

Fabrico de Microdispositivos a Laser para Aplicações Biomédicas

Júlia Cristina Alves Soares

Relatório Final de Trabalho de Projeto apresentado à
Escola Superior de Tecnologia e Gestão
Instituto Politécnico de Bragança

Para obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia Biomédica

Bragança, dezembro de 2016

Fabrico de Microdispositivos a Laser para Aplicações Biomédicas

Júlia Cristina Alves Soares

Relatório Final de 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 a orientação de:

Professor Dr. João Rocha

Professor Dr. Valdemar Garcia

Esta dissertação inclui as criticas sugeridas pelo juri.

Bragança, dezembro de 2016

“Os sonhos não determinam o lugar onde você vai estar, mas produzem a força necessária para o tirar do lugar onde está.”

Augusto Cury

Agradecimentos

No momento em que dou por terminada esta dissertação, quero agradecer:

Ao Professor Dr. Rui Lima, pela sua ajuda na organização de ideias face ao tema em causa, pelas sugestões dadas e pela sua disponibilidade prestada sempre que foi necessária.

Ao Professor Dr. João Rocha por estar presente e ter ajudado em algumas etapas da concretização deste trabalho e pela prestação dos seus conhecimentos e explicações.

À mestre Diana Pinho, que me ajudou, maioritariamente, na parte dos escoamentos sanguíneos, desenvolvido no Laboratório de Mecânica dos Fluidos e Hidráulica (LMFH - ESTiG), sendo foi uma fiel companheira ao longo do projeto em causa, pelo acompanhamento cuidado, mostrando-se sempre disponível e atenta ao desenvolvimento do trabalho, contribuindo com os seus conhecimentos e, principalmente, pela generosidade que demonstrou sempre que a procurei.

Ao Professor Dr. Jorge Santos, que me auxiliou na parte de fabrico realizada no laboratório de fabrico (FabLab) do IPB, demonstrando-se sempre disponível para ajudar no manuseamento da máquina a laser de CO₂, ajudando na conceção dos microcanais, por toda a ajuda possível através dos seus conhecimentos relativos a esta técnica e pelo acompanhamento realizado em todos os testes efetuados.

Ao Professor Dr. Valdemar Garcia que se mostrou sempre prestável, compreensivo e disposto a ajudar.

Por fim, mas definitivamente não por último, uma palavra de enorme apreço à minha família e aos meus amigos em geral, que tiveram de suportar as minhas indisposições, mas que sempre acreditaram e nunca deixaram de me encorajar.

Resumo

O corte por laser é uma tecnologia cada vez mais vulgar na indústria, na medida em que o custo dos seus equipamentos tem vindo a descer em simultâneo com o aumento das suas capacidades.

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um processo de fabrico de dispositivos microfluídicos baseados utilizando um equipamento laser de CO₂ para o estudo e caracterização de escoamentos sanguíneos. Inicialmente efetuaram-se escoamento sanguíneos nos microcanais feitos por litografia suave, usando um hematócrito (Htc) de 1, 2.5, 5, 10 15 e 20 % com caudais de 5, 10, 15 e 20 µl/min, para poder-se efetuar uma análise sobre a influência do Htc na formação da camada livre de células, CLC. O Htc de 5% apresentou uma considerável CLC, sendo escolhido para trabalhar com os canais fabricados a laser proporcionando uma melhor visualização, visto que apresentam dimensões maiores em relação aos canais criados por litografia. Numa primeira fase procurou-se correlacionar alguns parâmetros operativos da máquina a laser, tais como a velocidade de corte (*Speed*), a potência do feixe (*Power*) e os pontos por disparo (PPI), de modo a obter-se um rasgo mais limpo e mais perfeito. Os melhores parâmetros foram com o *Speed* (0.6), *Power* (1) e PPI (200). Depois, passou-se para a construção da geometria do canal de seção transversal, através do uso do laser, com uma estenose de 75%. A segunda fase do processo de produção do sistema microfluídico em causa envolveu a sua selagem através de dois métodos: com uma película de poliéster colada diretamente no microcanal e através da junção do microcanal com uma lâmina de vidro e com PDMS, que serviu como meio de adesão. De salientar que os melhores resultados relativamente à selagem foram alcançados com a película de poliéster e em termos de visualização, foram obtidos com a selagem através da lâmina de vidro. A terceira etapa englobou a interconexão com o meio externo, através da inserção dos tubos de plásticos na entrada e saída dos microcanais e a as respetivas ligações aos equipamentos para os testes de escoamentos sanguíneos. A visualização do escoamento fez-se utilizando um sistema confocal de microscopia e captaram-se várias imagens dos microcanais, nomeadamente na região da estenose. As imagens foram posteriormente tratadas com o *plugin MtrackJ*, quantificando a espessura da camada de plasma nas paredes do microcanal.

Palavras-chave: Microfabricação, PMMA, Laser de CO₂, Microfluídica.

Abstract

Laser cutting is a technology that is increasingly common in the industry, to the extent that the cost of its equipment has been going down simultaneously with the increase of its capabilities.

This paper describes the development of a manufacturing process of fluidic microdevices based on the use of a CO₂ laser equipment for the study and characterization of blood flows. Initially the office blood flows in microchannels made by soft lithography, using Htc of 1, 2.5, 5, 10, 15 and with flow rates of 5, 10, 15 and 20 µl/min, in order to a review on the influence of Htc in the formation of the CLC.

The Htc of 5% presented a considerable CLC, being chosen to work with the laser-produced channels providing a better view, since present bigger than those made by lithography. Initially sought to correlate some machine operating parameters, such as laser cutting speed (Speed), the beam power (Power) and points by shooting (PPI), in order to obtain a cleaner and more perfect. The best parameters were with the Speed (0.6), Power (1) and PPI (200). Later, it moved to the building of the canal geometry of the channel cross-section that featured a 75% stenosis. The second phase of the production process of the microfluidic system in question involved the sealing of this through two experiments: with a polyester film and placed directly into the microchannel and across the junction of microchannel with a sheet of glass and with PDMS, which served as a means of accession. It should be noted that the best sealing results were achieved with the polyester pellet and in terms of visualization were obtained by sealing through the glass slide. The third step involved the interconnection with the external environment, through the insertion of plastic pipes in input and output of the microchannels and the respective links to equipment for testing of blood flows. The visualization of the flow was using a microscopy system and captured several images of the microchannels, in particular before, in the stenosis region and after that. The images were subsequently treated with the MtrackJ plugin, quantifying the thickness of the plasma layer microchannel walls.

Keyword: Microfabrication, PMMA, CO₂ Laser; Microfluidic.

Índice

Capítulo 1	1
Introdução.....	1
1.1. Enquadramento e Motivação	1
1.2. Objetivos.....	2
1.3. Estrutura do Trabalho	3
Capítulo 2	5
Fundamentação Teórica.....	5
2.1. Introdução	5
2.1.1. Sistema Circulatório.....	5
2.1.1.1. Vasos sanguíneos.....	5
2.1.2.1. Composição do sangue	8
Hematócrito.....	8
2.1.3. Microcirculação.....	10
2.1.3.1. Formação da Camada de Plasma em Microcanais	12
2.1.3.2. Efeito de Fårhæus e de Fårhæus-Lindqvist	13
2.1.4. Escoamento Sanguíneo	15
2.1.5. Hemorreologia.....	17
2.1.5.1. Matéria e deformação	17
2.1.5.2. Comportamento não-newtoniano do sangue	18
Viscosidade do Sangue	19
2.1.6. Patologia Vascular	22
2.1.6.1. Estenose	22
2.1.7. Revisão da literatura sobre estudos em microdispositivos com estenose	24
2.2. Tecnologia Laser de Corte	27
2.2.1. Introdução Histórica.....	27
2.2.2. Introdução ao Processo de Microfabricação a Laser.....	28
2.2.3. Tipos de laser	29

2.2.3.1. Laser de excímeros	30
2.2.3.2. Lasers de estado sólido	30
2.2.3.3. Lasers de fibras	30
2.2.3.4. Lasers de díodos (semicondutores).....	31
2.2.3.5. Laser de CO ₂	31
2.2.4. Uso do corte a laser na fabricação de microcanais em estudos de escoamentos sanguíneos.....	31
Capítulo 3	35
Escoamento no microcanal com estenose	35
3.1. Microfabricação	35
3.1.1. Fotolitografia.....	36
3.1.2. Litografia Suave	37
3.1.2. Geometria dos canais obtidos por Litografia Suave.....	38
3.1.3. Preparação da Amostra	39
3.1.4. Visualização dos escoamentos nos microcanais	40
Capítulo 4	43
Tecnologia Laser na Microfabricação	43
4.1. Caracterização do sistema do laser de CO ₂ usado	43
4.1.1. Princípio de funcionamento do laser de CO ₂	44
4.1.2. Parâmetros do processo de corte	46
4.1.3. Manuseamento do software utilizado.....	47
4.1.4. Principais componentes e sistemas da máquina a laser de CO ₂	49
4.1.4.1. Painel de Controlo.....	49
4.1.4.2. Abertura frontal e traseira.....	50
4.1.4.3. Focagem automática	50
4.1.4.4. Botão de paragem de emergência.....	51
4.1.4.5. Sistema de movimento com DC Servo Motor.....	51
4.1.4.7. Sistemas	52

4.2. Material usado para o corte a laser	54
4.2.1. PMMA.....	54
4.3. Fabrico dos microcanais pela técnica de laser	55
4.5. Visualização dos escoamentos sanguíneos	61
4.6. Otimização do método de selagem	64
Capítulo 5	69
Resultados e sua Discussão	69
5.1. Microfabricação	69
5.1.1. Otimização dos parâmetros a laser.....	69
• Variação do Power1 com Speed (0.4).....	70
• Variação do Power2 com Speed (0.4).....	70
• Variação do Speed com Power (2) e PPI (400)	71
• Variação do PPI com Speed (0.4) e Power (2)	72
• Variação do Power1 com Speed (0.4).....	73
• Variação do Power2 com Speed (0.4).....	73
• Variação do Speed com Power (2) e PPI (400)	74
• Variação do PPI com Speed (0.4) e Power (2)	75
• Variação do PPI com Speed (0.6) e Power (2)	76
• Variação do Speed com Power (1) e PPI (100)	76
5.2. Medidas dos microcanais	78
5.2.1. Laser.....	78
5.2.2. Litografia.....	79
5.3. Métodos de selagem e visualização	80
5.4. Medição da espessura da camada de plasma	81
Capítulo 6	85
Conclusões e Trabalhos Futuros.....	85
Bibliografia.....	89
Anexos	103

Índice de Figuras

Figura 1 - A - Diagrama de uma secção transversal capilar. B - Micrografia eletrónica de um capilar contendo um único eritrócito. A longa dimensão da célula sanguínea é de aproximadamente 7 μm , adaptado de [9].	6
Figura 2 - Características comparativas dos vasos sanguíneos adaptado de [9].	7
Figura 3 - Representação dos constituintes do sangue, obtidos após centrifugação, adaptado de [13].	9
Figura 4 - Constituintes do sangue, adaptado de [14].	10
Figura 5 – Diagrama da microcirculação, adaptado de [9].	11
Figura 6 – Difusão de moléculas de líquido e de substâncias dissolvidas entre o capilar e os espaços do líquido intersticial [16].	11
Figura 7 - Pressão sanguínea nos diferentes vasos do sistema circulatório [7].	12
Figura 8 – Visualização da camada de plasma junto às paredes num microcanal utilizada neste trabalho.	13
Figura 9 - Variação da viscosidade do sangue com o diâmetro do tubo, que ilustra o efeito Fahraeus-Lindqvist, adaptado de [25].	14
Figura 10 - Representação esquemática do fluxo laminar (A) e do turbulento (B) de partículas líquidas num tubo cilíndrico [28].	15
Figura 11 - Relação entre resistência ao fluxo e o número de Reynolds. Quando o fluxo laminar (A) se transforma em turbulento (B), em X (número de Reynolds), a resistência aumenta [28].	16
Figura 12 – Variação da tensão de corte e da viscosidade em relação à taxa de corte, para um fluido newtoniano e não-newtoniano [30].	18
Figura 13 - Esquema de velocidade parabólica do fluxo laminar do sangue [31].	19
Figura 14 – (a) – Aglomerados de GV's, rouleaux; (b) – Viscosidade do sangue em função da taxa de corte, adaptado de [32, 33].	21
Figura 15 - Efeito do hematócrito sobre a viscosidade sanguínea. (Viscosidade da água=1) [11].	22

Figura 16 - Aterosclerose. A – Artéria normal; B – Artéria com placa de gordura; C – Formação do coágulo de sangue, adaptado de [37, 38].	23
Figura 17 - Imagens laterais do desvio axillobifemoral que mostram várias estenoses leves e uma estenose grave (seta). Note-se a ausência de realce na aorta infrarrenal em B, resultado de uma trombose [39].	24
Figura 18 - Esquema ilustrativo de um laser de rubi [48].	27
Figura 19 – A luz solar focada através de uma lupa converge e pode queimar papel [49].	28
Figura 20 - Diferentes vertentes onde é aplicada a microfluídica, adaptado de [64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71,72].	36
Figura 21 – Etapas do processo de fotolitografia [76].	37
Figura 22 - Processo de litografia suave [75].	38
Figura 23 - Geometria dos canais obtidos pela técnica de litografia suave.	38
Figura 24 – A – Amostra de sangue; B – Centrifugação; C – Obtenção do hematócrito.	40
Figura 25 – Sistema de microscopia utilizado neste trabalho.	41
Figura 26 - Trajetórias representativas dos glóbulos vermelhos e identificação dos limites do microcanal após a estenose, no canal feito por litografia.	42
Figura 27 - Máquina a laser, modelo X252 da Portlaser.	43
Figura 28 – Representação esquemática do funcionamento do laser de CO ₂ , adaptado de [80, 81, 82].	46
Figura 29 - Janela do driver da máquina de corte e gravação laser.	48
Figura 30 - Apresentação esquemática dos modos de ablação do laser X252 num modelo de corte em “T [51]”.	48
Figura 31 - Painel de controlo.	49
Figura 32 - Abertura da porta da frente do laser.	50
Figura 33 - Cabeça do laser.	50
Figura 34 - Botão de paragem de emergência.	51
Figura 35 - DC Servo Motor.	51
Figura 36 - Origem programável do laser.	52
Figura 37 - Esquema simplificado dos componentes principais da máquina a laser [57].	53
Figura 38 - A -Monómero metilmetacrilato [86]; B – Placas de PMMA.	54

