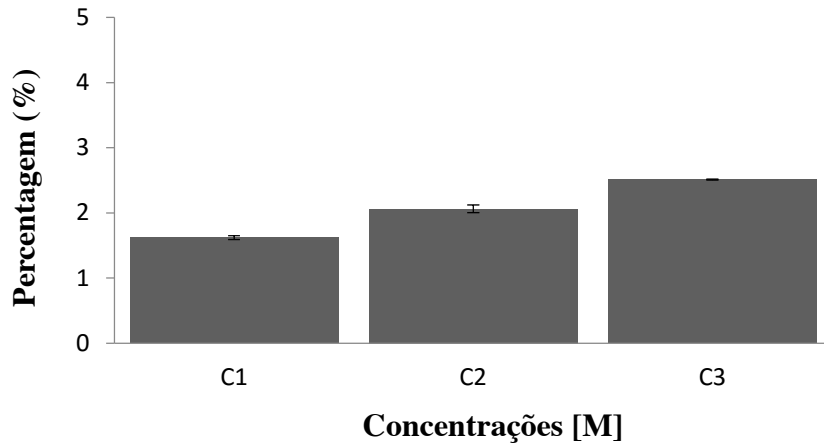
#### 3.3.1 - Fração volúmica

Para a análise da fração volúmica dos GUVs para cada uma das três concentrações, procedeu-se ao tratamento das imagens no *software Image J*. Para isso, seleccionou-se uma secção do canal para se realizar o estudo. Todas estas etapas estão explicadas com mais detalhe no Anexo A.

Obtidos os resultados, através do *Image J*, da área dos GUVs, consegue-se obter o volume destes e, de seguida, aplica-se a seguinte equação (Equação 1), para se obter a fração volúmica.

$$\text{Percentagem de Fração Volúmica} = \frac{\text{Volume}_{total\ GUVs}}{\text{Volume}_{secçãoestudo}} \times 100 \quad (1)$$

Na Figura 14 estão representadas as frações volúmicas obtidas para cada uma das concentrações.

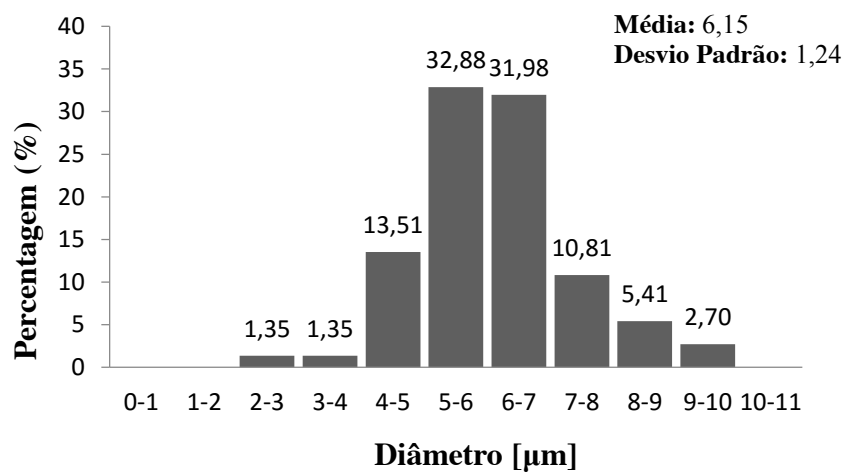


**Figura 14** - Fração volúmica dos GUVs em função da concentração de lecitina de soja.

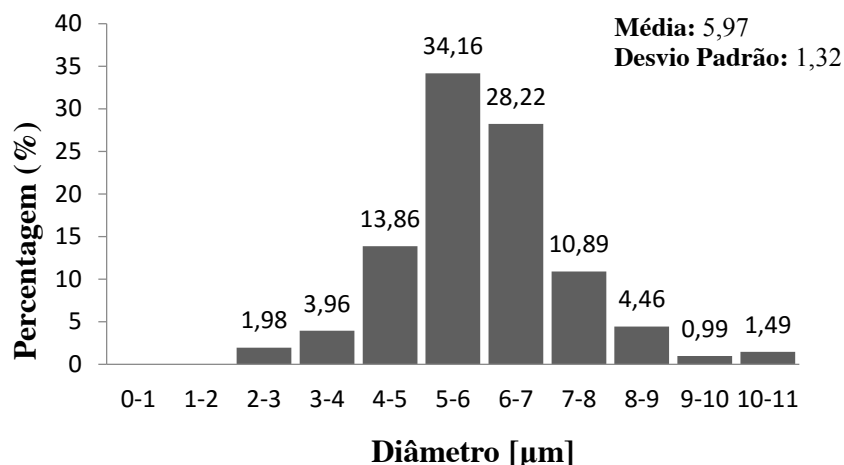
Ao observar-se a Figura 14, pode-se concluir que há um aumento da fração volúmica com o aumento da concentração.

### 3.3.2 - Diâmetros

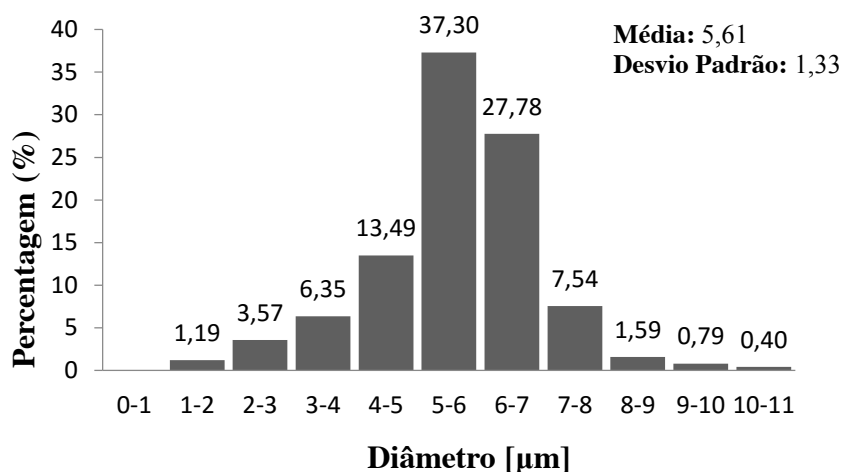
Tal como no estudo da fração volúmica, para o estudo dos diâmetros também se efetuou um tratamento de imagens através do *software Image J* e, posteriormente, fez-se um estudo automático para a contabilização da área dos GUVs. Tendo a área dos GUVs foi assim possível calcular os seus diâmetros. No Anexo B, encontram-se detalhadamente todas as etapas da análise de imagens.



**Figura 15** - Diâmetro dos GUVs para a solução C1.



**Figura 16** - Diâmetro dos GUVs para a solução C2.



**Figura 17** - Diâmetro dos GUVs para a solução C3.

Como se pode observar através das Figuras 15, 16 e 17 em todas as concentrações existe um elevado número de GUVs com diâmetros entre 5 e 7  $\mu\text{m}$ . Este resultado é bastante favorável, pois permite concluir que se conseguiu desenvolver GUVs muito próximos em termos de tamanhos dos GVs, uma vez que estes no ser humano possuem um diâmetro de cerca de 7  $\mu\text{m}$ .

Analisando as imagens, também se pode concluir que quanto maior a concentração menor os diâmetros dos GUVs, a comprovar tem-se a diminuição da média de diâmetros com a concentração. Assim a concentração que mais se aproxima em termos de tamanho dos GVs é a concentração 1, ou seja, a solução C1.

## **Capítulo 4 - Estudo do escoamento em microca- nais e reologia dos GUVs**



## 4.1 - Materiais e métodos

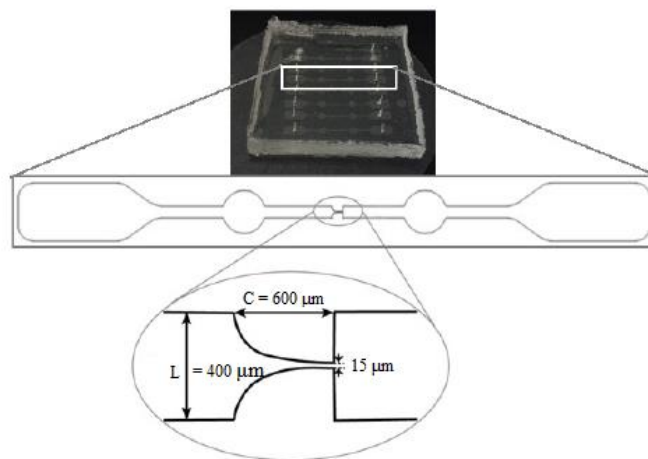
Para o estudo do escoamento em microcanais, foram utilizadas três soluções de GUVs obtidas neste trabalho através do método experimental C, a temperatura ambiente de 22 °C.

### 4.1.1 - Microcanais utilizados

Para realizar os escoamentos foi utilizado um microcanal com uma contração hiperbólica seguida de uma expansão. Esta geometria é bastante utilizada para a análise de fluxos de contração-expansão em microfluídica, devido à sua capacidade de gerar escoamentos extensionais com uma taxa de deformação constante no centro do canal [32-34].

Relativamente ao método utilizado para a fabricação do microcanal, foi utilizado o mesmo método utilizado por Calejo *et al.* [32], ou seja, foi utilizado o método de litografia suave [35].

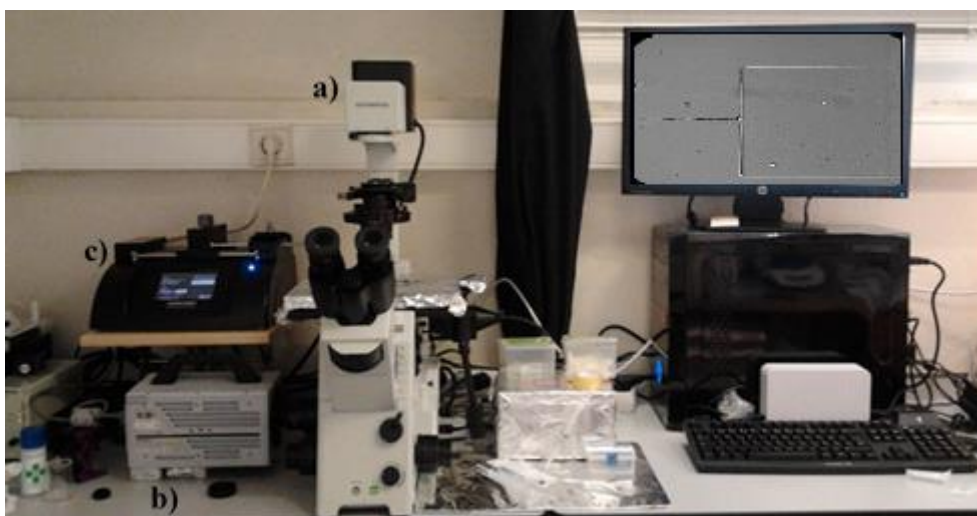
Na Figura 18, estão representadas as dimensões do microcanal. O comprimento da região da contração hiperbólica (C) é de 600  $\mu\text{m}$ , a largura da entrada do microcanal (L) é de 400  $\mu\text{m}$ , a largura da contração é 15  $\mu\text{m}$  e a profundidade do canal é igualmente 15  $\mu\text{m}$ .



**Figura 18** – Esquema ilustrativo de uma visão de topo do microcanal. Adaptado de [32].

#### 4.1.2 - Equipamento de visualização dos escoamentos em microcanais

Para a visualização do escoamento foi utilizado um sistema de microscopia contendo um microscópio invertido (IX71, *Olympus*), uma câmara de alta velocidade (*Fastcam SA3, Photron*), uma bomba de seringa (*Harvard Apparatus*) e uma seringa com um volume de 10 ml (*Terumo*). Na Figura 19 pode-se observar os equipamentos utilizados na medição e visualização dos escoamentos.



**Figura 19** - Equipamentos utilizados para a medição e visualização dos escoamentos: a) microscópio invertido (IX71, *Olympus*); b) câmara de alta velocidade (*Olympus*); c) bomba de seringa (*Harvard Apparatus*).

Para a visualização dos escoamentos no computador utilizou-se o programa *Photron Fastcam Viewer*.

#### 4.1.3 - Software utilizado para a análise de imagens

##### 4.1.3.1 - *Image J*

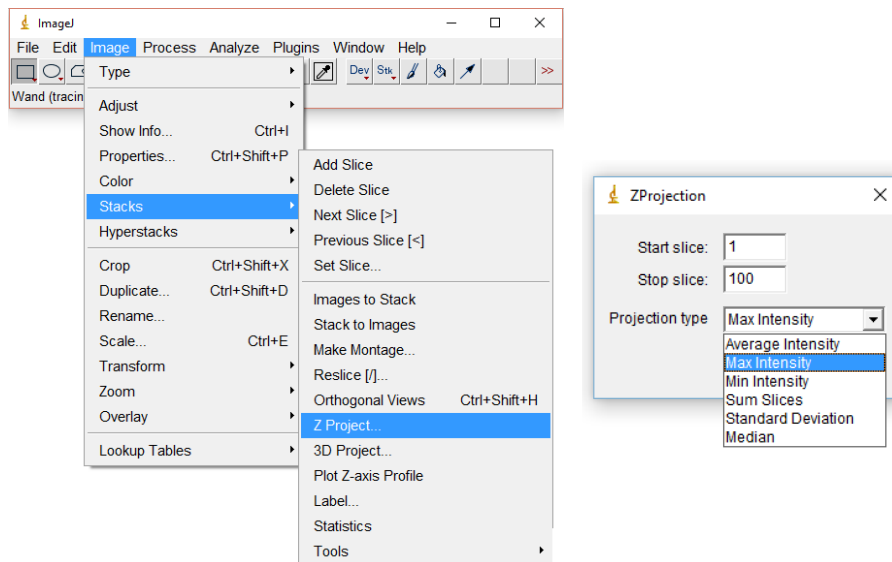
O *Image J* é um programa de processamento de imagem desenvolvido no *National Institute of Health*. Este permite exibir, editar, analisar, processar, guardar e imprimir imagens de 8 bits, 16 bits e 32 bits. Este programa possibilita a leitura de vários formatos de imagem, tais como: TIF, PNG, JPEG, BMP, DICOM, FITS e também formatos RAW [19].

Este programa suporta imagens em série, que são partilhadas numa única janela. Permite ainda o cálculo de ângulos e distâncias, assim como a realização de histogramas de

densidade. Suporta funções de processamento de imagem padrão, tais como operações aritméticas e lógicas entre imagens, manipulação de contraste, convolução, análise de Fourier, nitidez, suavização, detecção de bordas e filtragem mediana. Faz transformações geométricas como escala, rotação e saltos. O programa suporta qualquer número de imagens simultaneamente, limitado apenas pela memória disponível [19].

#### 4.1.3.1.1. - Z-Project

O *Z-Project* é um *plugin* do *Image J* que foi usado não só para efetuar a análise da camada de plasma, mas também para fazer a análise da deformação e velocidade dos GUVs. Este *plugin* é obtido através dos comandos *Image – Stacks – Z-Project* como se pode observar pela Figura 20. Este subprograma projeta a imagem ao longo de um eixo perpendicular ao plano da imagem (eixo do z).



**Figura 20** - Esquematização do procedimento para o comando *Z-Project*.

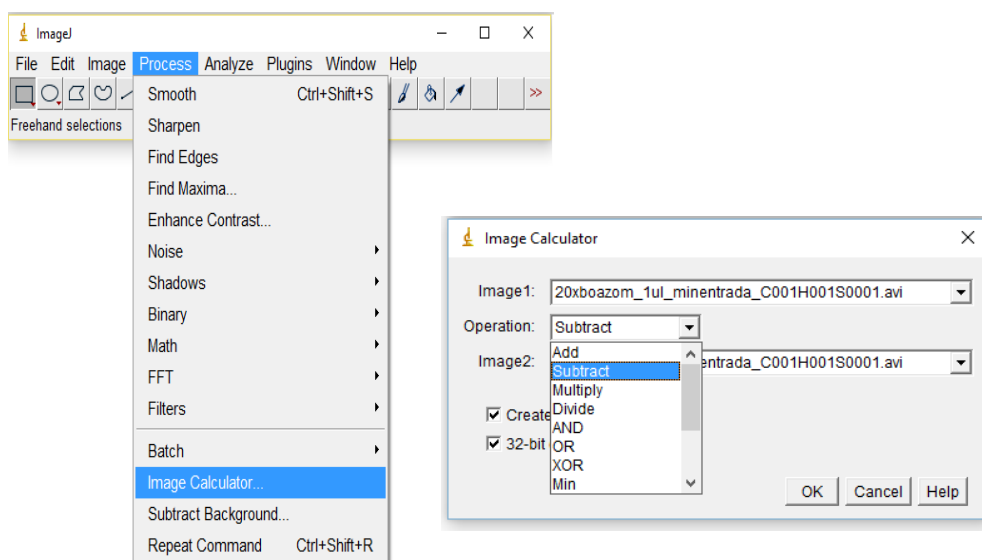
Existem vários tipos de projeções, nomeadamente a intensidade média, a intensidade máxima, a intensidade mínima, a soma, o desvio padrão e a mediana. Quanto à intensidade média (*Average Intensity*), esta armazena a média da intensidade de todos os *pixels* de uma imagem. Já a intensidade máxima (*Max Intensity*), permite projetar uma imagem de saída, cujos valores de máxima intensidade dos *pixels* são demonstrados. A intensidade mínima (*Min Intensity*) dá-nos o valor mínimo possível do padrão de intensidade dos brilhos da fonte. A soma (*Sum Slices*), cria uma imagem real, resultante da soma de todos os *pixels* de imagem original. Relativamente ao desvio padrão (*Standard Deviation*), este

representa a raiz quadrada da variância e informa sobre a maior ou menor homogeneidade, ou heterogeneidade, de uma imagem digital. Por fim, a mediana (*Median*) armazena a mediana da intensidade de todos os *pixels* de uma imagem [19].

Após a realização de vários testes preliminares foi decidido utilizar as opções intensidade máxima e a mediana para analisar a camada livre de células, a deformação dos GUVs e a velocidade.

#### 4.1.3.1.2. - *Image Calculator*

O *Image Calculator* é um *plugin* obtido através dos comandos *Process – Image Calculator*, como se pode observar na Figura 21.



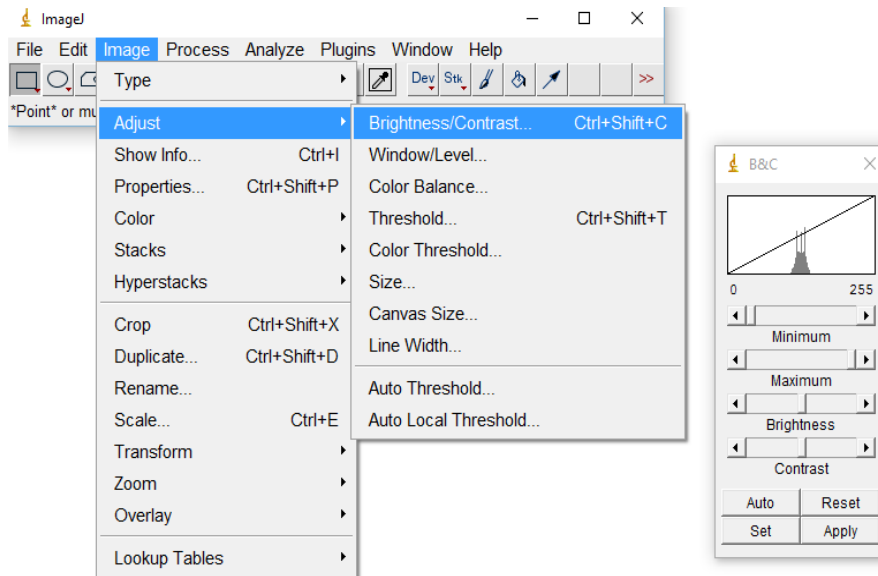
**Figura 21** - Esquematização do procedimento para o comando *Image Calculator*.

Este *plugin* faz operações lógicas e aritméticas entre duas imagens selecionadas do menu *popup* (Figura 21). Estas operações podem ser a adição de duas imagens, subtração, multiplicação, divisão, entre outras. Para este trabalho só foi utilizada a operação de subtração para calcular o índice de deformação e a velocidade.

As imagens usadas nestas operações, ou seja, a imagem 1 ou as imagens 1 e 2 da janela demonstrada na Figura 21, podem ser *Stacks* (dependendo do contexto); contudo, se assim forem, têm de ter o mesmo número de partes. A imagem 1 e a imagem 2 não têm de ser do mesmo tipo, nem do mesmo tamanho [36].

#### 4.1.3.1.3. - *Brightness/Contrast*

Este *plugin*, *Brightness/Contrast*, é obtido através dos comandos *Image – Adjust – Brightness/Contrast*, como é possível observar na Figura 22.

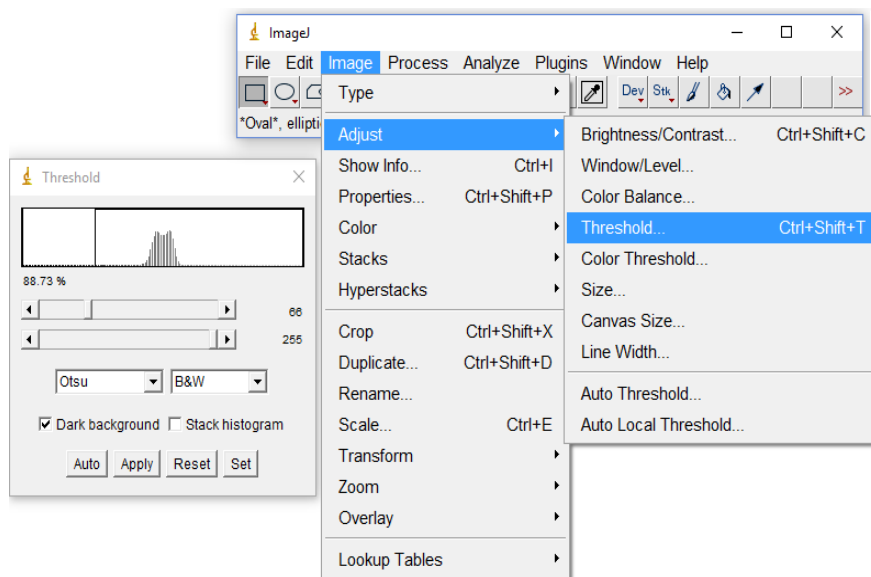


**Figura 22** - Esquematisação do procedimento para o comando *Brightness/Contrast*.

Este comando é usado para, interativamente, alterar a luminosidade e o contraste de uma imagem. Para imagens de 8-bits, a luminosidade e o contraste são alterados, sendo que os valores dos *pixels* ficam inalterados. Para imagens de 16 e 32-bits, a imagem é atualizada através da alteração do mapeamento do valor dos *pixels* para valores de 8-bits, sendo que o valor dos *pixels* fica inalterado. Para imagens RGB, a luminosidade e o contraste são alterados modificando o valor dos *pixels* [36].

#### 4.1.3.1.4. - *Threshold*

O *Threshold* é um *plugin* que se obtém através dos comandos *Image – Adjust – Threshold*, como se pode observar na Figura 23.

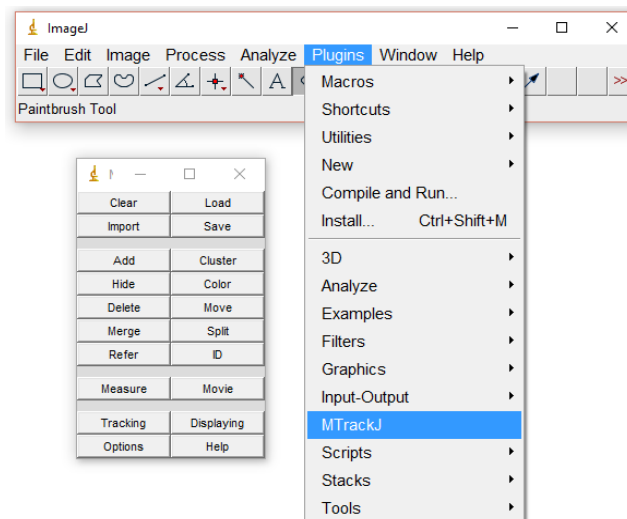


**Figura 23** - Esquematização do procedimento para o comando *Threshold*.

Este *plugin* é utilizado para, automaticamente ou interativamente, se definir o valor do *Threshold* superior e inferior, e segmentar imagens em escala de cinzentos em características de interesse e fundo [36].