Figura 39 - Perfis do laser. A – Perfil desejado; B - Perfil gaussiano normalmente obtido através do laser.	55
Figura 40 - Teste de variação da potência, com Speed (0.4).....	56
Figura 41 - Rasgos efetuados a laser na placa de acrílico.	57
Figura 42 - Rasgos criados pelas lentes de 1.5’’ e 2’’ com Power (1) e Speed (0.4). 1 – A - 1016.667 μm ; B - 591.438 μm ; C - 141.613 μm ; 2 - A- 611.765 μm ; B - 294.118 μm ; C- 117.647 μm	57
Figura 43 - Geometria simples com um estreitamento do canal. A – Desenho no CorelDRAW; B – Corte dos canais a laser na placa de PMMA.	58
Figura 44 - Speed (0.6); Power (2); PPI (200). 1. A - 1272.222 μm ; B - 538.889 μm ; C - 533.333 μm ; D - 1277.778 μm . 2. A - 725 μm	58
Figura 45 - Geometria dos microcanais e respectivos parâmetros no Corel Draw.	59
Figura 46 - Geometrias dos canais obtidos através do laser.....	60
Figura 47 - Limpeza dos microcanais através do agitador magnético.	60
Figura 48 - A - Película de políéster usada na selagem; B – Dispositivos microfluídicos.	61
Figura 49- Sistema microfluídico usado no escoamento sanguíneo.....	62
Figura 50 - Visualização do escoamento no microcanal (região da estenose). A – Antes do polimento; B – Depois do polimento.....	62
Figura 51 - Canais com o aumento da estenose. L2 (aumento da estenose em duas vezes mais) e L5(aumento da estenose em 5 vezes mais).	63
Figura 52 - A - Ligação dos tubos e isolamento com cola transparente nos microcanais; B - Montagem do equipamento para a visualização dos escoamentos sanguíneos.	64
Figura 53 - A - Polímero PDMS e agente cura, respectivamente; B – Balança analítica; C – Homogeneização da solução através da espátula; D – Bomba de vácuo para a remoção das bolhas de ar.....	65
Figura 54 - Spin-coater.	66
Figura 55 - Microcanal selado com a lâmina de vidro.	66
Figura 56 - Escoamento sanguíneo em microcanal selado com a lâmina.	67
Figura 57 - Representação de um rasgo feito através do laser. A - Profundidade do canal; B - Entrada do canal e C - Saída do canal.....	69
Figura 58 - Rasgo obtido com o Power (25) e Speed (0.4).	71
Figura 59 - Rasgo obtido com Speed (0.6), Power (2), PPI (400). A - 383.333 μm ; B - 258.904 μm ; C - 139.726 μm	77

Figura 60 - Rasgo obtido com Speed (0.6), Power (1), PPI (200). A- 390.805 μm ; B - 321.839 μm ; C- 179.31 μm	77
Figura 61 - Largura do microcanal grande. A - 1240.205 μm ; B - 354.838 μm ; C - 1260.648 μm	79
Figura 62 -- Largura do microcanal pequeno. A - 1345.826 μm ; B - 531.183 μm ; C - 1339.012 μm	79
Figura 63 - Largura do microcanal criado por litografia. A -108.108 μm ; B - 32.432 μm ;	80
Figura 64 - Escoamento sanguíneo nos microcanais para o caudal de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. A – Selagem com a película de poliéster; B – Selagem com a lâmina.	81
Figura 65 - Medição da espessura da camada de plasma, para vários valores de caudal e hematócritos.....	81
Figura 66 - Espessura da camada de células para o canal L2 e L5, variando o caudal com um Htc de 5%.	82

Índice de Tabelas

Tabela I – Características técnicas da máquina a laser de CO ₂ modelo X252.....	44
Tabela II - Variação do <i>Power1</i> com <i>Speed</i> (0.4)	70
Tabela III - Variação do <i>Power2</i> com o <i>Speed</i> (0.4).....	70
Tabela IV - Variação do <i>Speed</i> com <i>Power</i> (2) e PPI (400).....	71
Tabela V - Variação do PPI com <i>Speed</i> (0.4) e <i>Power</i> (2).....	72
Tabela VI - Variação do <i>Power1</i> com <i>Speed</i> (0.4).....	73
Tabela VII - Variação do <i>Power2</i> com <i>Speed</i> (0.4).	73
Tabela VIII - Variação do <i>Speed</i> com <i>Power</i> (2) e PPI (400).....	74
Tabela IX - Variação do PPI com <i>Speed</i> (0.4) e <i>Power</i> (2).....	75
Tabela X - Variação do PPI com <i>Speed</i> (0.6) e <i>Power</i> (1).....	76
Tabela XI - Variação do PPI com <i>Speed</i> (0.6) e <i>Power</i> (2).....	76
Tabela XII - Variação do <i>Speed</i> com <i>Power</i> (1) e PPI (100).	76

Lista de Abreviaturas e Siglas

AutoCad - Computer Aided Design

AVC - Acidente Vascular Cerebral

CAD - *Computer-aided design*

CAM - *Computer-aided manufacturing*

CLC - Camada livre de células

CO₂ - Dióxido de Carbono

GV - Glóbulo vermelho

GV's - Glóbulos vermelhos ou hemácias ou eritrócitos

He - Hélio

Htc - Hematócrito

LCD - *Liquid crystal display*

mm - milímetros

mW - Megawatt

N₂ - Azoto

O₂ - Oxigénio

PDMS - Polidimetilsiloxano

PMMA - Polimetilmetacrilato

PPI - *pulses per inch*

Re - Número de *Reynolds*

rpm – rotações por minuto

ZAC - Zona Afetada pelo Calor

°C - Graus Celsius

µm - micrómetros

ε – Rugosidade

Capítulo 1

Introdução

1.1. Enquadramento e Motivação

O tema deste trabalho intitulado “Fabrico de microdispositivos a laser para aplicações biomédicas”, foi proposto no âmbito do mestrado em Tecnologia Biomédica, tendo com objetivo a obtenção do grau de mestre.

A Microfluídica desempenha um papel importante no desenvolvimento de muitas atividades de investigação inovadoras que visam o desenvolvimento de dispositivos e sistemas miniaturizados, e novas aplicações relacionadas com a manipulação de fluidos em microescala [1]. A produção de dispositivos com canais com dimensões micrométricas tem permitido a redução de custos com a matéria-prima e com o processo de fabrico dos próprios dispositivos, o que na atualidade, tem possibilitado criar sistemas de análises complexos, distribuídos em substratos de baixo custo e com alguns centímetros quadrados. A estas vantagens podemos acrescentar as facilidades de manipulação e operação dos sistemas e a considerável redução do uso de substâncias e reagentes, pois trabalha-se com volumes da ordem de nano ou mesmo picolitros [2].

Durante a última década, a tecnologia de microfabricação tem sido utilizada para desenvolver um certo número de sistemas microfluídicos em silício, vidro, quartzo e, mais recentemente em materiais poliméricos [1]. O surgimento de novas tecnologias possibilitou a obtenção de novos materiais e novos métodos de manufatura. Segundo Steen, hoje em dia o uso de um feixe laser como ferramenta está entre os métodos de processamento de materiais mais avançados e modernos, ocupando uma posição de destaque na indústria, apresentando inclusive um crescimento superior em relação a outros processos. Este facto deve-se, em grande parte, à sua capacidade de oferecer soluções para projetos que requerem processos de difícil, ou mesmo, de impossível execução por métodos tradicionais [2].

A microfabricação de dispositivos fluídicos através do laser é uma tecnologia relativamente nova e, portanto, possui diversos desafios. Esses problemas serão solucionados através de vários estudos e testes [3].

Nas últimas décadas, as doenças cardiovasculares tornaram-se a terceira maior causa de mortalidade em todo o mundo, onde a estenose é de especial preocupação. O estudo do fluxo sanguíneo através de uma artéria estenosada é muito importante, porque a natureza do fluxo sanguíneo e o comportamento mecânico das paredes dos vasos são causas de muitas doenças cardiovasculares. A geometria complexa das artérias (flexão, bifurcações, estenose, etc.) é também um fator importante, o que obviamente afeta a hemodinâmica local [4].

Estudos do comportamento hemodinâmico do sangue em microcanais que reproduzem os vasos mais pequenos como as arteríolas ou capilares, são cruciais para a obtenção de informação clínica importante que pode ser utilizada para a deteção precoce e tratamento de perturbações circulatórias e outras doenças associadas [5].

1.2. Objetivos

Os principais objetivos deste trabalho são:

- Aplicar a tecnologia de corte a laser de CO₂ na fabricação de microdispositivos fluídicos, otimizando o processo de corte. Para tal, correlacionaram-se alguns parâmetros operacionais da máquina, tais como, o *Power*, o *PPI* e o *Speed*;
- Comparação entre os métodos de microfabricação: litografia e laser de CO₂;
- Otimizar o processo de selagem do microcanal para garantir a adequada funcionalidade deste e permitir visualizar melhor os escoamentos sanguíneos;
- Compreender o efeito da estenose na formação da camada de plasma.

1.3. Estrutura do Trabalho

No capítulo 2 é apresentada a fundamentação teórica que culmina em dois temas principais: o sangue e a tecnologia a laser de corte.

No que diz respeito ao sangue vão ser abordadas as suas características, a descrição dos vasos por onde circula e uma patologia clínica, que é a estenose, que pode levar a doenças graves como AVC's. Relativamente a esta parte é efetuada uma revisão da literatura sobre estudos em microdispositivos com estenoses/estreitamentos.

Quanto à tecnologia a laser, é apresentada uma descrição desta tecnologia, nomeadamente, as características do laser de CO₂, bem como uma pequena descrição de outros tipos de laser existentes, para uma melhor perceção das diferenças entre os diferentes processos. É feita uma revisão bibliográfica neste capítulo acerca do uso do corte a laser de CO₂ na fabricação de microcanais para estudos de escoamentos sanguíneos.

No capítulo 3 é apresentada uma descrição do processo de microfabricação e a sua importância atualmente. São ainda apresentados os microdispositivos fabricados pela técnica de litografia suave, que já estavam disponíveis para os testes de escoamentos, os fluidos de trabalho e o *set-up* usado para a visualização dos escoamentos sanguíneos efetuados nos microcanais estenosados.

No capítulo 4 é apresentada a tecnologia a laser de CO₂ usada neste estudo, bem como os componentes associados e os parâmetros operativos correlacionados entre si. São explicadas todas as etapas de fabricação, desde a criação da geometria dos canais, o manuseamento do *software* associado ao laser e o material utilizado.

No capítulo 5 é apresentada a discussão dos resultados, no que concerne à comparação entre os dois processos de fabrico: litografia e laser de CO₂. É efetuada a comparação entre os dois processos no que diz respeito ao fabrico dos microcanais, à

comparação entre as medidas dos canais criados a laser e por litografia e os valores teóricos das geometrias e também a medição da espessura da camada de plasma nos microcanais estenosados.

No capítulo 6 são expostas as conclusões gerais do presente trabalho e são apresentadas algumas sugestões para a continuação desta pesquisa.

Capítulo 2

Fundamentação Teórica

2.1. Introdução

Neste capítulo apresenta-se uma descrição do sistema circulatório, bem como os vasos sanguíneos que levam o sangue a todo o corpo. Expõem-se ainda as características e propriedades do sangue, bem como uma patologia vascular, inserida neste contexto: a estenose.

2.1.1. Sistema Circulatório

O sistema circulatório é constituído pelo sistema cardiovascular e pelo sistema linfático. O sistema cardiovascular distribui o sangue, em circuito fechado, através de uma rede tubular de artérias, veias e capilares. O sistema linfático é um sistema aberto, constituído por vasos, gânglios e linfa, sendo esta um filtrado de plasma em excesso que passa do sangue para o espaço intersticial ao nível dos capilares sanguíneos. Os vasos linfáticos transportam a linfa até às veias subclávias, onde se mistura com o sangue [6].

O sistema circulatório está dividido em dois circuitos: a circulação pulmonar ou pequena circulação, que transporta o sangue da parte direita do coração para as trocas gasosas respiratórias e a circulação periférica ou sistémica, responsável pelo transporte do sangue a todos os tecidos para a entrega de oxigénio e demais nutrientes. Os componentes que compõem o sistema sanguíneo são o coração, os vasos sanguíneos e o sangue [6,7].

2.1.1.1. Vasos sanguíneos

O sistema de circulação do corpo humano é muito vasto e extremamente complexo, contendo vasos sanguíneos com dimensões que variam entre 5 μm e 3 cm de diâmetro

[8]. As **artérias** são os vasos que levam o sangue do coração para os órgãos e tecidos corporais. Estas apresentam uma parede relativamente espessa, constituída por três camadas de tecido. Quando a musculatura da parede arterial se contrai, o seu diâmetro interno diminui; o relaxamento da musculatura, por outro lado, leva ao aumento do diâmetro interno da artéria. A contração e o relaxamento da parede das artérias permitem controlar a pressão sanguínea que circula em determinada região do corpo. As artérias que partem do coração ramificam-se progressivamente em artérias menores, atingindo todas as partes do corpo. Nos órgãos e tecidos, os finíssimos ramos terminais das artérias, denominadas **arteríolas**, prologam-se formando vasos ainda mais finos, denominados **capilares sanguíneos** [6,7].

A parede dos capilares sanguíneos possui uma única camada de células, são vasos muito finos com diâmetro microscópico, que estabelecem comunicação entre uma arteríola e uma **vénula**, isto é, uma veia de pequeno diâmetro. Em média, os capilares têm 1 mm de comprimento e 8 μm de diâmetro, um pouco maiores que os glóbulos vermelhos. Apesar da pequena diferença, os GV's deformam-se, passando com facilidade nos capilares. Embora os capilares sejam muito estreitos, existem tantos que a sua área transversal de escoamento é superior à de qualquer outro vaso. Consequentemente, a velocidade do sangue diminui ao passar nestes vasos, permitindo mais tempo de troca de materiais com o fluido extracelular [6,7]. Na Figura 1 está representado um capilar sanguíneo que contém um GV no seu interior.