#### 4.1.3.1.5. - *MTrackJ*

O *plugin MtrackJ* obtém-se através dos comandos *Plugins – MtrackJ*, como se pode observar na Figura 24.



**Figura 24** - Esquematização do procedimento para o comando *MTrackJ*.

Este plugin foi usado para seguir os GUVs e determinar as velocidades correspondentes. Este plugin tanto pode ser utilizado para seguir a trajetória de um GUV ou GV através de um filme, resultando uma sequência de valores, ou para determinar a zona limite da CLC numa imagem [19].

#### 4.1.4 - Equipamento de estudo da reologia

A caracterização reológica das soluções de GUVs foi realizada através de um reómetro de controlo de tensão (Bohlin CVO, Malvern, Worcestershire, UK), como se pode observar na Figura 25, utilizando uma “geometria prato-prato” com um diâmetro de 50 mm e um espaçamento de 0,1 mm. De salientar, que a “geometria prato-prato” não assegura uma taxa de deformação constante através de todo o volume da amostra de fluido. Escoramentos secundários podem aparecer com elevadas taxas de deformação, o que permite obter curvas de viscosidade estáveis de 1 a 10000 s<sup>-1</sup> [32].



**Figura 25** - Reómetro Bohlin CVO.

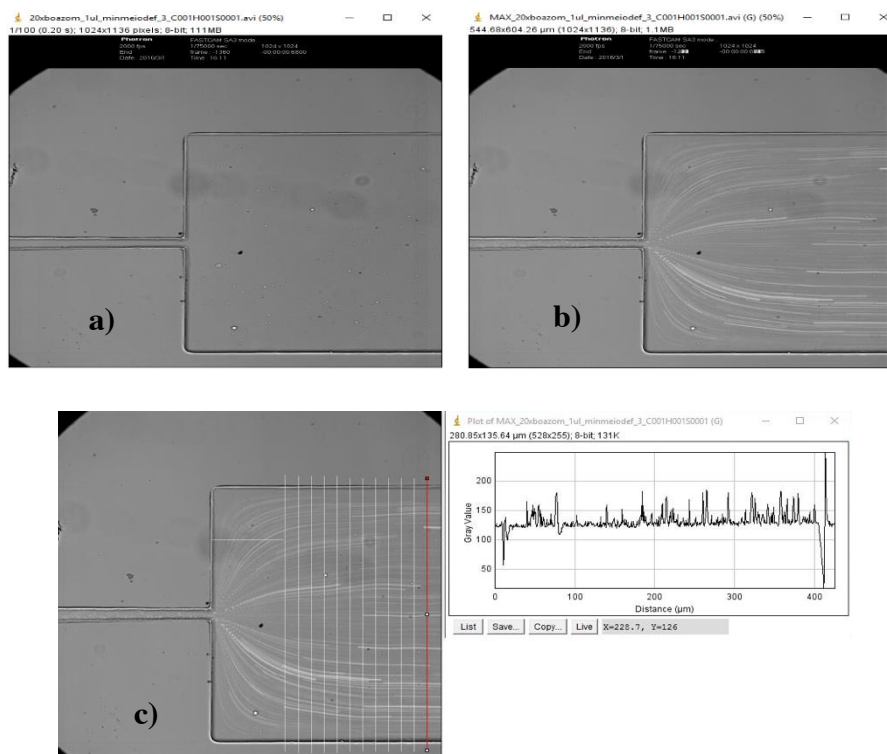
## 4.2 - Resultados experimentais e discussão

Após a obtenção das imagens através de um sistema de microscopia combinada com uma câmara de alta velocidade, foram realizadas várias medições dos escoamentos em microcanais, tais como: a medição da Camada Livre de Células (CLC), a deformação dos GUVs e a sua velocidade nos microcanais. Foi também utilizado um reómetro para estudar a reologia destes fluidos. Assim, nesta secção é explicado detalhadamente todo o processo de tratamento de imagens efetuado a partir do *software Image J*, bem como todos os resultados obtidos para cada um dos estudos referidos anteriormente e a sua discussão.

### 4.2.1 - Camada Livre de Células (CLC)

Para realizar o estudo da CLC, efetuou-se o escoamento das soluções de GUVs C1, C2 e C3 no microcanal descrito na secção 4.1.1. Este escoamento foi realizado com três caudais ( $Q$ ) diferentes, de 1, 5 e 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Para a obtenção das imagens utilizou-se um sistema de microscopia de alta velocidade, descrito em 4.1.2.

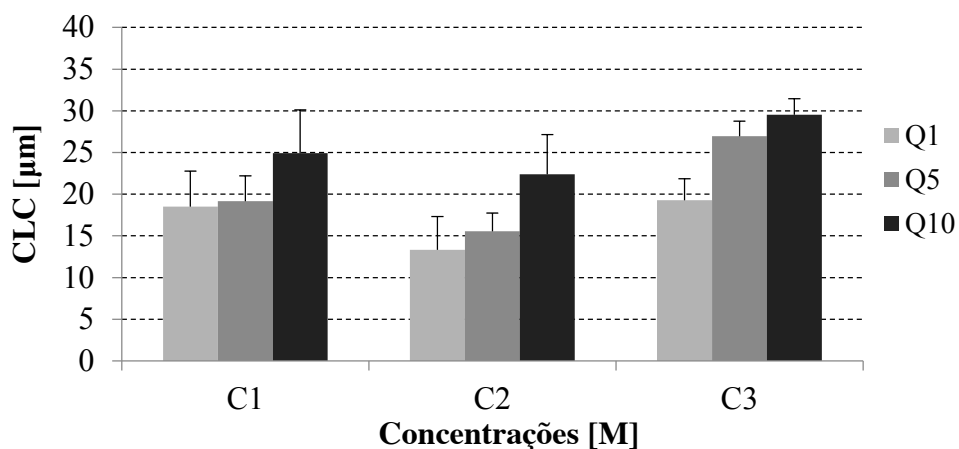
Após a aquisição das imagens com o auxílio da câmara de alta velocidade *Fastcam SA3 (Photron)*, procedeu-se ao tratamento das imagens no *software Image J*. Em primeiro lugar, aplicou-se o *plugin Z-Project* para determinar a intensidade máxima da imagem original (Figura 26a), operação esta demonstrada na Figura 26b. De seguida, foram efetuadas linhas perpendiculares ao escoamento ao longo do microcanal, mais concretamente 12 linhas, e a partir dessas linhas, foi determinado o *plot profile*, como se pode observar na Figura 26c.



**Figura 26** - Imagens obtidas através do *software Image J* para a determinação da CLC a jusante da contração hiperbólica dos GUVs da solução C1, caudal 1 µl/min: a) Imagem Original; b) Imagem com intensidade máxima; c) Imagem com a intensidade máxima e determinação da CLC através de linhas paralelas ao longo do canal e apresentando o seu perfil no gráfico.

Na Figura 26, são apresentados os principais passos utilizados no tratamento das imagens obtidas para o escoamento de caudal 1 µl/min da solução C1, a jusante da contração hiperbólica. De referir que este procedimento foi utilizado para cada um dos três caudais nas três concentrações diferentes.

Na figura seguinte (Figura 27), estão representados os valores da CLC para cada um dos três caudais estudados em função de cada uma das concentrações das soluções de GUVs elaboradas.



**Figura 27** - CLC das soluções de GUVs para cada um dos três caudais em função da concentração de lecitina de soja.

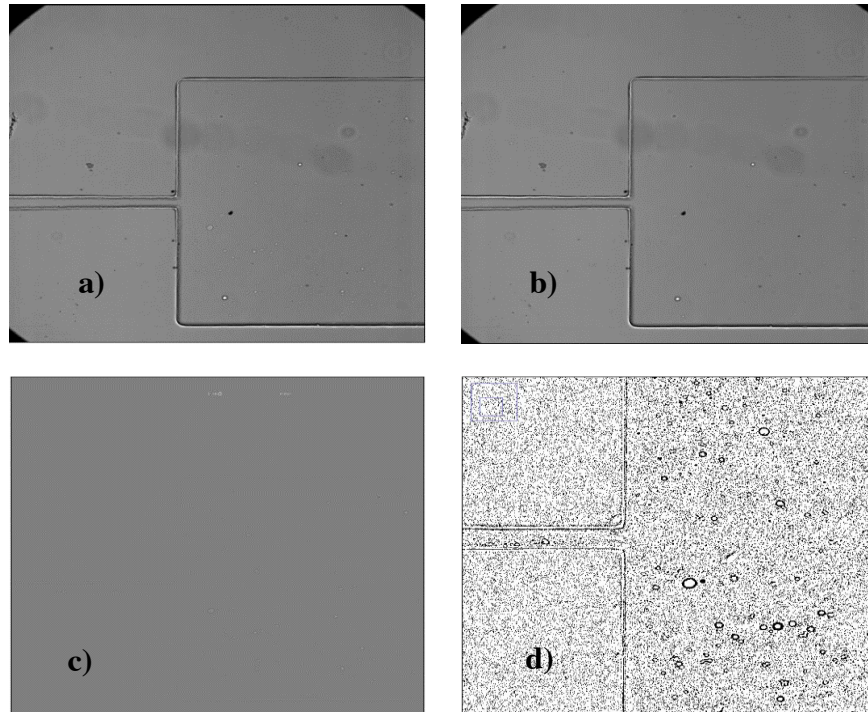
Como se pode observar através da Figura 27, em cada uma das concentrações existe um aumento da espessura da CLC com o aumento do caudal. Assim, pode-se concluir que a espessura da CLC é diretamente proporcional ao aumento do caudal. De salientar que a CLC, a montante da contração hiperbólica, era praticamente inexistente, ou seja, a contração promoveu um aumento da CLC a jusante da mesma. Este fenómeno corrobora os resultados obtidos por Calejo *et. al.* [32].

#### 4.2.2 - Deformação dos GUVs

Tal como para o estudo da CLC, para realizar o estudo da deformação dos GUVs fez-se igualmente o escoamento das soluções C1, C2 e C3 no microcanal com três caudais (Q) diferentes, de 1, 5 e 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Após a aquisição das imagens através do sistema de microscopia de alta velocidade, efetuou-se o tratamento das imagens no *software Image J*.

Inicialmente, aplicou-se o *plugin Z-Project* para determinar os valores da mediana da imagem original (Figura 28a), como se pode observar na Figura 28b. De seguida, fez-se uma subtração da imagem original pela imagem com a mediana, Figura 28c, através do *plugin Image Calculator*. Por fim, na imagem subtraída aplicou-se o comando *Brightness/Contrast* para melhorar a luminosidade e contraste da imagem, e aplicou-se

ainda, o *plugin Threshold* para que a imagem ficasse nas melhores condições para se proceder ao estudo da deformação dos GUVs (Figura 28d).

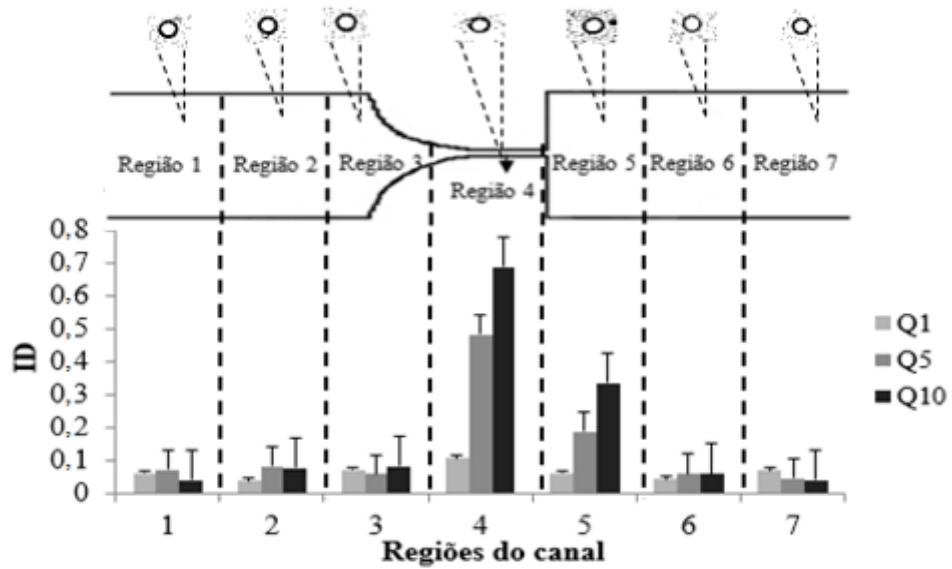


**Figura 28** - Imagens obtidas através do *software Image J* para o estudo da deformação dos GUVs da solução C1, caudal 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ : a) Imagem Original; b) Imagem com mediana; c) Imagem da subtração da imagem original pela imagem com a mediana através do *plugin Image Calculator*; d) Imagem subtraída aplicando o *plugin Brightness/Contrast e Threshold*.

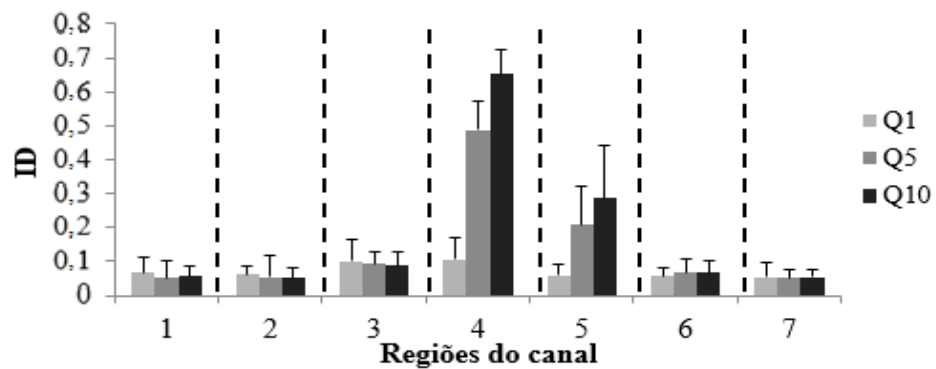
Após estas operações, foram obtidos os valores referentes ao *major* e *minor* dos GUVs, os quais permitiram, através do tratamento em *Excel*, determinar o índice de deformação  $\left( ID = \frac{Major - Minor}{Major + Minor} \right)$  dos GUVs ao longo desta região do microcanal.

Como se pode observar, na Figura 28 está representado o tratamento de imagens para o escoamento de caudal 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  da solução C1. No entanto, este mesmo tratamento de imagem foi feito para cada um dos três caudais nas três concentrações diferentes de soluções de GUVs.

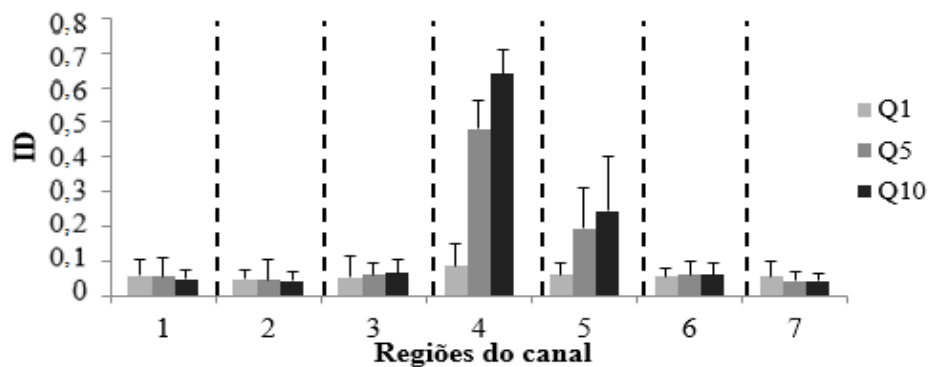
O estudo da deformação foi feito em sete regiões diferentes do microcanal, como se pode observar na Figura 29. Nesta mesma figura, assim como nas figuras seguintes, Figuras 30 e 31, estão representados os resultados para o estudo da deformação dos GUVs ao longo do microcanal.



**Figura 29** - Índice de deformação dos GUVs ao longo do microcanal para a solução C1 e nos três caudais estudados.



**Figura 30** - Índice de deformação dos GUVs ao longo do microcanal para a solução C2 e nos três caudais estudados.



**Figura 31** - Índice de deformação dos GUVs ao longo do microcanal para a solução C3 e nos três caudais estudados.

Ao analisar as Figuras 29, 30 e 31, pode-se verificar que os GUVs possuem a capacidade de se deformarem na região da contração hiperbólica. Os GUVs a montante da contração têm uma deformação muito próxima de zero devido à baixa taxa de deformação; contudo, ao se aproximarem da contração do microcanal o índice de deformação dos GUVs aumenta de uma forma significativa. Após a contração, este índice diminui até regressar a valores próximos de zero.

Estes resultados são muito promissores, pois os GUVs, tal como acontece com os GVs, possuem a capacidade de se deformarem ao longo do seu escoamento. Assim, estes resultados evidenciam que os GUVs possuem características reológicas próximas dos GVs. De salientar, que estes resultados também demonstram que a deformação dos GUVs aumenta com o aumento caudal. Este facto é mais evidente na zona da contração do microcanal.

#### 4.2.3 - Velocidade dos GUVs

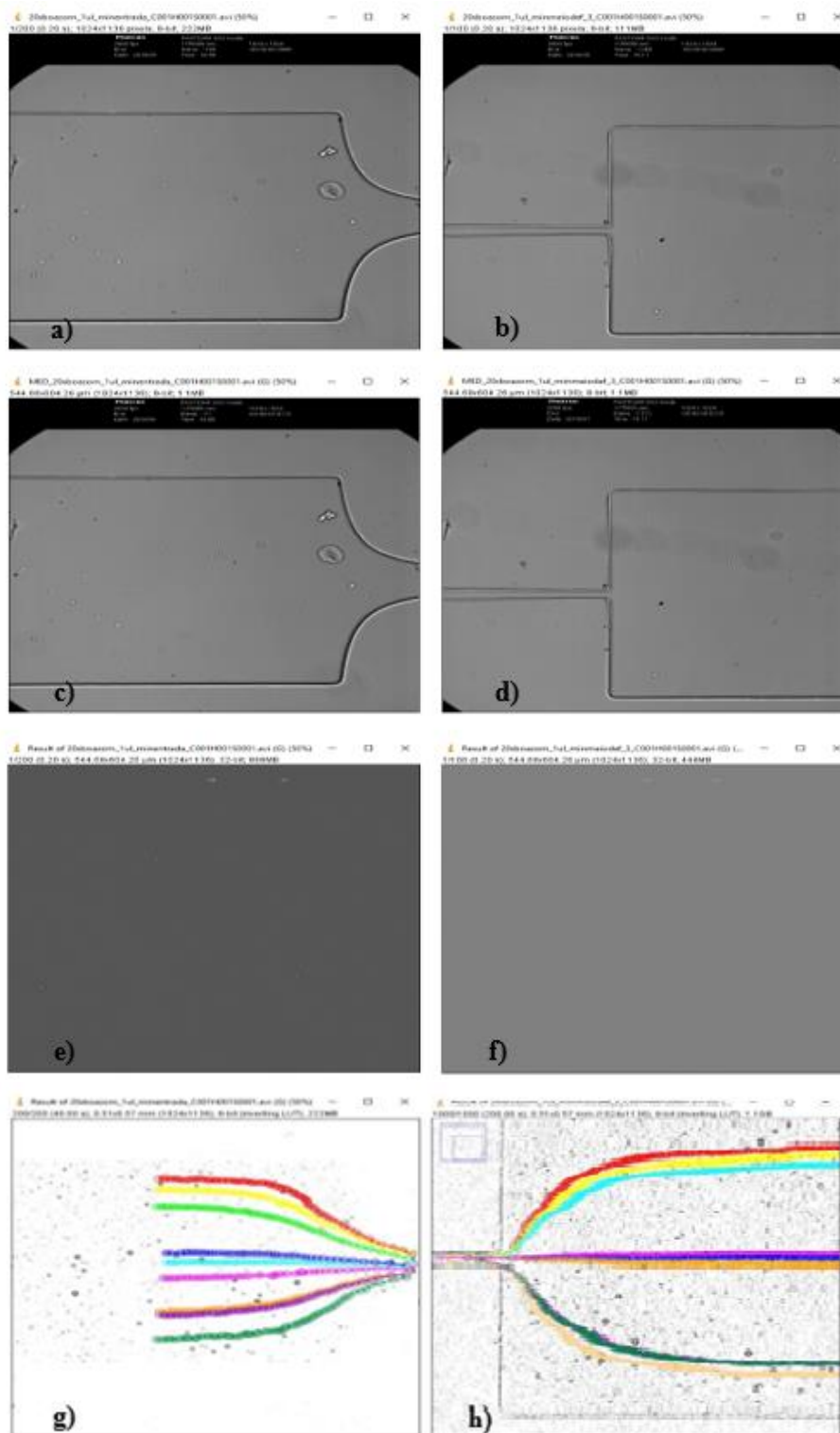
Para o estudo da velocidade dos GUVs, apenas se fez o escoamento da solução C1, mas igualmente para três caudais ( $Q$ ) diferentes, ou seja, 1, 5 e 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Esta diferença para com os estudos anteriores deve-se ao facto de, nesses mesmos estudos, principalmente no estudo dos diâmetros dos GUVs, se verificar que a solução que possui diâmetros mais próximos dos GVs é a solução C1. Assim sendo, perante este resultado, optou-se por fazer apenas o escoamento desta solução, uma vez que os GUVs que mais interesse têm para este estudo são aqueles com diâmetro próximo do dos GVs e que apareçam em quantidades significativas. De salientar que este estudo foi realizado a montante e a jusante da contração do microcanal.

Posteriormente à aquisição das imagens através do sistema de microscopia de alta velocidade, realizou-se o tratamento das imagens através do *software Image J*. Todas as etapas realizadas no *software* para o tratamento das imagens foram as mesmas, tanto para montante, como para jusante da contração.

Em primeiro lugar, aplicou-se o *plugin Z-Project* para determinar o valor da mediana das imagens originais (Figuras 32a e 32b), como é possível observar nas Figuras 32c e

32d. Após esta etapa, efetuou-se uma subtração das imagens originais pelas imagens com a mediana, Figuras 32e e 32f, através do *plugin Image Calculator*. Posteriormente, nas imagens subtraídas aplicou-se o comando *Brightness/Contrast*, para melhorar a luminosidade e contraste da imagem e aplicou-se ainda o *plugin Threshold*. Assim, obtiveram-se imagens com boas condições para se proceder ao estudo da velocidade dos GUVs. Este estudo foi realizado usando o *plugin MtrackJ* para fazer o seguimento dos GUVs, como se pode observar nas Figuras 32g e 32h.

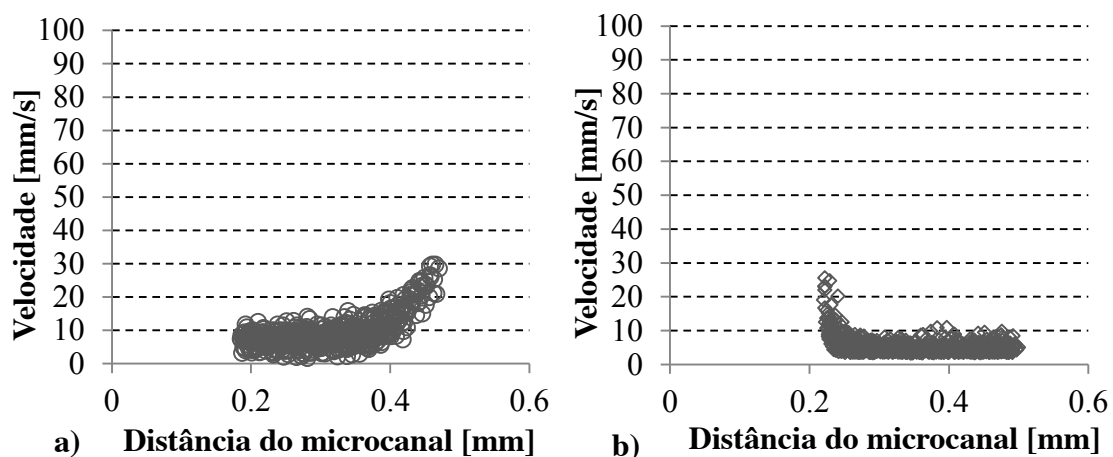


**Figura 32** - Imagens obtidas através do *software Image J* para o estudo da velocidade dos GUVs da solução C1, caudal 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ : a) e b) Imagens Originais; c) e d) Imagens com mediana; e) e f) Imagens da subtração das imagens originais pelas imagens com a mediana através do *plugin Image Calculator*; g) e h) Imagens subtraídas aplicando o *plugin Brightness/Contrast e Threshold* e com o estudo da velocidade através do *plugin MTrackJ*.