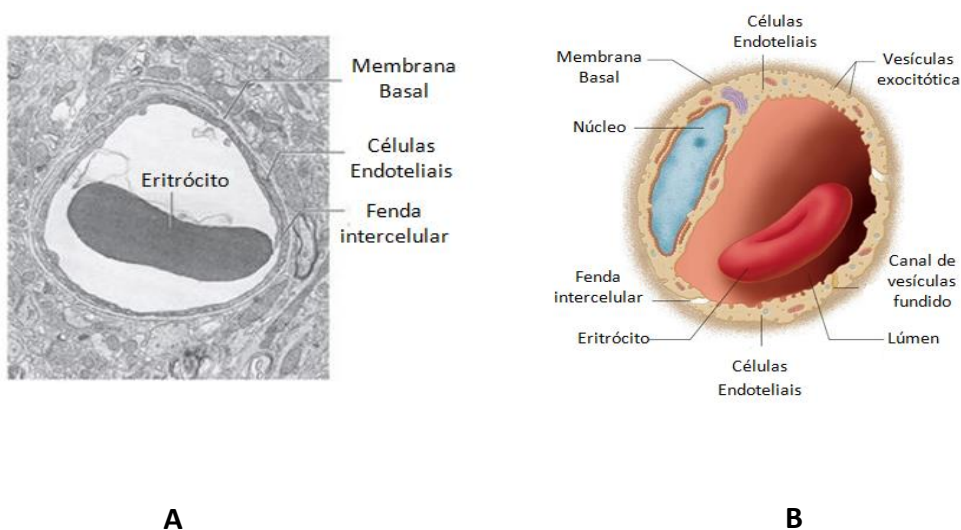


Figura 1 - A - Diagrama de uma secção transversal capilar. **B** - Micrografia eletrónica de um capilar contendo um único eritrócito. A longa dimensão da célula sanguínea é de aproximadamente 7 μm , adaptado de [9].

As **veias** são os vasos que levam o sangue dos órgãos e tecidos para o coração, promovendo o retorno da circulação sanguínea. As suas paredes são constituídas por três camadas, menos espessas que as suas correspondentes arteriais, uma vez que o sangue perde grande parte da pressão ao passar nos capilares [6,7].

A pressão venosa é tão baixa que, sozinha, não é suficiente para fazer com que o sangue retorne dos pés e pernas para o coração. Portanto, existem mecanismos que ajudam, como, por exemplo, os músculos esqueléticos em torno das veias, que se contraem. Além disso, as veias de maior diâmetro apresentam válvulas no seu interior, cuja função é impedir o refluxo do sangue, garantindo a sua circulação num único sentido. Na Figura 2 estão representados os vasos sanguíneos com as suas respetivas ligações, bem como a estrutura de cada um [6,7].

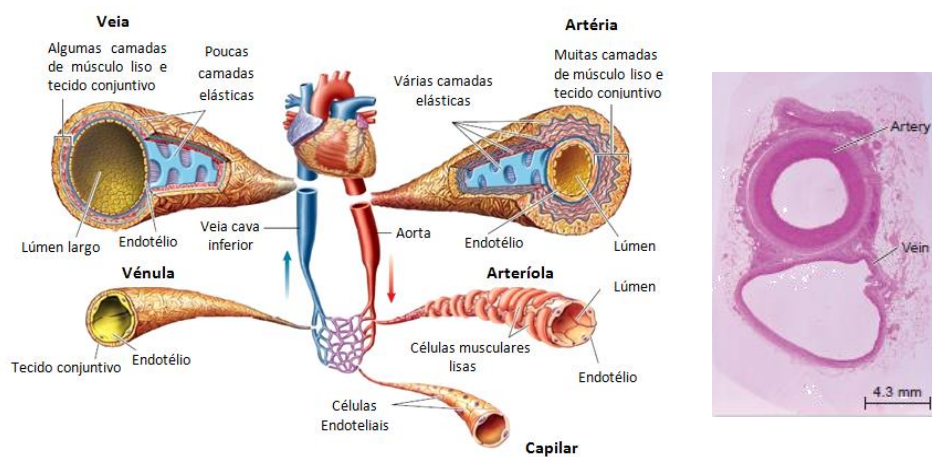


Figura 2 - Características comparativas dos vasos sanguíneos adaptado de [9].

De salientar que as dimensões da Figura 2 não estão em escala. Na imagem do lado direito encontra-se uma micrografia (ampliada quatro vezes) de uma artéria de tamanho médio perto de uma veia. Note-se a diferença entre os dois vasos na espessura da parede e no diâmetro do lúmen.

2.1.2. O sangue

O sangue é a porção líquida do meio interno que circula rapidamente dentro de um sistema fechado de vasos denominado sistema circulatório. O sangue possibilita assim o transporte de O₂, hormonas e substratos, necessários para o metabolismo, para as células do corpo, enquanto remove o CO₂ e produtos residuais. O sangue é composto por duas partes: o plasma e os elementos celulares. O plasma constitui cerca de 55% do volume do sangue e é composto de água (90%), na qual estão imersos sais minerais, proteínas, gorduras, fatores de coagulação, hormonas e outras substâncias. O plasma contém também o fibrinogénio, uma proteína importante no processo de coagulação do sangue. A outra parte é formada de elementos celulares, que são os glóbulos vermelhos, os glóbulos brancos e as plaquetas sanguíneas [10].

2.1.2.1. Composição do sangue

O tipo de célula com maior relevância em termos reológicos é o eritrócito ou **glóbulo vermelho**, GV, constituindo 98% da componente celular [10]. Os eritrócitos são as células responsáveis pelo transporte de oxigénio proveniente dos pulmões (sangue arterial) e do dióxido de carbono proveniente da atividade celular (sangue venoso). A forma dos eritrócitos assemelha-se a um disco bicôncavo e, em geral, tem entre 6 e 9 µm de diâmetro e entre 2 e 3 µm de espessura, nos mamíferos. A sua estrutura bastante flexível permite que seja capaz de sofrer grandes deformações sem entrar em rotura, permitindo-lhe esta característica ajustar a forma consoante as solicitações que lhe são impostas, e conseguir passar num capilar com dimensões inferiores às suas [10,11].

Hematócrito

O sangue colhido por punção venosa, tratado por anticoagulante - expansores do volume plasmático (*Dextrano 40*, heparina por exemplo) - e em seguida centrifugado, separa-se em várias camadas que refletem a sua heterogeneidade [11]. A camada de plasma corresponde ao sobrenadante translúcido e amarelado. Os glóbulos sedimentam em duas camadas facilmente distinguíveis. A camada mais inferior tem cor vermelha e é formada pelos glóbulos vermelhos (GV's). A camada imediatamente acima tem cor acinzentada e contém os leucócitos e também plaquetas e a camada superior é

constituída pelo plasma. O hematócrito, Htc, representa o volume de sangue ocupado pelos GV's em relação ao sangue total. Os valores normais para o hematócrito humano situam-se entre os 40 e os 50 %, variando de indivíduo para indivíduo [12]. Na Figura 3, estão representadas as várias camadas obtidas após centrifugação do sangue.

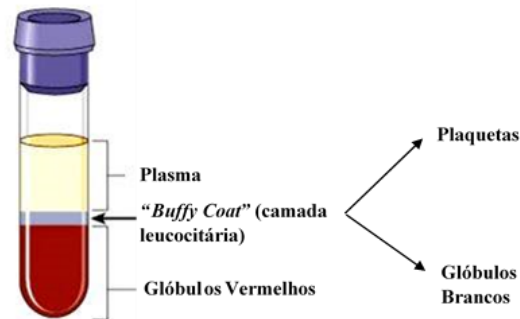


Figura 3 - Representação dos constituintes do sangue, obtidos após centrifugação, adaptado de [13].

Existem vários tipos de **leucócitos** ou **glóbulos brancos**, com diferentes funções no sistema circulatório, tendo um papel crucial nos mecanismos do sistema imunitário. Têm dimensões superiores às dos eritrócitos, mas a sua concentração no sangue é muito inferior, o que faz com que estas células não tenham influência particularmente relevante em escoamentos nos maiores vasos e que tenham alguma influência nos vasos de menor dimensão. Certos leucócitos têm a particularidade de aderirem e transmigrarem os tecidos dos vasos sanguíneos. Caso sejam ativados, para que fiquem aptos para atuar, os leucócitos podem ficar com um comportamento rígido, podendo ocorrer a possibilidade de bloqueio do vaso [11].

A **plaqueta sanguínea** ou **trombócito** é um fragmento de célula presente no sangue que é formado na medula óssea. As plaquetas sanguíneas têm muito pouca importância sob o ponto de vista reológico, dada a sua pequena concentração e dimensão. Estas são responsáveis pelo fenómeno de coagulação, quando há estagnação sanguínea. As plaquetas estão em circulação no sangue durante cerca de 5 dias sendo depois destruídas no baço [10,11]. Na Figura 4 estão representados os constituintes que fazem parte do sangue.

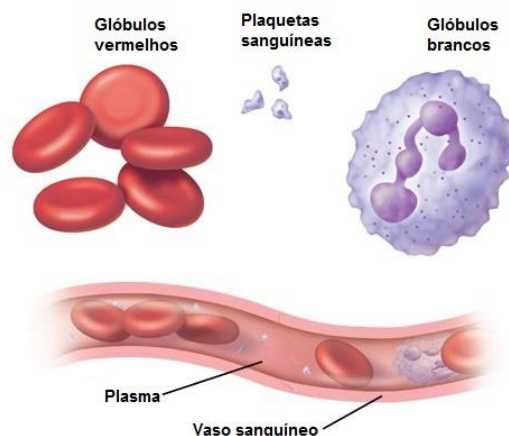


Figura 4 - Constituintes do sangue, adaptado de [14].

2.1.3. Microcirculação

A microcirculação é o segmento da rede vascular que banha os tecidos corporais, constituída pelos vasos mais estreitos da circulação (arteríolas, capilares e vénulas). Por via das anteriores características, a microcirculação contrasta com a macrocirculação, a qual veicula o sangue entre os diversos órgãos através de artérias. A principal função da microcirculação é equilibrar as necessidades celulares em oxigénio com as quantidades transportadas pelos eritrócitos, isto é, fazer o equilíbrio da troca das substâncias e da nutrição dos tecidos e, a remoção dos produtos da excreção celular [15,16].

As graves consequências de doenças tais como a hipertensão, a anemia falciforme e diabetes exclusivamente, ou em grande parte, comprometem a microcirculação. Uma maior perda de sangue, devido a lesão ou outras causas, se não for rapidamente reabastecida, pode levar a danos irreversíveis na microcirculação (choque circulatório) e morte. Distúrbios da microcirculação são grandes contribuintes para a morbidade e mortalidade e constituem uma fração significativa dos custos totais de saúde para a sociedade [17]. A Figura 5 ilustra a estrutura da rede da microcirculação.

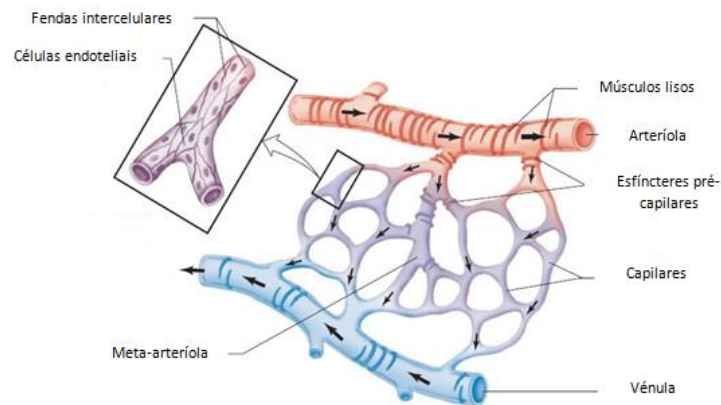


Figura 5 – Diagrama da microcirculação, adaptado de [9].

As pequenas arteríolas controlam o fluxo sanguíneo para cada tecido, e as condições locais nos tecidos, por sua vez, controlam o diâmetro das arteríolas. Assim, cada tecido na maioria dos casos controla o seu próprio fluxo sanguíneo, de acordo com as suas próprias necessidades. As paredes dos capilares são extremamente delgadas, formadas por uma única camada de células endoteliais muito permeáveis. Desse modo, pode ocorrer intercâmbio rápido e fácil de água, nutrientes e excrementos celulares entre os tecidos e o sangue circulante. A circulação periférica em todo o corpo contém aproximadamente 10 bilhões de capilares, com superfície total entre 500 e 700 metros quadrados [16]. Na Figura 6 está ilustrado o esquema do processo de difusão na microcirculação.

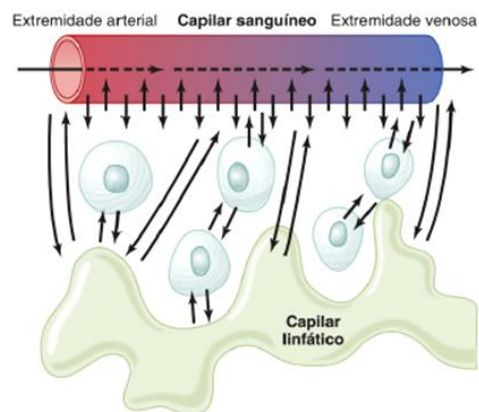


Figura 6 – Difusão de moléculas de líquido e de substâncias dissolvidas entre o capilar e os espaços do líquido intersticial [16].

É de salientar que aproximadamente 80% da queda de pressão entre a aorta e a veia cava é devido ao escoamento na microcirculação [7]. Este comportamento é ilustrado na Figura 7.

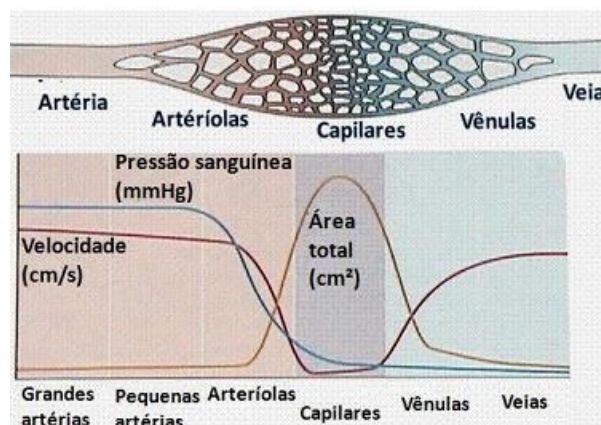


Figura 7 - Pressão sanguínea nos diferentes vasos do sistema circulatório [7].

Na microcirculação existe o mecanismo de sensores nas arteríolas que regulam as taxas de corte entre o sangue e a parede para regular o fluxo sanguíneo, influenciando nas propriedades reológicas do sangue. Estudos *in vitro* com tubos de vidro realizados por Barbee e Cokelet foram pioneiros numa avaliação realista da taxa e da tensão de corte na microcirculação. Usando tubos de 29 μm de diâmetro, esses estudos demonstraram que a tensão de corte pode ser descrita em função da taxa de corte, desde que o hematócrito do tubo fosse corretamente especificado. Assim, a relação entre o hematócrito e a taxa de corte nos microcanais poderia ser especificada por cada tubo, representando arteríolas ou vénulas [7].

2.1.3.1. Formação da Camada de Plasma em Microcanais

A formação da camada de plasma ou camada livre de células, CLC, é uma característica hemodinâmica proeminente na microcirculação [18]. A CLC situa-se entre a coluna de glóbulos vermelhos no microcanal e a sua parede, pois a formação desta camada é atribuída à tendência das células vermelhas do sangue e agregados migrarem através das linhas de corrente de fluxo de sangue, fora da parede do microcanal [19]. Este fenómeno é conhecido como migração axial dos glóbulos vermelhos e deve-se ao

perfil de velocidades parabólico que resulta em elevadas tensões de corte em torno da parede, forçando os GV's a deslocarem-se na direção central do microcanal. Este fenómeno é contrariado por interações célula-célula que tendem a orientar as células em direção à parede do vaso. Assim, a largura da CLC, em geral, diminui com o aumento do hematócrito. Segundo Sangho Kim e seus colaboradores, a CLC depende do diâmetro do vaso, do caudal usado e das propriedades reológicas do sangue, incluindo o hematócrito, a agregação de glóbulos vermelhos e a sua deformabilidade [20]. A CLC reduz o atrito entre os GV's e as células endoteliais, facilitando o seu movimento. Além disso, as células deslocam-se a alta velocidade em relação à velocidade média de fluxo, uma vez que as células estão mais próximas ao eixo do tubo, onde a velocidade é máxima. Consequentemente, a viscosidade relativa diminui [21,22]. A camada de plasma é de extrema importância, uma vez que a sua espessura regula a difusão do oxigénio da coluna de GV's para a parede do vaso sanguíneo e vice-versa. Além disso, é responsável pelo mecanismo de consumo e formação de NO (monóxido de azoto), que é um fator crítico na regulação do metabolismo de oxigénio. A biodisponibilidade do NO é determinada através da camada de plasma, na medida em que é produzido pela membrana endotélica e o seu consumo é efetuado pela hemoglobina presente nos glóbulos vermelhos [23]. Na Figura 8 pode-se visualizar a delimitação da CLC junto às paredes do microcanal.

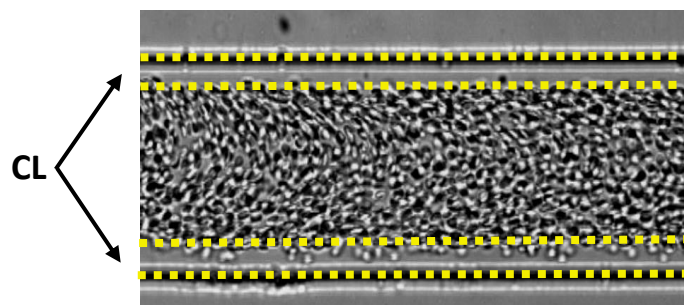


Figura 8 – Visualização da camada de plasma junto às paredes num microcanal utilizada neste trabalho.

2.1.3.2. Efeito de *Fåhrhæus* e de *Fåhrhæus-Lindqvist*

Robin Fahraeus observou nos seus estudos que o fluxo sanguíneo e o seu hematócrito são afetados pela alteração do diâmetro dos microcanais, quando estes são inferiores a 300 μm de diâmetro [24]. Esta variação de hematócrito em canais de

pequenos diâmetros ficou conhecida como efeito de *Fåhræus*. A causa para este efeito é atribuída à migração dos eritrócitos para uma região central do canal, deixando uma camada de plasma na vizinhança das paredes, na qual não existem células. Por sua vez, a camada de plasma é maioritariamente influenciada pela geometria do canal, sendo o caudal um fator de menor relevância na formação da camada de plasma [11].

Aliado ao efeito de *Fåhræus* surge o efeito de *Fåhræus-Lindqvist*. Este efeito relaciona, por sua vez, a viscosidade aparente do sangue com o diâmetro do canal onde o sangue se escoar. Tal como acontece para o hematócrito no efeito de *Fåhræus*, a viscosidade aparente do sangue também diminui com a diminuição do diâmetro do canal, atingindo um mínimo para um determinado valor de diâmetro (aproximadamente o valor do diâmetro de um eritrócito, $\sim 8\mu\text{m}$). Para diâmetros inferiores a esse, a viscosidade volta a aumentar. Como referido anteriormente, a viscosidade do sangue aumenta com o aumento do hematócrito e diminui com a diminuição deste e, portanto, o efeito de *Fåhræus-Lindqvist* pode ser explicado, em parte, pela ocorrência do efeito de *Fåhræus*. Para além da influência do hematócrito na viscosidade aparente do sangue, o facto dos eritrócitos se afastarem das paredes faz com que a camada de plasma funcione como lubrificante, diminuindo assim a resistência oferecida ao escoamento e, conseqüentemente, a viscosidade. A Figura 9 mostra a variação da viscosidade do sangue com o diâmetro do tubo [11].

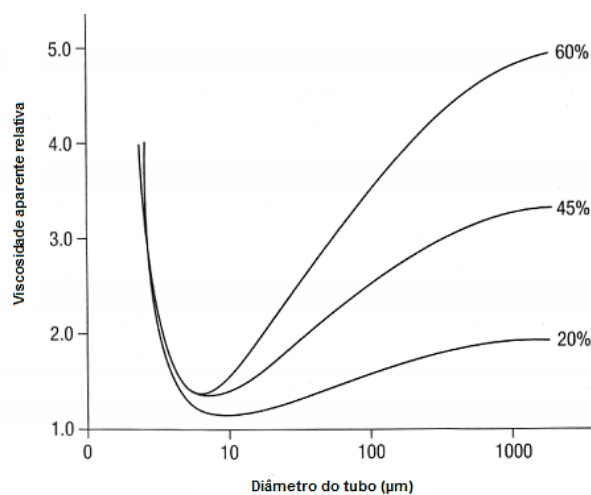


Figura 9 - Variação da viscosidade do sangue com o diâmetro do tubo, que ilustra o efeito *Fahraeus-Lindqvist*, adaptado de [25].

Este efeito ocorre, sobretudo nas arteríolas e nas vénulas com diâmetros inferiores a 1 mm; nos capilares, quando o diâmetro fica inferior a cerca de 10 μm , os glóbulos começam a interagir com as paredes, precisando de se deformar para circularem, e a viscosidade volta a subir [26].

2.1.4. Escoamento Sanguíneo

O escoamento sanguíneo tem uma grande dependência da geometria dos canais onde este se processa. No caso da circulação no interior do corpo humano, o sangue é forçado a escoar-se em vasos com diferentes diâmetros e geometrias [11].

O escoamento sanguíneo, pode assim, obedecer aos princípios físicos de escoamento no interior de condutas, no qual a massa, a energia e a quantidade de movimento são conservadas. O movimento do sangue nos vasos sanguíneos é provocado pelo gradiente de pressão que existe no seu interior. A pressão nos vasos sanguíneos está constantemente a ser alterada no seu interior, de ponto para ponto. Assim sendo, esta variação da pressão irá provocar o movimento do sangue. Porém, as forças tangenciais ao movimento do sangue (forças de corte), assim como as forças provocadas pela turbulência do escoamento opõem-se à circulação sanguínea [27].

Há dois principais tipos de fluxo, o laminar e o turbulento. O primeiro é representado por partículas líquidas que se deslocam em camadas paralelas, entre si e às paredes do tubo em que fluem, de modo constante, suave e independentemente da duração do fluxo (Figura 10-A). Pelo contrário, o fluxo turbulento (Figura 10-B) caracteriza-se por ser caótico, quer na velocidade quer pela deslocação irregular das partículas, existindo assim componentes transversais ao escoamento global do fluido [27, 28].

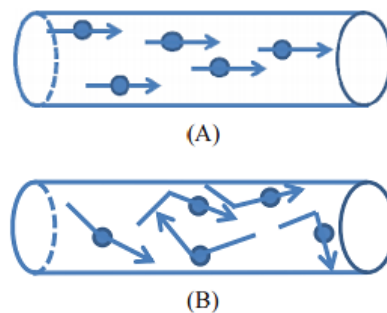


Figura 10 - Representação esquemática do fluxo laminar (A) e do turbulento (B) de partículas líquidas num tubo cilíndrico [28].

Fazendo aumentar a velocidade do fluxo, a partir de determinado ponto (denominado número Reynold, Re , unidade sem dimensão), a corrente deixa de ocorrer em planos paralelos estáveis, começando por evidenciar irregularidades e, depois, difusão multidirecional crescente. O valor de Re num tubo reto e cilíndrico, a partir do qual se dá a transição de regime laminar para turbulento, é aproximadamente igual a 2000. Abaixo deste nível o fluxo é laminar, passando a turbulento quando superior. Porém, o valor de Re pode ser muito inferior (p.ex. entre 10 e 100) quando o fluxo ocorre em tubos com geometria variável e/ou constricções. A partir do ponto de transição, a irregularidade direcional das partículas, efeitos de inércia e a dissipação de energia cinética justificam o aumento da resistência ao fluxo [28]. Na Figura 11 está representada a resistência ao fluxo em função do número de Reynolds.

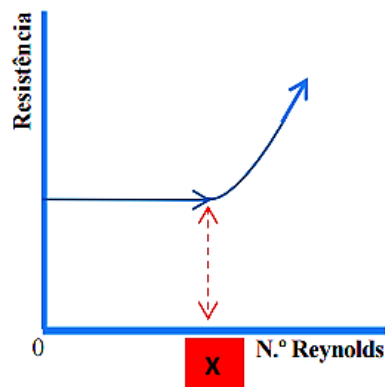


Figura 11 - Relação entre resistência ao fluxo e o número de Reynolds. Quando o fluxo laminar (A) se transforma em turbulento (B), em X (número de Reynolds), a resistência aumenta [28].

O número de Reynolds representa a razão entre as forças de inércia e as forças da viscosidade, permitindo analisar se o escoamento é laminar ou turbulento. Este pode ser calculado tendo em conta as forças inerciais e as forças causadas pela viscosidade. Para condutas de secção circular é calculado por [28]:

$$Re = \frac{\rho VD}{\mu} = \frac{VD}{\nu} \quad (1)$$

onde ρ é a massa volúmica do fluido, V é a velocidade média, D é o diâmetro da conduta, μ é a viscosidade do fluido e ν é a viscosidade cinemática. Para condutas de

secção não circular o diâmetro deve ser substituído pelo diâmetro hidráulico do microcanal. Este valor pode ser obtido a partir da equação [28]:

$$D = \frac{4A}{P} \quad (2)$$

Sendo A a área de escoamento do microcanal e P o perímetro.

2.1.5. Hemorreologia

A hemorreologia é a ciência que estuda a deformação, o escoamento do sangue e os seus componentes. A área inclui o estudo das propriedades mecânicas e reológicas do sangue, experiências com amostras microscópicas e as suas propriedades *in vivo* e *in vitro*. Estuda, ainda, a interação célula-célula e célula-parede [7].

2.1.5.1. Matéria e deformação

Entre os tipos de matéria mais analisados encontram-se os sólidos, líquidos, fluidos e substâncias viscoelásticas. Em qualquer dos casos, quando sujeitos a forças externas, estes materiais tendem a mudar de forma e ou dimensões. Estas alterações resultam de deslocamentos relativos dos respetivos componentes físicos, no que se entende por deformação [29].

Existem algumas diferenças, consoante o tipo de matéria afetada. Se for uma matéria sólida, a deformação tende a ser proporcional à força exercida, recuperando a forma original quando aquela força deixa de atuar; porém, alguns tipos de sólidos com características plásticas, depois de deformados, não recuperam a sua forma inicial. Os líquidos ou os fluidos (entendidos como matérias com características viscosas, no estado líquido ou gasoso), quando sujeitos a uma força incidente, tendem a deformar-se continuamente, do que resulta um movimento, isto é, fluem. Há fluxo da matéria não só quando a deformação aumenta mas também quando diminui (continuamente) [29].

Se o fluxo for proporcional á força aplicada e a viscosidade for constante, independente da taxa de corte na qual é medido, numa dada temperatura, os líquidos

/fluidos são classificados como “*Newtonianos*” ou *lineares* (p.ex., água, óleo, mercúrio); se não houver aquele tipo de proporcionalidade e a relação entre a taxa de deformação e a tensão de corte não for constante (p.ex, nas emulsões e suspensões), são designados *não-Newtonianos* ou *não-lineares*. O exemplo que mais interessa focar entre os líquidos *não Newtonianos* é o do sangue, que apresenta características mais próximas das emulsões [29]. A Figura 12 mostra a variação da tensão de corte (σ) e da viscosidade (η) em relação à taxa de corte ou deformação ($\dot{\gamma}$) para um fluido newtoniano e não-newtoniano, com comportamento semelhante ao sangue.

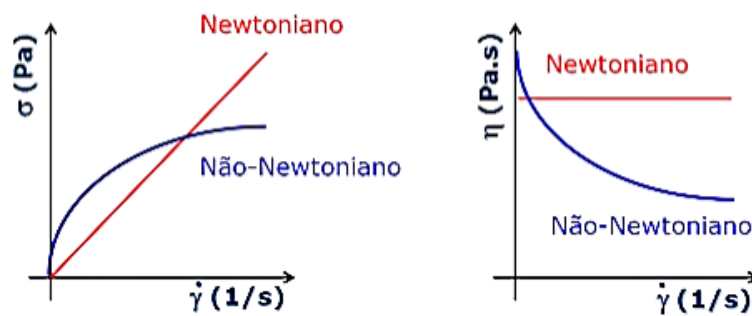


Figura 12 – Variação da tensão de corte e da viscosidade em relação à taxa de corte, para um fluido newtoniano e não-newtoniano [30].