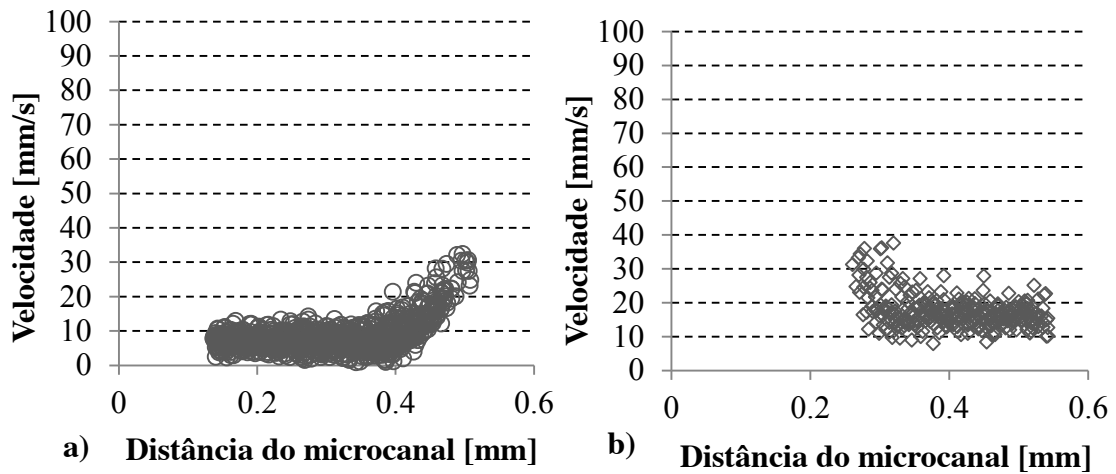
Após todas estas operações, obtiveram-se assim os dados numéricos da velocidade, os quais foram tratados em Excel para se obter o estudo da velocidade.

Na Figura 32, apresenta-se o tratamento de imagens para o escoamento de caudal 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  da solução C1. Porém este mesmo tratamento de imagem foi feito para cada um dos três caudais, tal como foi dito anteriormente.

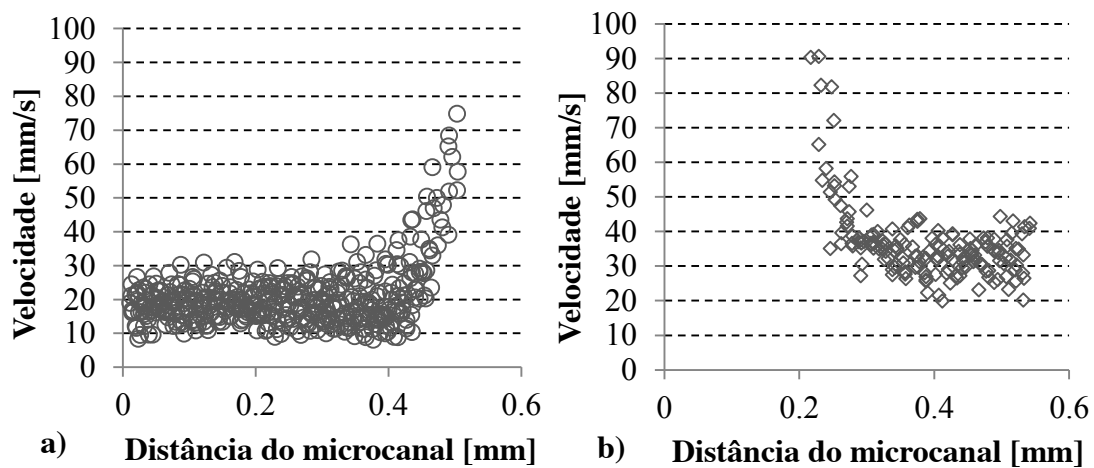
Nas figuras seguintes (Figuras 33, 34 e 35) está representado o estudo das velocidades dos GUVs a montante e a jusante contração, para a solução C1 e para cada um dos três caudais estudados.



**Figura 33** - Velocidade dos GUVs para a solução C1 e caudal 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ : a) Montante da contração; b) Jusante da contração.



**Figura 34** - Velocidade dos GUVs para a solução C1 e caudal 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ : a) Montante da contração; b) Jusante da contração.



**Figura 35** - Velocidade dos GUVs para a solução C1 e caudal 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ : a) Montante da contração; b) Jusante da contração.

Pelas Figuras 33, 34 e 35 é possível verificar que em termos qualitativos o escoamento dos GUVs têm um comportamento bastante idêntico para todos os caudais estudados.

Em termos gerais, as velocidades dos GUVs nas regiões a montante e a jusante da contração têm valores muito idênticos, no entanto quando os GUVs se aproximam da contração hiperbólicas as velocidades aumentam de forma linear proporcionando assim uma taxa de deformação constante. De referir que este comportamento observado pelo GUVs corrobora o estudo realizado por Yaginuma *et al.* [33] com GVs. No corpo humano

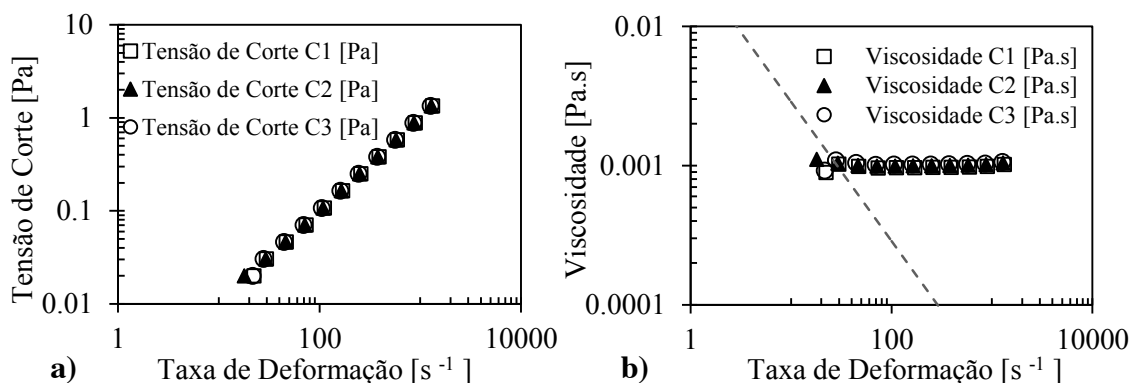
este tipo de fenómeno pode acontecer em estenoses e em bifurcações onde existe um aumento de velocidade abrupto.

Assim, pode-se concluir que em termos de velocidade os GUVs têm um comportamento muito idêntico aos dos GVs, fator este muito importante e que vem reforçar a proposta do nosso estudo de que os GUVs podem ser usados como análogos aos GVs em fluidos com um comportamento reológico análogo ao sangue.

#### 4.2.4 - Reologia dos GUVs

Para realizar o estudo da reologia fez-se a análise das três soluções preparadas, C1, C2 e C3, utilizando-se um reómetro de controlo de tensão, equipamento referenciado na secção 4.1.4. Para efetuar este estudo foi colocada uma pequena quantidade de cada solução no reómetro e, posteriormente, os dados retirados a partir do reómetro foram tratados com o auxílio do *Excel*. De salientar que estes estudos de reologia foram todos realizados à temperatura de 22 °C.

Na figura seguinte (Figura 36) apresentam-se os resultados do estudo da reologia para as três soluções.



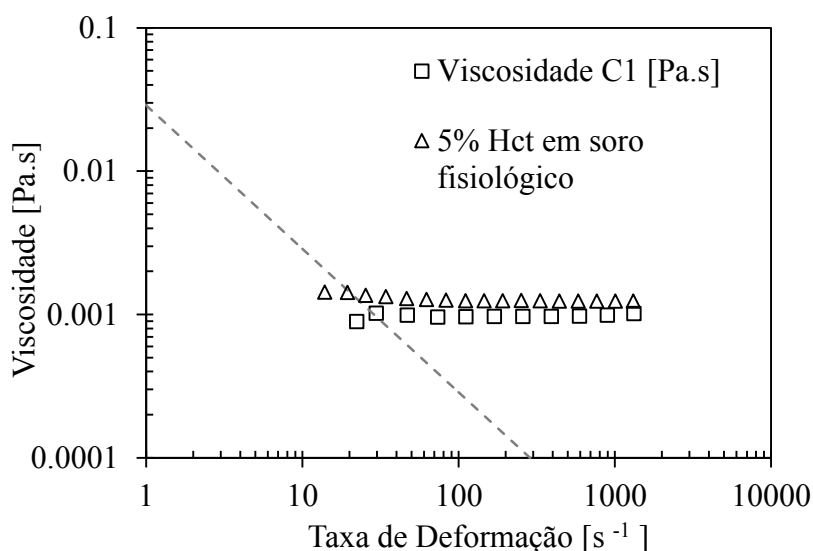
**Figura 36** - Viscosidade das soluções de GUVs em função da concentração de lecitina de soja: a) Tensão de corte em função da taxa de deformação; b) Viscosidade em função da taxa de deformação.

Ao analisar a Figura 36 verifica-se que as três soluções possuem uma viscosidade muito próxima, contudo, nota-se um ligeiro aumento desta com o aumento da concentração de lecitina de soja.

Outro fator evidente na Figura 36, é o facto da viscosidade das três soluções de GUVs ser muito próxima da viscosidade da água que é 0,0010002 Pa.s a uma temperatura de 20 °C, o que era expectável, uma vez que o meio onde os GUVs estão é uma solução tampão que possui na sua constituição essencialmente água ultrapura.

Perante estes resultados e não só, tendo em conta os resultados do estudo dos diâmetros dos GUVs, que nos mostra que a solução que mais se aproxima em termos de diâmetros dos GVs é a solução C1, decidiu realizar-se uma comparação reológica entre esta solução e uma solução de Hct em soro fisiológico, para verificar se estes se aproximam em termos reológicos.

Na figura seguinte (Figura 37), está representado o resultado desta comparação.



**Figura 37** - Viscosidade da solução de GUVs C1 e de 5 % de Hct em soro fisiológico.

Como se pode observar na Figura 37, a solução C1 possui uma viscosidade muito próxima da solução de 5% de Hct em soro fisiológico. Assim, pode-se concluir que o análogo proposto neste trabalho tem um comportamento reológico muito próximo de amostras *in vitro* com baixos Hcts. Este tipo de amostras são bastante utilizadas para determinar o índice de deformabilidade de diferentes tipos de células, tais como, células saudáveis, células infetadas com o parasita da malária e células cancerígenas [33-34, 37-39].



## **Capítulo 5 - Conclusões e trabalho futuro**



## 5.1 - Conclusões

Este trabalho teve com principal objetivo o desenvolvimento de um fluido análogo ao sangue constituído por vesículas unilamelares gigantes (GUVs), com um comportamento reológico idêntico ao escoamento dos glóbulos vermelhos (GVs) em microcanais.

Neste trabalho foi determinada a fração volúmica para três soluções de GUVs, diferenciando entre si pela concentração da mistura de fosfolípidos, lecitina de soja. Foi observado que quanto maior é a quantidade da lecitina de soja maior é a concentração de GUVs no fluido.

Relativamente ao estudo dos diâmetros dos GUVs foi verificado que em todas as soluções o tamanho destes apresentou valores entre os 5 a 7  $\mu\text{m}$ , ou seja, valores muito próximos em termos de tamanhos dos GVs, que apresentam cerca de 7  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Adicionalmente, também se constatou que quanto maior a concentração de lecitina de soja menor são os diâmetros dos GUVs, como se pode confirmar com a diminuição da média de diâmetros com a concentração.

Nos ensaios experimentais relativos aos escoamentos dos GUVs em microcanais hiperbólicos, verificou-se a formação de CLC em todos eles e um aumento da CLC com o aumento do caudal durante o escoamento. Quanto à deformação dos GUVs foi verificado que estes apresentam uma elevada deformação na região da contração do microcanal onde a taxa de deformação extensional é máxima. Também foi verificado que o índice de deformação aumenta com o caudal, ou seja, este índice aumenta com o aumento do caudal no escoamento. Relativamente à velocidade dos GUVs estes apresentaram um comportamento idêntico para os três caudais estudados. Foi verificado ainda que a velocidade aumenta de forma linear na região da contração hiperbólica e baixa para valores aproximadamente constantes nas zonas a montante e jusante da contração.

Em termos reológicos as soluções de GUVs apresentam viscosidades muito próximas, contudo foi verificado um ligeiro aumento desta com o aumento da concentração de lecitina de soja. Outro fator evidente foi o facto da viscosidade destes ser muito próxima da

viscosidade da água. Relativamente à solução C1 (de concentração  $1 \times 10^{-3}$  M) com a solução de 5% de Hct em soro fisiológico pode-se observar que estas também possuem viscosidades muito próximas.

## **5.2 - Trabalho futuro**

Futuramente, espera-se aperfeiçoar este estudo, testando algumas modificações que poderão ser benéficas para melhorar os resultados obtidos neste trabalho.

Seria interessante testar algumas alterações no método experimental C, ou até mesmo testar outros métodos experimentais de forma a possibilitar uma melhor visualização dos GUVs e assim permitir uma aquisição de imagens com uma melhor qualidade. Outro objetivo seria também verificar o que estas novas estratégias provocariam alterações em termos de fração volúmica e de diâmetros, bem como em termos de ensaios de escoamento.

Um fator interessante a investigar seria a influência, por exemplo no escoamento, da alteração da fluidez local da membrana dos GUVs, o que seria conseguido com diferentes percentagens de colesterol na sua constituição. Outro aspeto seria a influência da carga à superfície, o que seria conseguido com diferentes composições lipídicas nos GUVs, nomeadamente variando a fração entre fosfolípidos aniónicos e fosfolípidos neutros.

Por fim, relativamente à reologia seria interessante melhorar o comportamento reológico deste fluido, ou seja, tentar alcançar uma viscosidade do fluido com os GUVs em suspensão idêntica ao sangue total. Este objetivo poderia ser alcançado modificando o meio envolvente dos GUVs, por exemplo, substituí-lo por dextrano 40 seria uma ideia bastante viável.

## **Referências**



- [1] P. C. Sousa, F. T. Pinho, M. S. N. Oliveira, and M. A. Alves, “Extensional flow of blood analog solutions in microfluidic devices,” *Biomicrofluidics*, vol. 5, no. 1, pp. 1–19, 2011.
- [2] V. Garcia, R. Dias, and R. Lima, “In Vitro Blood Flow Behaviour in Microchannels with Simple and Complex Geometries,” in *Applied Biological Engineering - Principles and Practice*, G. R. Naik, Ed. In Tech, 2012, pp. 393–416.
- [3] J. A. C. Calejo, “Desenvolvimento de Fluidos Bifásicos Análogos ao Sangue: Estudo Reológico, Escoamento em Microcanais e Simulações Numéricas,” Instituto Politécnico de Bragança, 2013.
- [4] A. Jesorka and O. Orwar, “Liposomes: technologies and analytical applications.,” *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto. Calif.)*, vol. 1, pp. 801–832, 2008.
- [5] J. H. Lee, V. Agarwal, A. Bose, G. F. Payne, and S. R. Raghavan, “Transition from unilamellar to bilamellar vesicles induced by an amphiphilic biopolymer,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 96, no. 4, 2006.
- [6] P. Walde, K. Cosentino, H. Engel, and P. Stano, “Giant Vesicles: Preparations and Applications,” *ChemBioChem*, vol. 11, no. 7, pp. 848–865, 2010.
- [7] R. Lima, S. Wada, K. Tsubota, and T. Yamaguchi, “Confocal micro-PIV measurements of three-dimensional profiles of cell suspension flow in a square microchannel,” *Meas. Sci. Technol.*, vol. 17, no. 4, pp. 797–808, 2006.
- [8] R. Lima, M. S. N. Oliveira, T. Ishikawa, H. Kaji, S. Tanaka, M. Nishizawa, and T. Yamaguchi, “Axisymmetric polydimethylsiloxane microchannels for in vitro hemodynamic studies.,” *Biofabrication*, vol. 1, no. 3, pp. 1–7, 2009.
- [9] R. Lima, M. Nakamura, T. Omori, T. Ishikawa, S. Wada, and T. Yamaguchi, “Microscale Flow Dynamics of Red Blood Cells in Microchannels: An Experimental and Numerical Analysis Advances in Computational Vision and Medical Image Processing,” *Adv. Comput. Vis. Med. Image Process.*, vol. 13, pp.

203–220, 2009.

- [10] R. Lima, R. J. Joseyphus, T. Ishikawa, Y. Imai, and T. Yamaguchi, “Micro-flow Visualization of Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications,” *Single Two-Phase Flows Chem. Biomed. Eng.*, pp. 600–612, 2012.
- [11] M. Abkarian, M. Faivre, R. Horton, K. Smistrup, C. A. Best-Popescu, and H. A. Stone, “Cellular-scale hydrodynamics,” *Biomed. Mater.*, vol. 3, no. 3, p. 034011, 2008.
- [12] V. Faustino, D. Pinho, T. Yaginuma, R. C. Calhelha, G. Man-Kim, S. Arana, R. Lima, I. C. F. R. Ferreira, and M. S. N. Oliveira, “measurement of Red Blood Cells Deformation Index in a Hyperbolic Microchannel,” *5th Port. Congr. Biomechanics*, pp. 341–344, 2013.
- [13] H. Fujiwara, T. Ishikawa, R. Lima, N. Matsuki, Y. Imai, H. Kaji, M. Nishizawa, and T. Yamaguchi, “Red blood cell motions in high-hematocrit blood flowing through a stenosed microchannel,” *J. Biomech.*, vol. 42, no. 7, pp. 838–843, 2009.
- [14] V. Leble, R. Lima, R. Dias, C. Fernandes, T. Ishikawa, Y. Imai, and T. Yamaguchi, “Asymmetry of red blood cell motions in a microchannel with a diverging and converging bifurcation,” *Biomicrofluidics*, vol. 5, no. 4, p. 044120, 2011.
- [15] D. A. Bartholomeusz, R. W. Boutté, and J. D. Andrade, “Xurography: Rapid prototyping of microstructures using a cutting plotter,” *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 14, no. 6, pp. 1364–1374, 2005.
- [16] E. Pinto, B. Taboada, V. Faustino, D. Cidre, R. Rodrigues, V. Garcia, R. Dias, and R. Lima, “Blood flow in microchannels manufactured by a low cost technique : xurography,” in *Perspectives in Fundamental and Applied Rheology*, 2013, pp. 285–290.
- [17] R. O. Rodrigues, V. Faustino, D. Pinho, E. Pinto, D. Cidre, T. Yaginuma, B. Taboada, D. Bento, and R. Lima, “Separation and deformation of red blood cells in PDMS microchannels,” in *Perspectives in Fundamental and Applied Rheology*,

- 2013.
- [18] D. M. D. de Pinho, “Determinação e Caracterização das Trajectórias dos Glóbulos Vermelhos : Um Método Semi-Automático,” Instituto Politécnico de Bragança, 2011.
- [19] C. M. L. Fidalgo, “Estudo da Camada de Plasma em Microcanais,” Bragança, 2010.
- [20] L. I. T. de Sousa, “Estudo de embolias gasosas em microcanais,” Instituto Politécnico de Bragança, 2013.
- [21] R. Lima, T. Ishikawa, Y. Imai, and T. Yamaguchi, “Blood flow behaviour in microchannels: past, current and future trends,” in *Single and 2-phase flows on chemical and biomedical engineering*, 2012, pp. 513 – 547.
- [22] H. L. Goldsmith and V. T. Turitto, “Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. ICTH-report-subcommittee on rheology of the international committee on thrombosis and haemostasis: Basic principles and applications,” *Thromb. Haemost.*, vol. 55, no. 3, pp. 415–435, 1986.
- [23] F. R. Alves, M. E. D. Zaniquelli, W. Loh, E. M. S. Castanheira, M. E. C. D. Real Oliveira, and E. Feitosa, “Vesicle-micelle transition in aqueous mixtures of the cationic dioctadecyldimethylammonium and octadecyltrimethylammonium bromide surfactants,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 316, no. 1, pp. 132–139, 2007.
- [24] Y. Tamba, H. Terashima, and M. Yamazaki, “A membrane filtering method for the purification of giant unilamellar vesicles,” *Chem. Phys. Lipids*, vol. 164, no. 5, pp. 351–358, 2011.
- [25] T. Tanaka, Y. Tamba, S. M. Masum, Y. Yamashita, and M. Yamazaki, “La<sup>3+</sup> and Gd<sup>3+</sup> induce shape change of giant unilamellar vesicles of phosphatidylcholine,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1564, no. 1, pp. 173–182, 2002.
- [26] A. L. F. Baptista, P. J. G. Coutinho, M. E. C. D. R. Oliveira, and J. I. N. R. Gomes, “Effect of Surfactants in Soybean Lecithin Liposomes Studied by Energy Transfer