2.1.5.2. Comportamento não-newtoniano do sangue

O sangue é considerado um fluido não-newtoniano, pelo facto da taxa de corte não ser proporcional à tensão de corte e a viscosidade variar com a taxa de deformação (para pressão e temperatura constantes) [11]. Dessa forma, o sangue, ao fluir, apresenta camadas concêntricas que se movem no interior dos vasos a velocidades diferentes, sendo que a camada mais interna apresenta a maior velocidade, enquanto as camadas mais periféricas movem-se com maior lentidão. A formação destas camadas evita que os elementos de uma se misturem aos da outra, o que gera a laminaridade do fluxo [31], ilustrado esquematicamente na Figura 13.

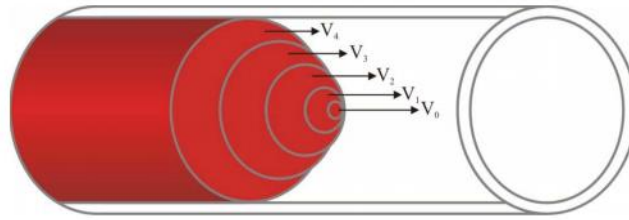


Figura 13 - Esquema de velocidade parabólica do fluxo laminar do sangue [31].

O sangue tem um comportamento reológico muito especial. Este fluido pode ser modelado de duas formas distintas. Dependendo das condições do escoamento, pode ser modelado como uma suspensão, onde as células sanguíneas são consideradas sólidos numa matriz de plasma, ou pode ser modelado ainda como uma espécie de emulsão, baseada no comportamento de gotas funcionando como protótipos de glóbulos vermelhos sob altas tensões de corte [7].

Viscosidade do Sangue

Quando se fala em viscosidade sanguínea, refere-se à adesividade do sangue. Ela é um importante determinante da resistência ao fluxo sanguíneo, bem como da perfusão tecidual [31].

A viscosidade do sangue é determinada pelos seguintes fatores: hematócrito, viscosidade do plasma, temperatura e pelas propriedades reológicas dos GV's.

O comportamento pseudoplástico ou reofluidificante do sangue surge devido à presença de suspensões celulares e às suas interações com o plasma e entre si. Dadas as dimensões e concentração dos eritrócitos, estas são as células que mais contribuem para esse comportamento. Assim sendo, qualquer variação na estrutura ou concentração dos eritrócitos, ou na forma como os eritrócitos interagem com o meio de suspensão provocam uma variação na viscosidade do sangue. O decréscimo da viscosidade do sangue com o aumento da taxa de deformação pode ser explicado por três fenômenos que ocorrem nos eritrócitos: a capacidade de formar agregados, a elevada deformabilidade e a capacidade de se orientarem e alinharem consoante os requisitos do escoamento [11]. Para taxas muito baixas de deformação estas células tendem a formar agregados, normalmente designados por *rouleaux* (Figura 14 - A) que são estruturas

semelhantes a “moedas empilhadas”, podendo criar estruturas tridimensionais de dimensões globais (muito superiores às de um eritrócito isolado) geradoras de uma resistência superior ao escoamento. Esta é a causa da viscosidade ser superior para baixas taxas de deformação [11].

Apesar do sangue ser um fluido pseudoplástico, o plasma é um fluido newtoniano com valores de viscosidade (para plasma de sangue humano saudável) entre 1,6 e 1,8 mPa.s a uma temperatura de 20°C. Embora a viscosidade do plasma não varie com a taxa de deformação, alterações nas concentrações dos elementos constituintes do plasma afetam a viscosidade do sangue [11].

A formação de *rouleaux* depende também da concentração dos elementos presentes no plasma. Maiores concentrações de fibrinogénio e globulinas (proteínas presentes no plasma) estimulam a formação de *rouleaux*. A ausência destas proteínas endurece os eritrócitos incapacitando-os de formar agregados. Contudo, a formação de *rouleaux* não é um fenómeno permanente, desagregando-se reversivelmente para maiores valores da taxa de deformação, até ao limite do eritrócito. Ao diminuir as dimensões das estruturas presentes no sangue, a resistência que estas oferecem ao escoamento passa a ser menor e, conseqüentemente, a viscosidade do sangue. Porém, na circulação do sangue no interior do corpo humano as taxas de deformação verificadas são demasiado elevadas para a permitirem a formação de *rouleaux* de grandes dimensões [11]. Na Figura 14 pode-se visualizar o *rouleaux* e um gráfico alusivo à viscosidade do sangue em função da taxa de corte.

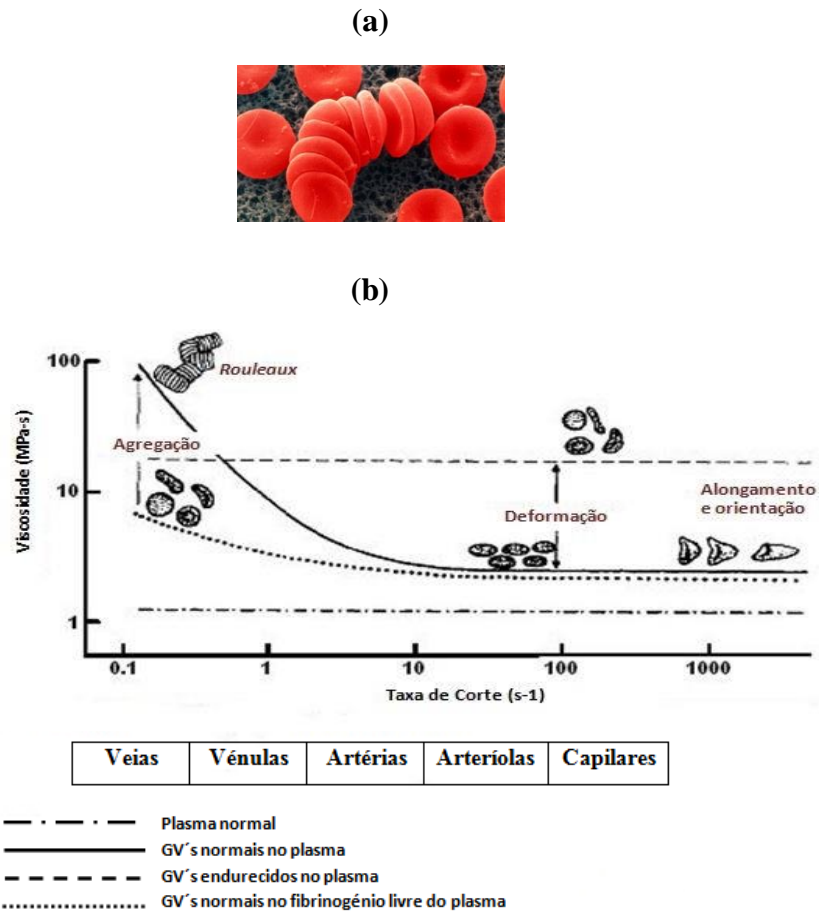


Figura 14 – (a) – Aglomerados de GV's, *rouleaux*; (b) – Viscosidade do sangue em função da taxa de corte, adaptado de [32, 33].

A viscosidade do sangue varia de forma exponencial com o hematócrito (ver Figura 15). Para taxas de deformação mais elevadas, a variação da viscosidade com o hematócrito do sangue não é tão acentuada. Para baixas taxas de deformação, verifica-se uma maior variação da viscosidade com o hematócrito. Este facto advém não só da resistência que uma maior quantidade de eritrócitos introduz no escoamento, mas também do facto de para baixas taxas de deformação os eritrócitos terem tendência a agregar e quanto maior for o número de eritrócitos, maiores são os aglomerados e maior é a viscosidade. À medida que a taxa de deformação aumenta, a variação da viscosidade com o hematócrito do sangue passa a ser cada vez menos acentuada, uma vez que para maiores valores de taxa de deformação, a tendência dos eritrócitos para se agregarem é menor, pelo que os eritrócitos permanecem isolados. Nesta situação a viscosidade aumenta apenas devido ao facto de existirem mais eritrócitos a criar resistência ao

escoamento. A Figura 15 mostra a relação entre o hematócrito e a viscosidade do sangue [11].

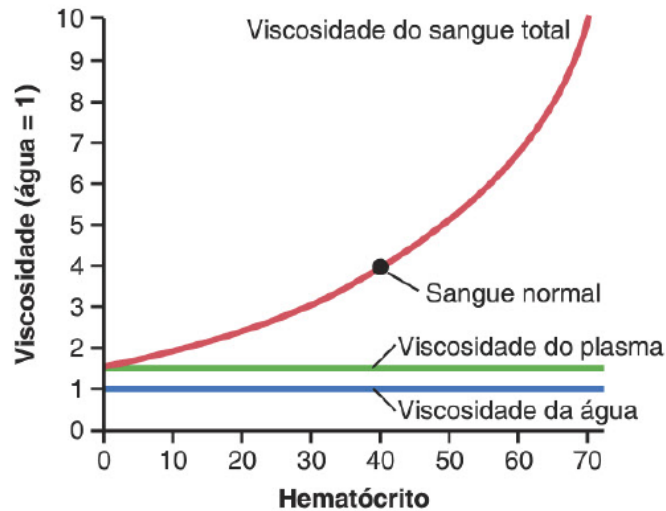


Figura 15 - Efeito do hematócrito sobre a viscosidade sanguínea. (Viscosidade da água=1) [11].

A temperatura tem um efeito muito forte sobre a viscosidade de qualquer fluido, incluindo o sangue total e o plasma. Na maior parte dos fluidos a viscosidade do sangue aumenta quando a temperatura baixa. No sangue total, a viscosidade é particularmente aumentada a baixas temperaturas, sendo que a reduzida deformabilidade dos GV's aumenta a viscosidade do plasma. Normalmente mede-se a viscosidade do sangue à temperatura do corpo, 37°C [34].

2.1.6. Patologia Vascular

2.1.6.1. Estenose

A estenose é referida neste estudo porque é objetivo do trabalho experimental avaliar a sua influência no escoamento do sangue.

As patologias no sistema circulatório são responsáveis pelas lesões nas paredes dos vasos sanguíneos, causando a sua obstrução, dilatação ou rutura [35].

É relatado que as doenças cardiovasculares são consideradas como uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos e uma das mais graves doenças é a aterosclerose. Esta é uma doença crônica em que o espessamento, endurecimento, e a perda de elasticidade das paredes do vaso ocorre, levando à diminuição da circulação sanguínea, devido à presença de uma constrição num segmento de um vaso. O espessamento e endurecimento das artérias são devidos à acumulação de depósitos de cálcio e gordura no lúmen da artéria. Desenvolve-se com o envelhecimento, a hipertensão, diabetes, hiperlipidemia, e outras condições de doenças. No caso das artérias, a estenose, estreitamento local de um vaso sanguíneo, comumente ocorre nas grandes artérias de distribuição, tais como as coronárias, renais, cerebrais e femorais. Quando a artéria coronária é afetada por uma estenose, ocorrem condições de escoamento crítico, tais como separação do fluxo, elevada resistência ao escoamento, alta tensão de corte e compressão da parede. As placas de gordura também podem rebentar, causando um coágulo de sangue, que pode viajar para outra parte do corpo e parcialmente ou totalmente bloquear o fluxo de sangue, podendo provocar um acidente vascular cerebral (AVC) ou um ataque cardíaco [36].

Na Figura 16 está representado um esquema ilustrativo da aterosclerose, bem como a formação de um trombo de sangue que pode obstruir o fluxo sanguíneo.

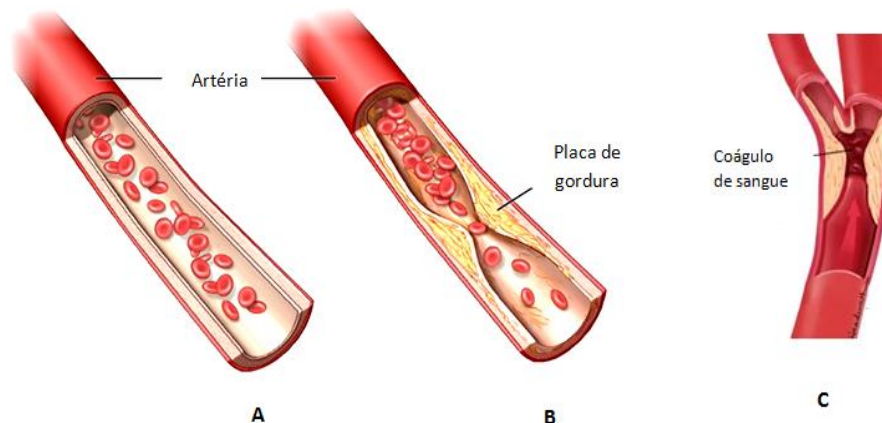


Figura 16 - Aterosclerose. **A** – Artéria normal; **B** – Artéria com placa de gordura; **C** – Formação do coágulo de sangue, adaptado de [37, 38].

Uma estenose crítica é pensada tipicamente em termos de uma redução de 60-75% no diâmetro da artéria grande de distribuição. Quando a redução de um diâmetro do vaso atinge este nível, são conduzidas as medidas de intervenção, como angioplastia de

balão, a colocação do *stent* ou cirurgia de *bypass* arterial [36]. A Figura 17 mostra um exemplo de vários tipos de estenose no desvio axillobifemoral.

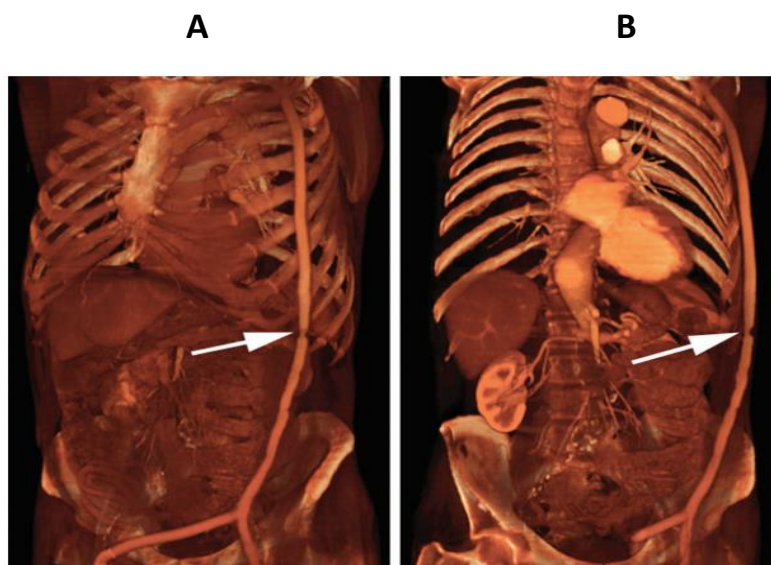


Figura 17 - Imagens laterais do desvio axillobifemoral que mostram várias estenoses leves e uma estenose grave (seta). Note-se a ausência de realce na aorta infrarrenal em B, resultado de uma trombose [39].