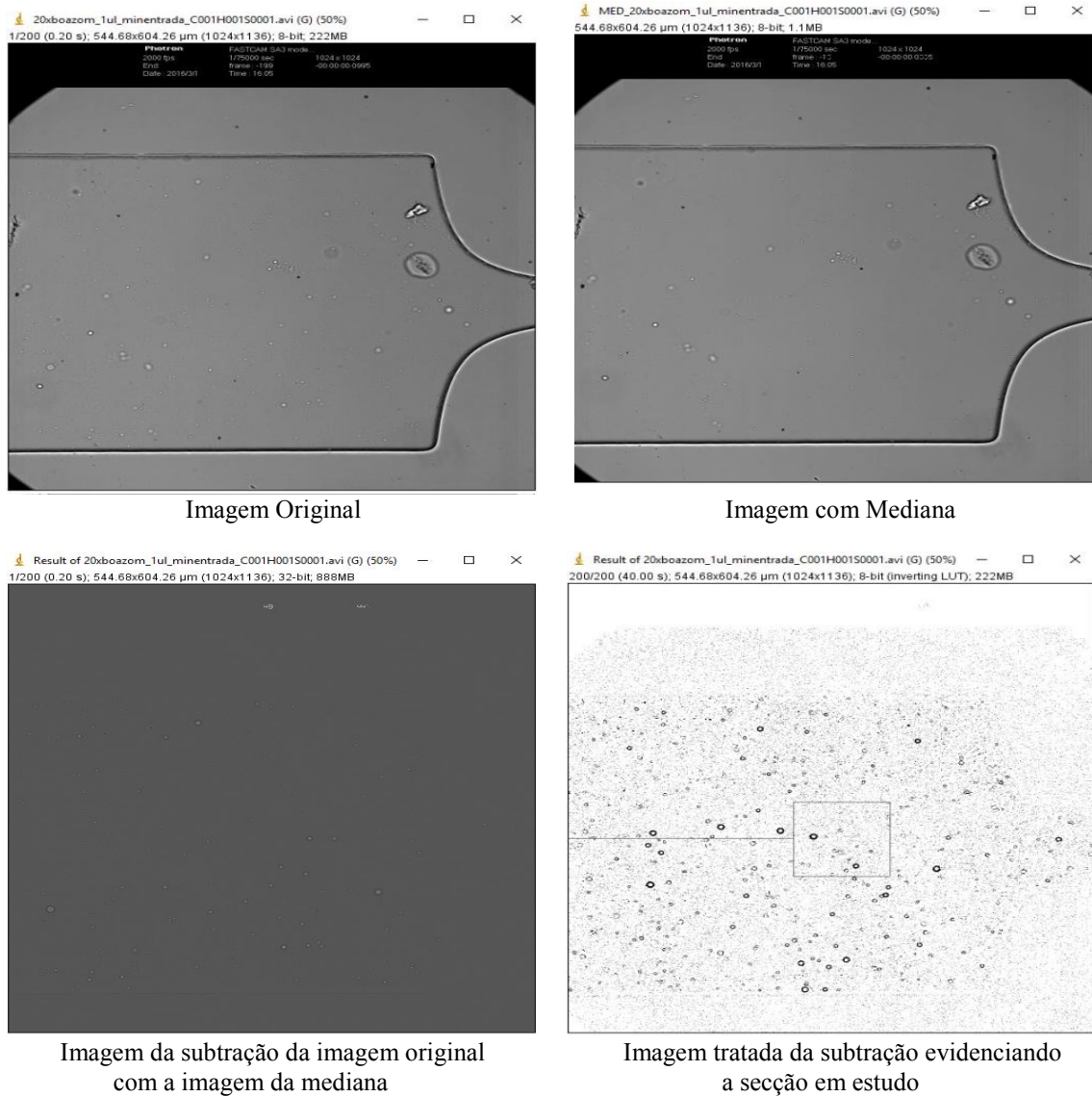
- Between NBD-PE and N-Rh-PE,” *J. Liposome Res.*, vol. 10, no. 4, pp. 419–429, 2000.
- [27] P. Greenspan and S. D. Fowler, “Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red,” *J. Lipid Res.*, vol. 26, no. 7, pp. 781–789, 1985.
- [28] G. Krishnamoorthy and Ira, “Probing the link between proton transport and water content in lipid membranes,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 105, pp. 1484–88, 2001.
- [29] P. J. G. Coutinho, E. M. S. Castanheira, M. Céu Rei, and M. E. C. D. Real Oliveira, “Nile Red and DCM Fluorescence Anisotropy Studies in C 12 E 7 /DPPC Mixed Systems,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 106, pp. 12841–12846, 2002.
- [30] A. R. O. Rodrigues, I. T. Gomes, B. G. Almeida, J. P. Araújo, E. M. S. Castanheira, and P. J. G. Coutinho, “Magnetoliposomes based on nickel/silica core/shell nanoparticles: Synthesis and characterization,” *Mater. Chem. Phys.*, vol. 148, no. 3, pp. 978–987, 2014.
- [31] A. R. O. Rodrigues, I. T. Gomes, B. G. Almeida, J. P. Araújo, E. M. S. Castanheira, and P. J. G. Coutinho, “Magnetic liposomes based on nickel ferrite nanoparticles for biomedical applications,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, pp. 18011–18021, 2015.
- [32] J. Calejo, D. Pinho, F. J. Galindo-Rosales, R. Lima, and L. Campo-Deaño, “Particulate blood analogues reproducing the erythrocytes cell-free layer in a microfluidic device containing a hyperbolic contraction,” *Micromachines*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, 2016.
- [33] T. Yaginuma, M. S. N. Oliveira, R. Lima, T. Ishikawa, and T. Yamiguchi, “Human red blood cell behavior under homogeneous extensional flow in a hyperbolic-shaped microchannel,” *Biomicrofluidics*, vol. 7, no. 5, 2013.
- [34] R. O. Rodrigues, R. Lopes, D. Pinho, A. I. Pereira, V. Garcia, S. Gassmann, P. C. Sousa, and R. Lima, “In vitro blood flow and cell-free layer in hyperbolic microchannels: visualizations and measurements,” *BioChip J.*, vol. 10, no. 1, pp. 9–15, 2016.

- [35] V. Faustino, S. O. Catarino, R. Lima, and G. Minas, “Biomedical microfluidic devices by using low-cost fabrication techniques: A review,” *J. Biomech.*, 2016.
- [36] T. Ferreira and W. Rasband, “ImageJ User Guide IJ 1.46r,” *IJ 1.46r*, p. 185, 2012.
- [37] V. Faustino, D. Pinho, T. Yaginuma, R. C. Calhelha, I. C. F. R. Ferreira, and R. Lima, “Extensional flow-based microfluidic device: deformability assessment of red blood cells in contact with tumor cells,” *BioChip J.*, vol. 8, no. 1, pp. 42–47, 2014.
- [38] Y. Zheng, J. Nguyen, Y. Wei, and Y. Sun, “Recent advances in microfluidic techniques for single cell biophysical characterization,” in *Lab Chip*, 2013, pp. 2464–2483.
- [39] M. Diez-Silva, D. Ming, H. Jongyoon, L. Chwee-Teck, and S. Subra, “Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease,” *MRS Bull.*, vol. 35, no. 5, pp. 382–388, 2010.



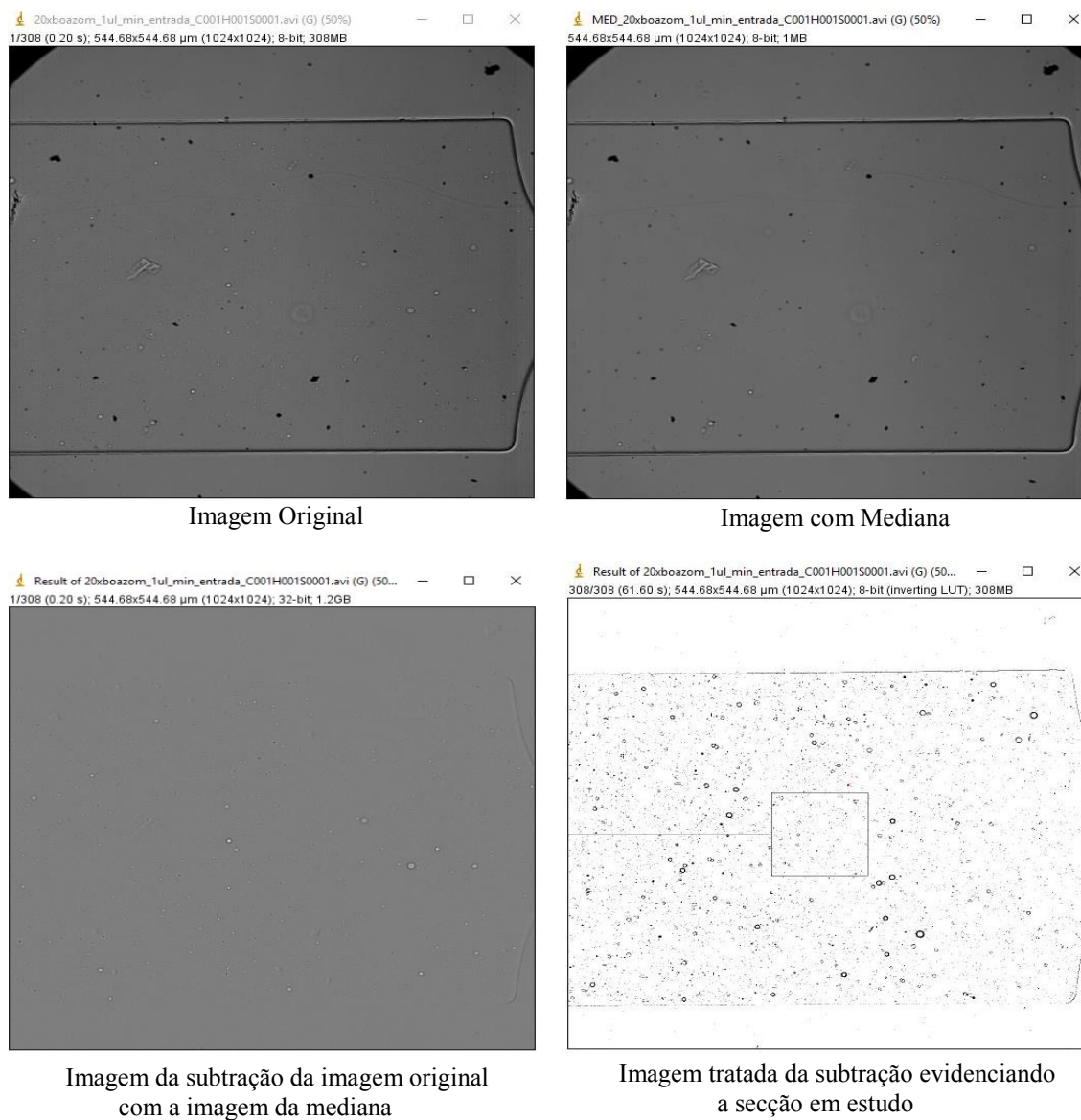
## Anexo A. Imagens obtidas através do *software Image J* para o estudo da densidade

### Solução C1



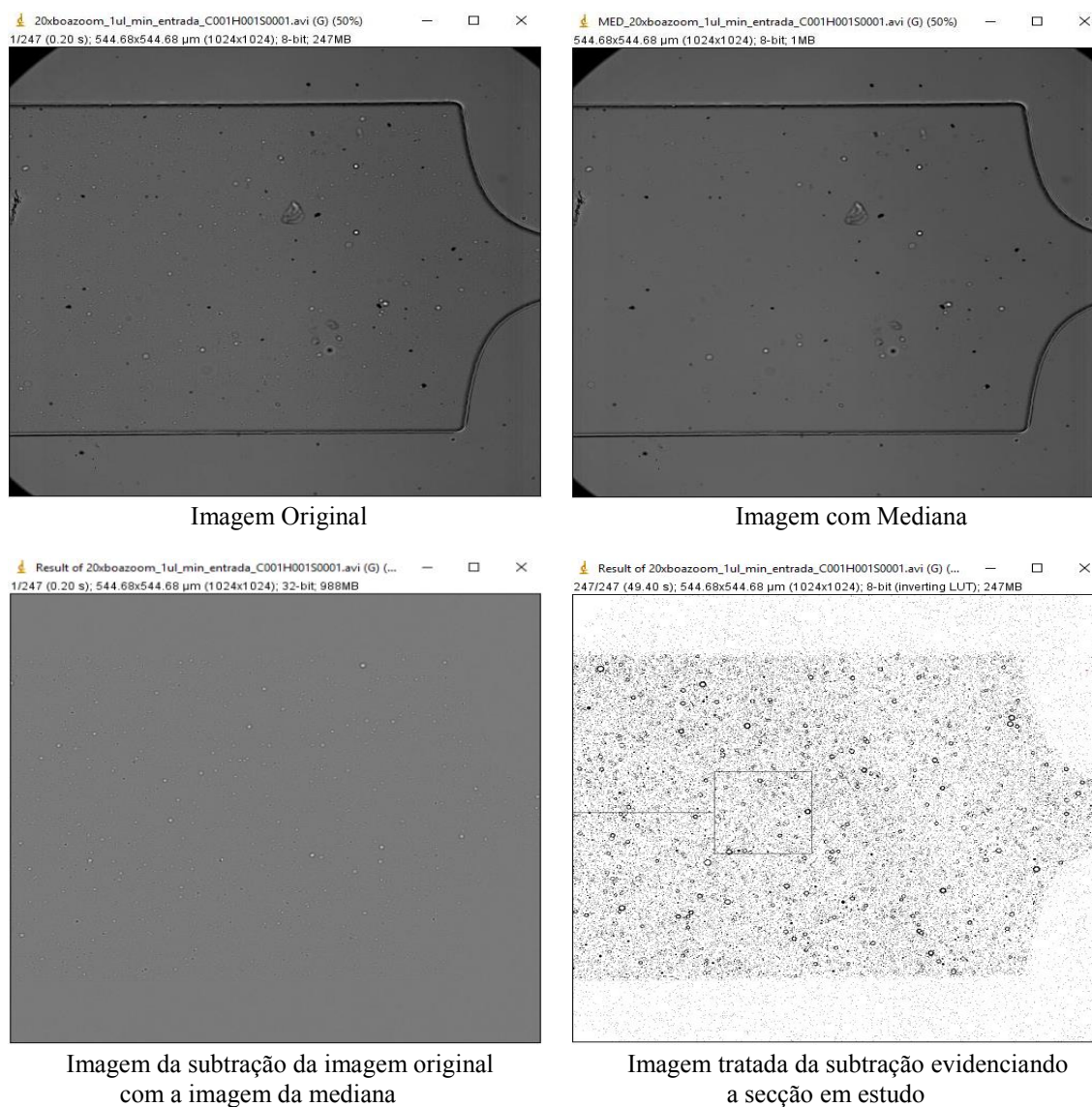
**Figura A. 1** - Imagens obtidas através do *software Image J* para o estudo da densidade da solução C1.

## Solução C2



**Figura A. 2** - Imagens obtidas através do *software Image J* para o estudo da densidade da solução C2.

### Solução C3

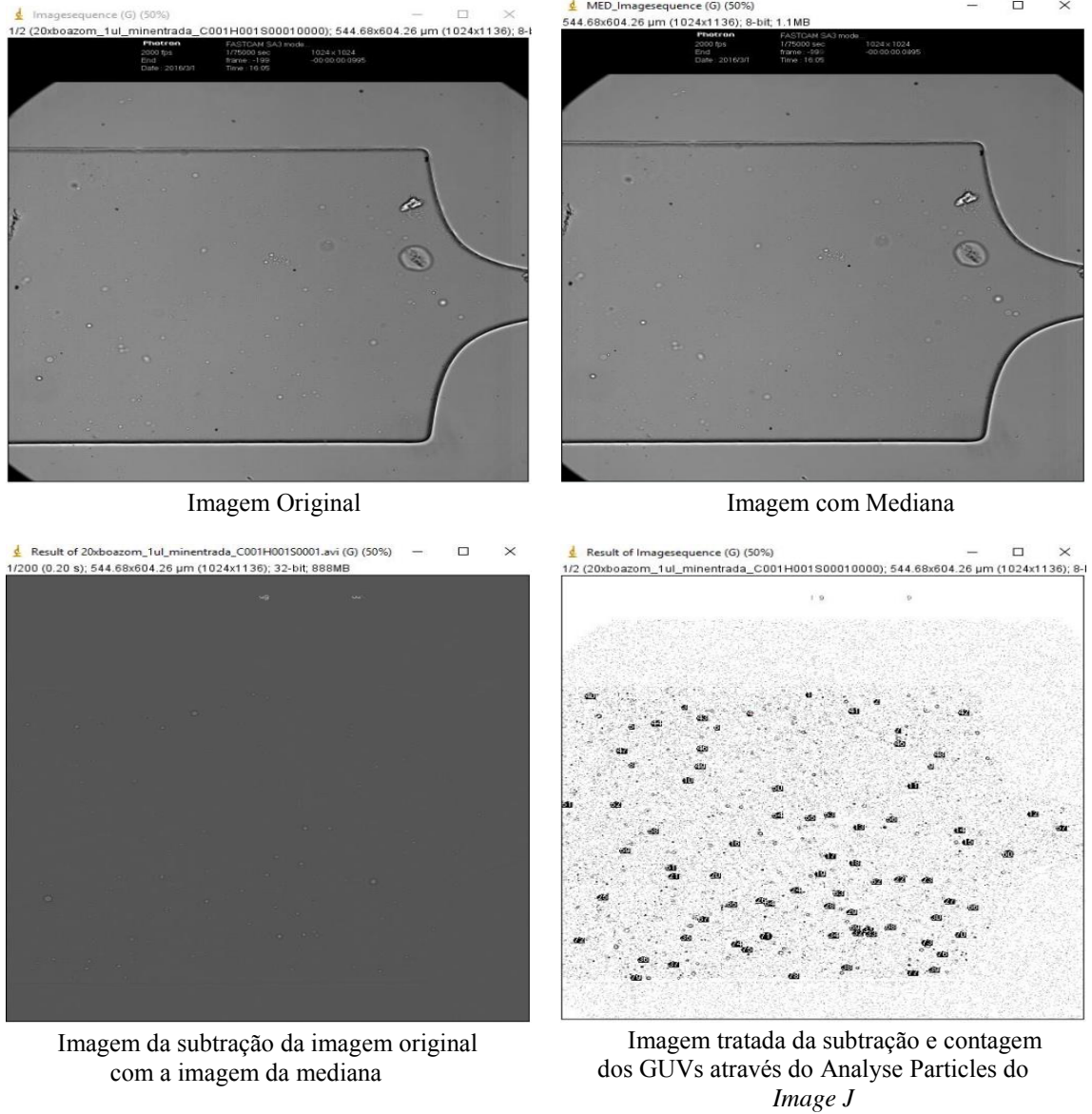


**Figura A. 3** - Imagens obtidas através do *software Image J* para o estudo da densidade da solução C3.



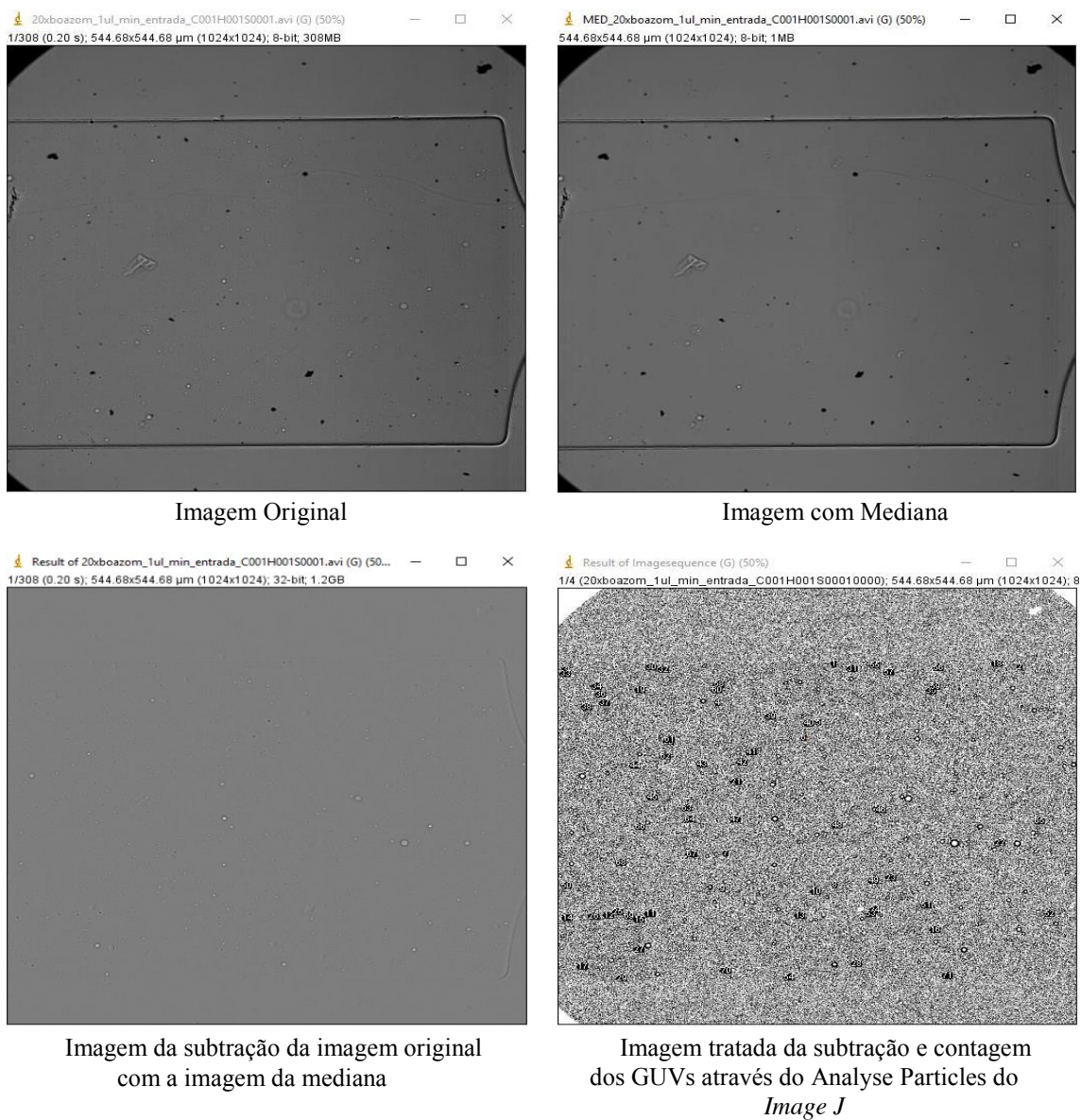
## Anexo B. Imagens obtidas através do software *Image J* para o estudo dos diâmetros

### Solução C1



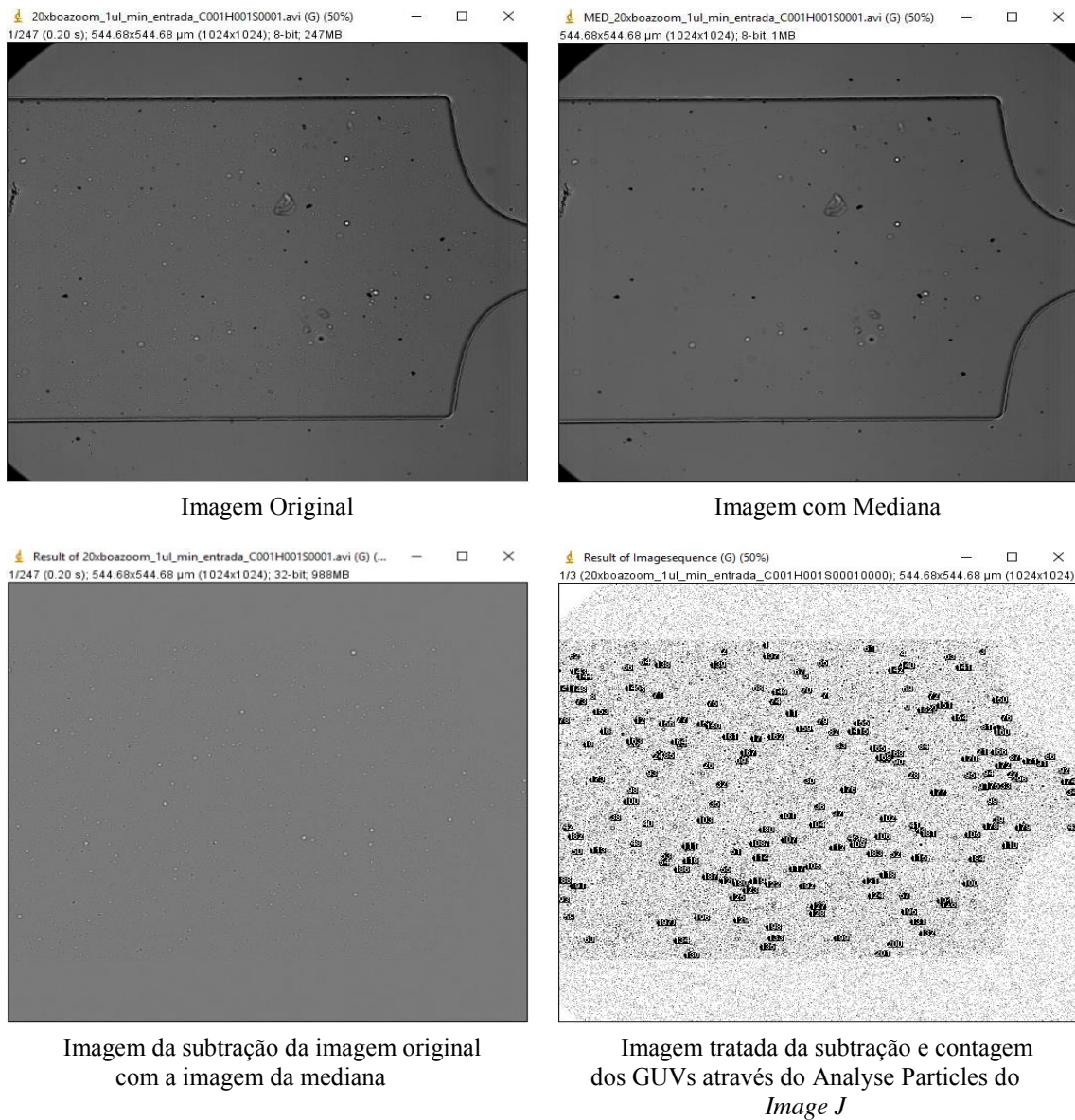
**Figura B. 1** - Imagens obtidas através do software *Image J* para o estudo dos diâmetros da solução C1.

## Solução C2



**Figura B. 2** - Imagens obtidas através do software Image J para o estudo dos diâmetros da solução C2.

### Solução C3



**Figura B. 3** - Imagens obtidas através do software Image J para o estudo dos diâmetros da solução C3.