2.1.7. Revisão da literatura sobre estudos em microdispositivos com estenose

Foi há muito reconhecido que a compreensão das propriedades reológicas do sangue é essencial para uma compreensão completa da função do sistema circulatório. Dada a dificuldade de obtenção de medidas cuidadosamente controladas nos estudos *in vivo*, a maioria dos conceitos atuais do comportamento do fluxo de sangue *in vivo* são baseados nas suas propriedades *in vitro*. Vários estudos mostram a importância do estudo da reologia do sangue na microcirculação. Isto porque diversas doenças podem alterar as propriedades reológicas do sangue, como, por exemplo, a viscosidade do plasma e as propriedades mecânicas dos eritrócitos como deformabilidade, formato, viscosidade da membrana. Desta forma, estudos do comportamento do fluxo *in vitro* do sangue na região da estenose são essenciais não só como uma tentativa de compreender este fenómeno, mas também para desenvolver dispositivos microfluídicos, como uma metodologia clínica alternativa para o diagnóstico precoce, o prognóstico e prevenção

de muitas doenças, incluindo enfarte do miocárdio, AVC, anemia falciforme, tromboembolismo, traumatismo, inflamação e doenças malignas [40, 41, 42].

Myungjin Kang e colaboradores investigaram o comportamento hemodinâmico e o movimento dos GV's relacionados com doenças do aparelho circulatório. Foi feita uma experiência *in-vitro* utilizando um sistema de visualização de alta velocidade, usando um microscópio invertido, objetivas de imersão em óleo e lâmpadas de halogéneo. Para simular o vaso sanguíneo com estenose foi fabricado um microcanal em PDMS com uma garganta sinusoidal de 80% de estreitamento e os hematócitos usados foram de 5 e 40 %. Recorreu-se a uma bomba de seringa para impulsionar o sangue para o canal microestenosado. Em difusão, os glóbulos vermelhos mostraram deformação, torção, movimentos de rolamento e movimento de queda devido ao estreitamento do fluxo na região da micro-estenose. No escoamento sanguíneo com 40 % de Htc, os GV's exibiram um comportamento de adesão na área da estenose, semelhante ao fenómeno de adesão trombótica, fenómeno que pode ser considerado como um fator da patogénese de doenças do aparelho circulatório. Depois de passar a microestenose, a espessura da camada de plasma junto da parede do microcanal aumentou em relação à região a montante, alterando a velocidade do fluxo de sangue e a formação de recirculação. A interação entre o fluxo sanguíneo reverso e as células endoteliais também é considerado um fator de risco. As trajetórias das hemácias e a deformação de células sanguíneas jovens na microestenose foram rastreadas usando o método de fluxo ótico, pois distúrbios circulatórios podem ser considerados a partir de perfis de velocidade. O crescimento da estenose como um importante fator de risco para doenças do aparelho circulatório foi claramente observada neste estudo [43].

Lima e colaboradores investigaram as trajetórias e o índice de deformação (DI) de GV's artificiais ao longo de um microcanal de PDMS com uma estenose de 75 %, utilizando um sistema de microscopia de alta velocidade com caudais diferentes (1, 10, 20 $\mu\text{l} / \text{min}$). O fluido de trabalho usado foi uma solução de Dextrano 40, contendo uma mistura de 0,5% de poliestireno (PS) de microesferas de látex (10 μm), que simulavam as hemácias rígidas anormais (arRBC) misturadas com 1% de hematócrito de GV's ovinos saudáveis ($\pm 5 \mu\text{m}$). Como resultado, encontrou-se uma DI máxima do arRBC no início da estenose para o maior caudal usado (20 $\mu\text{l} / \text{min}$). Os resultados para os GV's saudáveis foram semelhantes, mas com um DI quatro vezes maior [42].

Noutro trabalho, Lima e colaboradores referem que através de um sistema confocal micro-PTV, foi possível capturar o comportamento dinâmico de fluxo de glóbulos vermelhos. As medições foram realizadas em várias profundidades através de capilares de vidro de 100 μm . Os resultados fornecem evidências de GV's em suspensões diluídas (3% hematócrito) tenderam a seguir trajetórias aproximadamente lineares, ao passo que os GV's em suspensões concentradas (20% hematócrito) exibiram deslocamentos transversais de cerca de 2% em relação ao caminho original. Os ensaios experimentais indicaram que a camada de plasma pareceu aumentar as flutuações nas trajetórias dos GV's devido à diminuição da obstrução em movimentos transversais provocados por outros GV'S [45].

Estudos feitos por Lima e colaboradores observaram que as trajetórias dos GV's são assimétricas antes e após a estenose e o deslocamento em y (largura do microcanal) é maior em 10% de Htc do que no fluxo sanguíneo com Htc de 20%. Este comportamento é porque quando o Hct aumenta, o canal fica com uma grande concentração de glóbulos vermelhos e estes não podem mover-se livremente. Quando os GV's podem mover-se livremente, eles fluem assimetricamente antes e após a estenose, porque são alongados pelo aumento da velocidade e tensões de corte geradas na da região de estenose [44].

Lima e colaboradores utilizaram um sistema micro confocal-PIV para visualizar o plano médio do fluxo sanguíneo, quando a concentração de GV's (Htc) era superior a 10%. O sistema inclui um microscópio invertido, uma câmera de varredura confocal, um laser de alta velocidade e uma bomba de seringa. Foi usado um microcanal de PDMS com seção transversal retangular de 100 μm com 80 μm de altura. A estenose do microcanal media 50 μm de largura. Foram utilizados três tipos de fluidos de trabalho para medir o campo de fluxo: (a) água pura com 0,1% de partículas fluorescentes, (b) RBC's com Dextrano 40 e 0,1% de partículas fluorescentes. O sangue foi retirado de um individuo de sexo masculino de 23 anos de idade e o número de Reynolds baseado na largura do canal foi de cerca de 0,05 ao longo do estudo. Em suma, do resultado da amostra (a) e (b), não houve grande diferença no fluxo de tempo médio entre a água pura e 10% de RBC's. Contudo, as trajetórias individuais dos GV's não eram simétricas antes e depois da estenose. Portanto, consideraram o movimento instável dos glóbulos vermelhos e trataram o sangue como uma suspensão de GV's diluído com plasma [45, 46].

Existem vários estudos numéricos neste campo, como simulações computacionais e modelações matemáticas que estão de acordo com as conclusões obtidas em termos experimentais.

2.2. Tecnologia Laser de Corte

Desde o início da década de 70, com o desenvolvimento dos lasers de potência, a utilização destes no corte não tem parado de crescer. O corte por laser tornou-se o processo de corte preferencial para muitas empresas, com base nas altas velocidades de corte e na exatidão do processo. Os equipamentos destinados a este fim permitem obter peças de geometria complexa, acabamento de superfícies praticamente livre de rebarbas na região de corte e rapidez na execução de peças [47].

2.2.1. Introdução Histórica

Os primeiros trabalhos de investigação que conduziram à invenção do feixe laser foram realizados por Albert Einstein em 1917. Tratava-se então do estudo dos fenómenos físicos de emissão espontânea e estimulada subjacente ao princípio do funcionamento do laser. Os trabalhos de Bohr e Planck permitiram formular a teoria da mecânica quântica, componente essencial a compreensão do modo de funcionamento do laser. O primeiro laser foi construído em Julho de 1960, por Theodore Maiman, que trabalhava nos laboratórios de investigação de Hughes. Tratava-se de um laser de estado sólido de rubi, excitado por uma lâmpada fluorescente de vapor de mercúrio e filamento helicoidal [47], como é possível observar na Figura 18.

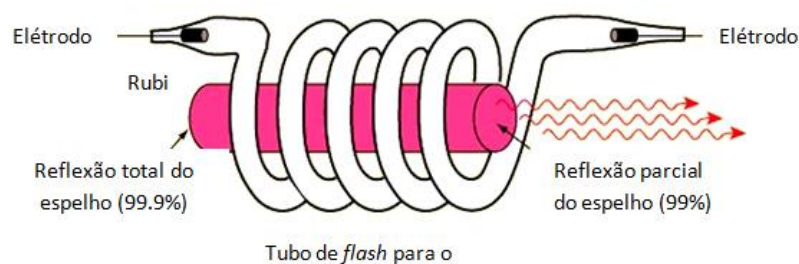


Figura 18 - Esquema ilustrativo de um laser de rubi [48].

Poucos meses depois, em Dezembro de 1960, surgiu o primeiro laser de estado gasoso. Tratava-se de um laser He-Ne desenvolvido por Javan, Bennett e Harriot. Só alguns anos mais tarde aparecia o laser de CO₂ desenvolvido por Patel. A era do laser tinha chegado e desde então, os equipamentos e a tecnologia não têm parado de se desenvolver. As primeiras aplicações industriais dos lasers surgem no início da década de 70 com os lasers de gás. Atualmente existem inúmeros tipos de fontes de lasers: lasers de estado sólido, gasoso e líquido, cada qual com as suas características que justificam a sua aplicação para um determinado fim [48].

2.2.2. Introdução ao Processo de Microfabricação a Laser

O laser é um acrónimo em inglês para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* ou amplificação de luz por emissão de radiação e, é hoje em dia sinónimo de máxima eficiência e máxima qualidade de processamento de materiais. É um dispositivo que emite radiação luminosa através do bombeamento efetuado por uma fonte de energia apropriada a um meio ativo. Este meio é escolhido de modo a ocorrer uma emissão estimulada. O uso do laser pode ser entendido mais facilmente se imaginarmos o que acontece quando se focam raios de sol através de uma lente, para produzir uma fonte concentrada de energia, na forma de calor, sobre uma folha de papel [48] como é possível observar na Figura 19.



Figura 19 – A luz solar focada através de uma lupa converge e pode queimar papel [49].

O tratamento a laser é amplamente utilizado para aplicações de engenharia industrial e de precisão. Com os recentes avanços em sistemas de laser e o aumento da concorrência no mercado, os sistemas de laser tornaram-se muito acessíveis e muitas vezes apresentados como um método mais barato, mais rápido e mais reproduzível para

a fabricação de canais microfluídicos em vidro e em materiais poliméricos. A rapidez com a qual um sistema de laser pode escrever diretamente microcanais é uma importante vantagem desta técnica em relação aos outros métodos, tais como a litografia, a escrita de feixe de elétrons e a foto-padronização [50].

A microfabricação a laser não requer acesso a salas limpas ou preparação de máscaras como para as técnicas de fotolitografia, ou moldes como molde de injeção ou estampagem a quente, reduzindo assim o tempo para implementar o projeto microfluídico, tornando-se desta forma, um bom método para prototipagem rápida de dispositivos microfluídicos em particular. O laser também oferece a possibilidade de criar microestruturas 3D completas num processo de uma etapa, evitando assim os passos de pós-processamento complexos no processo de fabricação, tais como colagem ou integração de funções eletrônicas [50].

Habitualmente, os sistemas de laser existentes cobrem um amplo espectro de comprimentos de onda UV (157 nm) ao infravermelho (10 mm) e com durações de pulso de microssegundos a femtossegundos. Quando o feixe de laser focado atinge o material com uma densidade de energia suficientemente elevada, o material é rapidamente conduzido da temperatura ambiente até à temperatura de fusão (isto é, de sólido para líquido), e, em seguida, até à temperatura de vaporização (isto é, de líquido para vapor) [50].

Os equipamentos de laser são emissores de ondas eletromagnéticas semelhantes a qualquer outra fonte de radiação eletromagnética. Contudo, a radiação eletromagnética do laser é altamente colimada, isto é, existe pouca divergência entre os raios de luz produzidos pelo laser, sendo eles praticamente paralelos. Isso faz com que essa luz consiga propagar-se em grandes distâncias sem perder potência; coerente, onde as ondas eletromagnéticas produzidas pelo laser estão todas em fase e energética. A radiação a laser percorre grandes distâncias sem perda significativa de energia e pode ser facilmente focada em pequenas áreas de dimensões micrométricas ou menores [51].

2.2.3. Tipos de laser

Existem actualmente inúmeros tipos de fonte laser. Os lasers classificam-se quanto ao meio ativo, em três grandes grupos: lasers de gás, lasers de estado líquido e lasers de estado sólido [52].

A variedade de comprimentos de onda, potências e qualidade do feixe é enorme, tornando o campo de aplicação dos lasers muito vasto. No entanto, no processamento de materiais, os tipos de fontes laser aplicáveis é restrito aos lasers de alta potência. As fontes laser de elevada potência têm sido alvo de progressos notáveis a vários níveis.

Existem, actualmente, algumas tecnologias concorrentes para as fontes de grande potência, apresentados a seguir [52].

2.2.3.1. Laser de excímeros

Estes lasers surgiram na década de 80. O termo “excímero” provém do inglês “*excited dimer*”, isto é, dímeros excitados, que são moléculas diatómicas que só existem no estado excitado. Usa gases reativos, como o cloro (Cl_2) ou o flúor (F), misturados com gases inertes como àrgon (Ar), cripton (Kr), ou xénon (Xe). Quando estimulados eletricamente, uma pseudo molécula (dímero) é produzida. Os lasers de excímeros geram radiação laser ultravioleta, com comprimento de onda compreendido entre 0,193 μm e 0,351 μm conforme o meio activo, e caracterizam-se por serem capazes de produzirem pulsos muito curtos e de elevada potência [52].

2.2.3.2. Lasers de estado sólido

Os lasers de estado sólido utilizam um material cristalino em vez de um gás como meio ativo. O mais usado é um cristal de YAG (*Yttrium Aluminium Garnet*) dopado com iões de *Neodymium* (Nd^{3+}) ou *Ytterbium* (Yb^{3+}) que constituem a espécie activa. A combinação do cristal com os iões da espécie activa define a designação do laser: Nd:YAG ou Yb:YAG. Lâmpadas de *flash* são as fontes de potência. O laser Nd:YAG emite luz no infravermelho em 1064 μm e o laser Yb:YAG emite em 1030 μm [52,53].

2.2.3.3. Lasers de fibras

Estes lasers caracterizam-se pelo seu tamanho compacto, alta eficiência e excelentes parâmetros do feixe. Estes geradores são fabricados à base de fibras óticas de dupla camada (“*dualcore*”). Estas fibras são constituídas por sílica, sendo dopadas no seu interior com o objetivo de amplificar o sinal emitido [52].

2.2.3.4. Lasers de díodos (semicondutores)

Os lasers de díodos são conhecidos pela sua aplicação na indústria das comunicações, computadores e eletrônica. Em todas estas indústrias, são empregues geradores com potências na ordem dos mW. Mais recentemente têm sido empregues também no processamento de materiais. O interesse no desenvolvimento deste tipo de geradores é grande pelas seguintes razões: são compactos, têm potencial para serem fabricados em massa, são integrados facilmente, as suas propriedades estão em rápida melhoria, a potência e eficiência têm subido e são largamente empregues como fontes de bombeamento em lasers de estado sólido [52].

2.2.3.5. Laser de CO₂

O laser CO₂ é o tipo de laser mais comum e adequado para o processamento de materiais, sobretudo nas aplicações que exijam elevada densidade de potência, isto é feixes com elevada qualidade. Este tipo de laser utiliza como meio ativo uma mistura de dióxido de carbono (CO₂), hélio (He) e azoto (N₂) em concentrações de aproximadamente 6, 10 e 84% respetivamente. O CO₂ é empregado na emissão da radiação, o N₂ auxilia a excitação das moléculas (gás de assistência) e o He na dissipação do calor gerado pelo campo elétrico. Estes gases combinados são capazes de produzir uma potência que chega a 5000 watts por centímetro quadrado. Este tipo do laser foi utilizado no trabalho experimental que aqui se apresenta [54].

2.2.4. Uso do corte a laser na fabricação de microcanais em estudos de escoamentos sanguíneos

Os dispositivos microfluídicos têm tido grande procura ao longo da última década, devido à sua ampla gama de potenciais aplicações na área de análise biomédica e química, como a administração de fármacos, ponto de diagnóstico de cuidados, citometria de fluxo que é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo; reação de polimerização em cadeia, eletroforese e muitas outras aplicações. Tradicionalmente, silício e vidro eram os materiais predominantes empregados no projeto de sistemas microfluídicos.

Isto devido, principalmente, às suas excelentes propriedades físicas, elétricas e óticas. Mas a fabricação de um dispositivo microfluídico nesses materiais necessita de equipamentos convencionais, que são muito caros e aumenta os custos de produção, especialmente em aplicações de utilização única os quais são desejados, a fim de evitar a contaminação. Nos últimos anos, a aplicação de materiais poliméricos para a fabricação de dispositivos microfluídicos está a tornar-se cada vez mais importante e o fabrico por laser é umas das técnicas mais usadas [55].

Estudos efetuados por Ting-Fu Hon e colaboradores descreveram uma nova técnica para traçar microcanais em substratos de PMMA utilizando um feixe de laser de CO₂ de onda contínua e numa condição fora do foco. A relação de aspeto e qualidade da superfície de corte dos microcanais foram examinadas através de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e técnicas de medição de microscopia de força atómica (AFM). A qualidade do processo de fabrico proposto foi demonstrada para criar dois dispositivos microfluídicos de profundidades entre os 100 - 300 µm e uma largura de cerca de 250 µm: um micromisturador de autorrotação e um citómetro, respetivamente. Os resultados de SEM e AFM mostraram que uma rugosidade da superfície de microcanais de menos do que 40 ε pode ser obtida sem a necessidade de um processo de recozimento de pós-processamento através da utilização de uma potência de laser de 2,4 W, uma altura desfocada de K = 40 mm, e uma velocidade de 80 mm/s. No geral, os resultados experimentais confirmaram que a técnica proposta representa uma solução versátil de baixo custo para a prototipagem rápida de dispositivos em PMMA [56].

KantRishi e colaboradores otimizaram o processo de fabrico a laser, no intuito de produzir superfícies maquinadas lisas. O impacto dos parâmetros do processo como a velocidade de varredura, a potência do laser, a resolução de impressão entre outros, são otimizados usando duas funções alvo de precisão dimensional e rugosidade da superfície em microcanais feitos em PMMA. A qualidade e precisão da superfície das amostras de PMMA fabricadas são analisadas utilizando perfilometria 3D e emissão de campo microscópio eletrónico de varredura (FESEM). Verificou-se que a rugosidade mínima da superfície (7,04 µm) é alcançada através da resolução de 1200 DPI, potência (50%) e velocidade de varredura (51%) da escala da máquina.

A molhabilidade (o grau em que pode ser algo molhado) da superfície lisa foi de seguida otimizada sendo medida usando um goniómetro. Esta propriedade foi de cerca 89° com água e 83.5° com glicerol [57].

Huawei Li e colaboradores descreveram um método simples e rápido para o fabrico de dispositivos microfluídicos de gotículas no substrato de poliestireno usando um sistema laser de CO₂. Concluíram com estas experiências que a técnica demorou apenas alguns minutos para fabricar o padrão sobre o substrato de poliestireno e o custo desta técnica é baixo porque elimina as etapas necessárias, tais como a fabricação da máscara, assim como equipamentos e processos de microfabricação correspondentes em métodos convencionais. A profundidade, largura, a razão entre a largura e altura e o aspeto dos microcanais depende da potência do laser e da velocidade de corte e o perfil dos microcanais pode ser facilmente controlado. Apesar de existirem saliências como resultado de um fluxo impulsionado da tensão superficial sobre a aresta de corte dos microcanais, eles não têm qualquer efeito grave no processo de ligação, e os dispositivos microfluídicos de poliestireno apresentaram um bom desempenho para gerar gotículas [58].

Capítulo 3

Escoamento no microcanal com estenose

Inicia-se este capítulo fazendo-se uma referência ao processo de microfabricação por fotolitografia e litografia suave, que foi um método usado no fabrico dos microcanais para visualizar o escoamento sanguíneo em microcanais com estenose. De seguida apresentam-se os materiais e métodos a que se recorreu para efetuar os escoamentos.

3.1. Microfabricação

O advento das novas tecnologias desenvolvidas a partir da segunda metade do século XX permitiu o avanço da miniaturização de sistemas eletrónicos através do desenvolvimento de tecnologias de microfabricação, que fundaram os métodos para aplicar a um espectro mais alargado de áreas científicas [60].

A manipulação precisa e controlada de pequenas quantidades de fluidos torna necessária a produção de montagens químicas e biológicas com dimensões cada vez menores [59]. Para atender a essa necessidade, surge a microfluídica que é a ciência e tecnologia de sistemas que processam ou manipulam pequenas quantidades de fluidos, presente no desenvolvimento de sistemas miniaturizados. Esta tecnologia está a possibilitar uma crescente compreensão dos mecanismos associados ao escoamento de sangue. A aplicação de dispositivos microfluídicos para a investigação biomédica, cultura de células, nas áreas química, biológica e diagnóstico médico tem o potencial para facilitar uma mudança de paradigma na metodologia, oferecendo uma melhor representação do estado fisiológico e patológico de sistemas biológicos complexos, com maior eficiência do que as tradicionais abordagens na macroescala [62, 63]. Na Figura 20 estão ilustradas as várias áreas de aplicação da microfluídica



Figura 20 - Diferentes vertentes onde é aplicada a microfluídica, adaptado de [64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71,72].

A microfabricação é um processo para a produção de dispositivos e estruturas com dimensões em milímetros, micrómetros e, mesmo em escala nanométrica [73]. Para muitas tecnologias, menor é sinónimo de melhor. A redução do tamanho dos dispositivos traz muitas vantagens: mais componentes por unidade de área, menor consumo de energia, menor custo, uma resposta mais rápida e maior desempenho [74]. A microfabricação permite muito mais do que a simples compactação de sistemas já existentes; permite acoplar diferentes etapas de um processo analítico como preparo da amostra, injeção, mistura, separação e detecção ou adicionar funcionalidades como análises em paralelo. Dessas ideias surgiram os termos *lab-on-chip* e *μ -TAS (Micro Total Analysis System)* como uma proposta para a elaboração de microdispositivos que contemplam as etapas de um processo analítico [51].

3.1.1. Fotolitografia

A litografia consiste na transferência de um padrão para um substrato através de um processo de erosão. Quando é levada a cabo com o recurso a um polímero fotossensível, fotorresiste, e a uma fonte de irradiação, passa a denominar-se de fotolitografia [75].

A fotolitografia consiste na transferência do padrão/desenho de uma máscara para um substrato através da exposição de polímeros sensíveis à luz denominados fotorresistes e envolve uma série de passos sequenciais [75].

A radiação seletiva inicia uma série de processos fotoquímicos no fotorresiste, alterando a sua solubilidade e permitindo a sua remoção selectiva no processo de revelação. Podem considerar-se dois tipos de fotorresiste, positivo e negativo, em função das zonas que sofrem alteração com a exposição. No positivo as áreas expostas à radiação sofrem aumento de solubilidade e são removidas na revelação, ficando com o mesmo padrão da máscara. Pelo contrário, no fotorresiste negativo, as zonas expostas tornam-se insolúveis devido a um aumento de polimerização e têm como padrão resultante a imagem complementar à zona opaca da máscara. Na Figura 21 estão representadas as várias etapas do processo de fotolitografia [75].

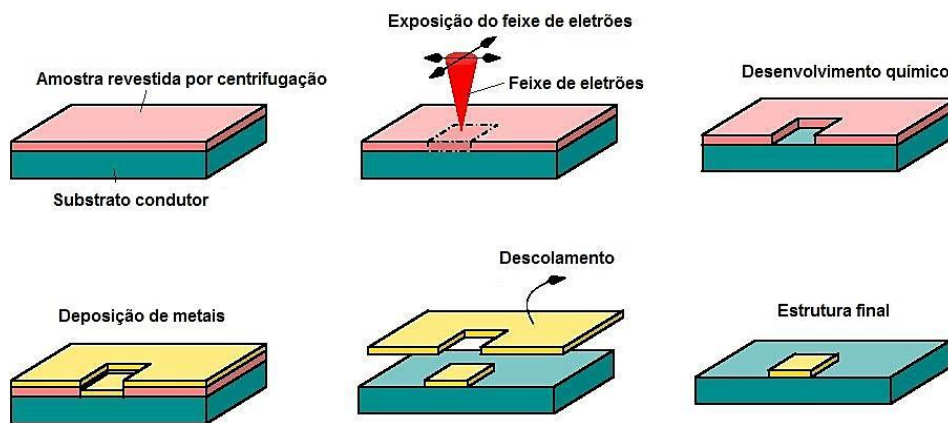


Figura 21 – Etapas do processo de fotolitografia [76].

3.1.2. Litografia Suave

A litografia suave é um processo não fotolitográfico baseado na prototipagem rápida e moldagem de réplicas (*replica molding*) de polímeros, especialmente elastómeros, através de um molde mestre. Este molde poder ser fabricado por inúmeros métodos, incluindo fotolitografia de uma máscara previamente desenhada num programa CAD. Uma vez fabricado o molde, este é coberto com um pré-polímero, que depois de polimerizado gera a réplica negativa do molde. Na Figura 22 está representado um esquema do processo de litografia suave [75].

Os materiais elastoméricos, nomeadamente o PDMS, são os preferidos para esta técnica, uma vez que são facilmente libertados dos moldes rígidos e permitem contacto total com as superfícies, mesmo que não sejam planas, conseguindo replicar com extrema resolução todas as estruturas presentes no molde [75].

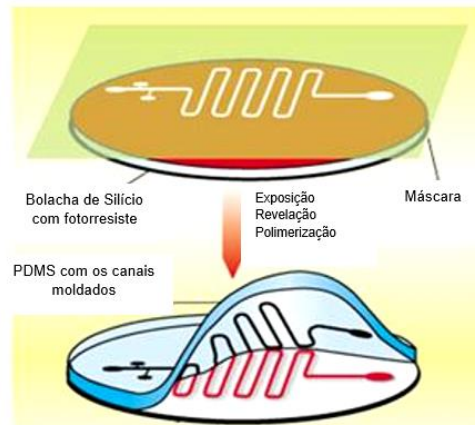


Figura 22 - Processo de litografia suave [75].

3.1.2. Geometria dos canais obtidos por Litografia Suave

Inicialmente, para efetuar os escoamentos sanguíneos foram utilizados microcanais anteriormente fabricados e fornecidos pela Universidade do Minho, através da técnica de litografia suave. A geometria dos canais é retangular e inclui um estreitamento (estenose) de cerca de 75%. A Figura 23 ilustra o canal feito em PDMS e a sua geometria criada em *AutoCad*.

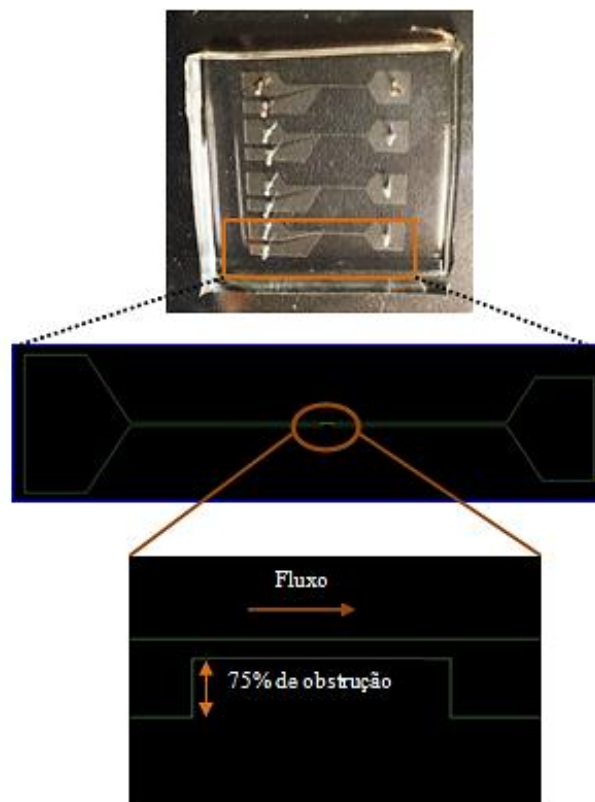


Figura 23 - Geometria dos canais obtidos pela técnica de litografia suave.

3.1.3. Preparação da Amostra

O fluido utilizado neste estudo foi o sangue de ovino, na qual os GV's têm cerca de 4.4 μm de diâmetro. Depois da extração do sangue, uma determinada quantidade deste foi vazado para um tubo de ensaio, acrescentando-se a mesma quantidade de soro fisiológico, isto é, na proporção de 1:1. De seguida agitou-se o tubo de uma forma cuidadosa, para os glóbulos vermelhos não rebentarem, e colocou-se na centrifugadora, no programa 1, a 2500 rotações por minuto durante 10 minutos a 20°C, de forma a separar todos os componentes existentes. De notar que ao colocar o tubo na centrifugadora, é necessário outro tubo com água, com o mesmo volume, para equilibrar o processo, ou seja, tarar. No fundo do tubo de *Falcon* centrifugado ficaram os glóbulos vermelhos, logo de seguida os glóbulos brancos e, por fim, o plasma. Como se pretendia apenas os glóbulos vermelhos, com 1 % de hematócrito, retiraram-se as camadas de soro e plasma com a ajuda de uma pipeta de *Pasteur*. Depois disto, foi novamente a centrifugar, no total de duas lavagens com soro, efetuando-se o mesmo procedimento. Com a amostra pronta, reservou-se no tubo. Do volume total da amostra, 1% corresponde a eritrócitos, ou seja, 50 microlitros. Noutro tubo colocou-se uma pequena quantidade de *Dextrano 40* - que permite diluir a solução - e retirou-se do tubo com o hematócrito, com a ajuda de uma pipeta automática, os 50 microlitros correspondentes aos glóbulos vermelhos. Depois agitou-se o tubo ligeiramente e, por fim, adicionou-se mais *Dextrano 40* até perfazer no total 5 ml de solução. Efetuou-se o mesmo procedimento para os hematócritos de 2.5, 5, 10, 15 e 20 %, respetivamente. Na Figura 24 está esquematizado o processo de obtenção do hematócrito, com cada fase distinta.

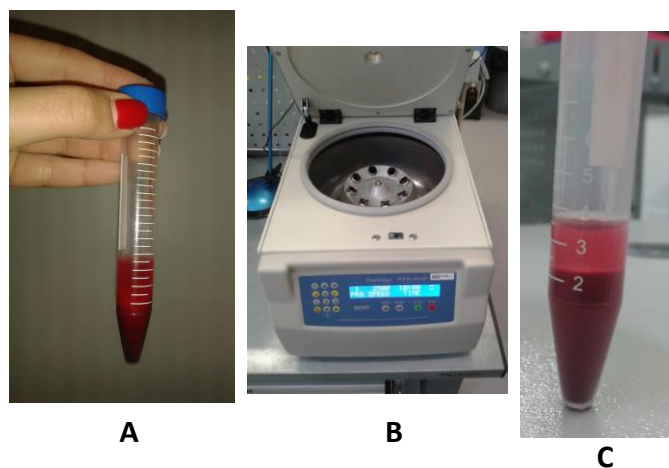


Figura 24 - A – Amostra de sangue; **B** – Centrifugação; **C** – Obtenção do hematócrito.

3.1.4. Visualização dos escoamentos nos microcanais

Para a visualização dos escoamentos foi usado um equipamento que engloba uma seringa de 3 ml *Terumo* onde é introduzido o fluido em causa, que por sua vez, vai estar acoplada a uma bomba de seringa (*Harvard Apparatus PHD ULTRA™*). Esta vai impulsionar o sangue através dos tubos de plástico ligados à entrada e saída do microcanal. O caudal é imposto através do deslocamento do êmbolo da seringa a uma certa velocidade, determinada pelos parâmetros inseridos pelo utilizador: o caudal pretendido e o diâmetro interno da seringa. Nestes testes, usaram-se diferentes hematócritos, referidos anteriormente, e os caudais estipulados foram de 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, respetivamente. Depois do escoamento ser visível ao microscópio, aguardaram-se alguns minutos para que o escoamento estivesse totalmente estabilizado. Efectou-se o mesmo procedimento sempre que se alterou o caudal.

O microcanal era fixado com fita-cola adesiva na plataforma do microscópio ótico invertido (*IX71, Olympus*), permitindo, desta forma, que durante o processo de visualização, as imagens e filmes de escoamento fossem captados com a mesma disposição, sem qualquer tipo de alteração. Combinada com o microscópio encontra-se uma câmara de alta velocidade (*Photron - Fastcam SA3*), não só para se visualizar o comportamento do escoamento, mas também para efetuar a captação de vídeos dos escoamentos ao longo dos microcanais. Na Figura 25 apresenta-se o equipamento utilizado.

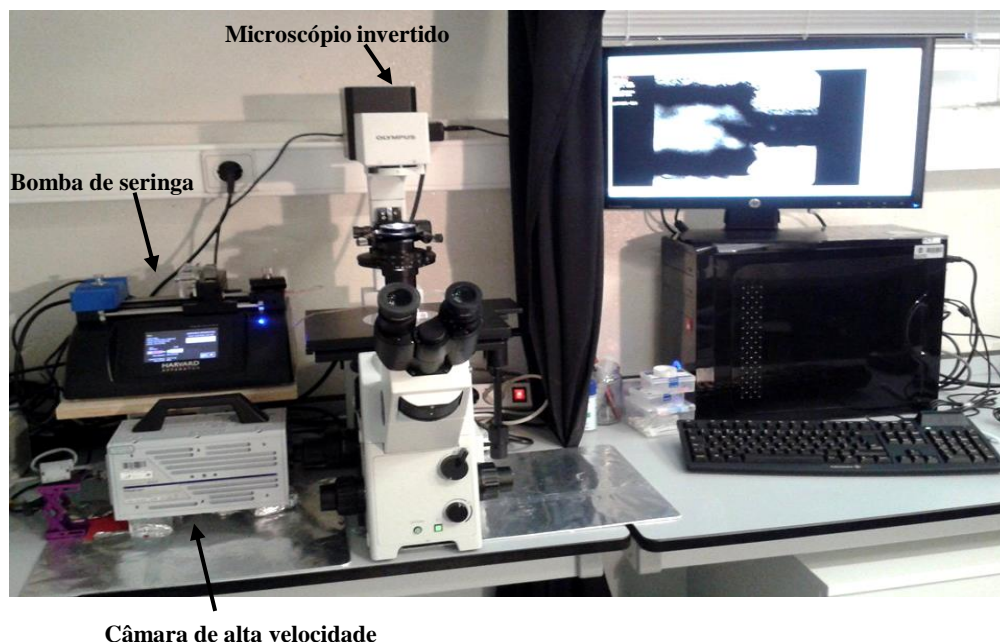


Figura 25 – Sistema de microscopia utilizado neste trabalho.

Posteriormente procedeu-se à captação de filmes do escoamento do sangue depois da estenose, para ser possível medir a espessura da CLC formada nessa região. Para tal, utilizou-se o *Software ImageJ*, que se trata de um *software* livre que pode ser obtido gratuitamente para o processamento e análise de imagens, desenvolvido por Wayne Rasband no *National Institute of Mental Health*, USA, em linguagem Java. Com ele é possível realizar várias tarefas de processamento e análise de imagens. É uma aplicação de uso livre capaz de viabilizar a fácil implementação de algoritmos de processamento de imagens na forma de *plugin*. *Plugins* são programas de computador usados para adicionar funções a outros programas maiores, provendo alguma funcionalidade especial ou muito específica. Neste estudo usou-se o *plugin MtrackJ* que serve para facilitar o rastreamento manual de objetos em movimento numa sequência de imagens, neste caso, os GV's. Realizou-se o *tracking* das paredes dos microcanais (linha vermelha e verde) e posteriormente realizou-se um *tracking* da linha representativa da camada de plasma (azul e amarelo), que correspondia a cerca de 50 *frames* dos vídeos captados. Os valores das coordenadas x e y referentes aos pontos do tracking foram guardados e posteriormente tratados numericamente em Excel. Na Figura 26 está representado o escoamento sanguíneo no microcanal e as trajetórias dos GV's e o limite das paredes do microcanal, que definem a espessura da CLC medida.

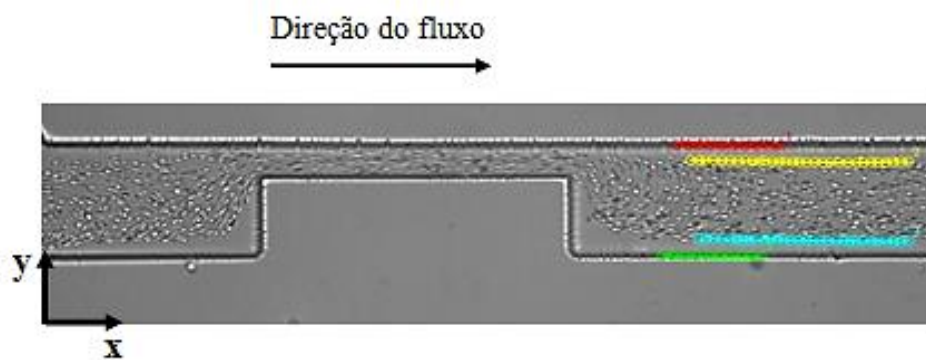


Figura 26 - Trajetórias representativas dos glóbulos vermelhos e identificação dos limites do microcanal após a estenose, no canal feito por litografia.

Capítulo 4

Tecnologia Laser na Microfabricação

4.1. Caracterização do sistema do laser de CO₂ usado

O laser de CO₂ utilizado neste estudo é o modelo X252 da PortLaser para corte e gravação, equipado com um laser de dióxido de carbono selado que emite a radiação laser intensa e invisível com um comprimento de onda de 10.6 μm no espectro de infravermelhos. O equipamento possui uma grande área de trabalho de 635 x 458 mm e oferece uma fonte de 80-100 W de potência para as necessidades de produção em massa. O sistema a laser é designado como um dispositivo a laser Classe I, o que significa que o sistema está equipado com os principais recursos de segurança e uma cabeça de laser fechado para conter completamente o laser sob uso normal. Uma das principais características de segurança encontradas na LaserPro X252 é a classe III para ponto vermelho, isto é, um ponteiro de orientação (semelhante a uma caneta de ponteira laser para apresentação) que permite ao operador ver o local exato onde o feixe de laser dispara [76, 77]. Na Figura 27 pode-se visualizar a máquina a laser usado neste trabalho.



Figura 27 - Máquina a laser, modelo X252 da Portlaser.

Na Tabela I encontram-se as características mais relevantes da máquina a laser X252.

Tabela I- Características técnicas da máquina de laser CO₂ modelo X252.

<i>Caraterísticas Técnicas</i>	
Fonte Laser	Laser CO ₂ de cavidade Selada
Movimento dos eixos	Control DC Servo
Lentes	Lente focal 2". Lentes opcionais de 1.5", 2.5", 4"
Velocidade máxima	1067mm/s
Controlo de velocidade	Ajustável de 0.1 – 100%, 16 cores diferentes de velocidade
Controlo de Potência	Ajustável de 0.1 – 100%, 16 cores diferentes de potência
Movimento do eixo z	Automático
Resolução (DPI)	200, 250, 300, 500, 600,1000
Memória	32 MB
Potência de consumo	1320W

4.1.1. Princípio de funcionamento do laser de CO₂

Qualquer átomo pode ser estimulado por uma fonte externa de energia. No laser o que ocorre é exatamente isso [78].

Um laser tem três partes fundamentais. A primeira é chamada **meio ativo**. Essa é a parte que possui os átomos que serão responsáveis pela emissão estimulada, criando fótons que participarão do feixe de luz do laser [79].

A emissão estimulada só pode ocorrer quando os eletrões estão excitados e essa é a função da segunda parte do laser, que é uma **fonte de energia** para o meio ativo [79].

A fonte de energia, neste caso, trata-se de um ânodo e um cátodo para excitar o meio gasoso – CO₂. Os elétrodos criam um campo elétrico que aumenta a energia do gás dentro da câmara. Em razão desse acréscimo de energia, os eletrões dos átomos que formam o CO₂ excitam-se e mudam de nível orbital, passando a girar em níveis mais

externos, ou seja, quanto mais esse nível está afastado do núcleo, maior é a energia do elétron. Após algum tempo, os elétrons voltam ao seu nível energético original e têm de eliminar a energia extra adquirida. Existem duas maneiras de se perder energia: por colisão e por emissão espontânea. No primeiro caso, quando o elétron choca com outro, a sua energia é consumida. Na emissão espontânea, ocorre libertação de energia na forma de luz. Quando o elétron retorna ao seu estado de menor energia, ocorre a libertação de um fóton. Esse fóton acaba por excitar o declínio dos demais átomos que estão excitados. Isto gera um processo em cascata que resulta na emissão estimulada por radiação. Esta luz emitida estimula a emissão contínua, de modo que a luz seja amplificada, gerando assim o raio laser. Para que ocorra a emissão estimulada é preciso ter disponibilidade de átomos no estado excitado, e quando o número de átomos no estado excitado ultrapassa o número de átomos no estado fundamental é dito que houve inversão da população [48, 51, 78,79].

A terceira parte é conhecida como **cavidade ressonante** e é onde está contido o meio ativo. Nas extremidades internas dessa cavidade existem dois espelhos, sendo um de reflexão total e outro de reflexão parcial (Figura 28), que fazem com que a radiação seja amplificada, ou seja, os fótons assumem a mesma direção e permitem que ocorram reflexão múltiplas do feixe de luz para a frente e para trás, dentro da cavidade, com o objectivo de armazenar energia. Os fótons de luz são direcionados pelo espelho semirefletivo, libertando assim o feixe do laser. Este, por sua vez, é colimado e novamente amplificado por meio de espelhos e guiado até ao cabeçote da máquina onde é concentrado, através de lentes, num único ponto: o foco [48,51,79]. Na Figura 28 apresenta-se um esquema rpresentativo do funcionamento do laser de CO₂.

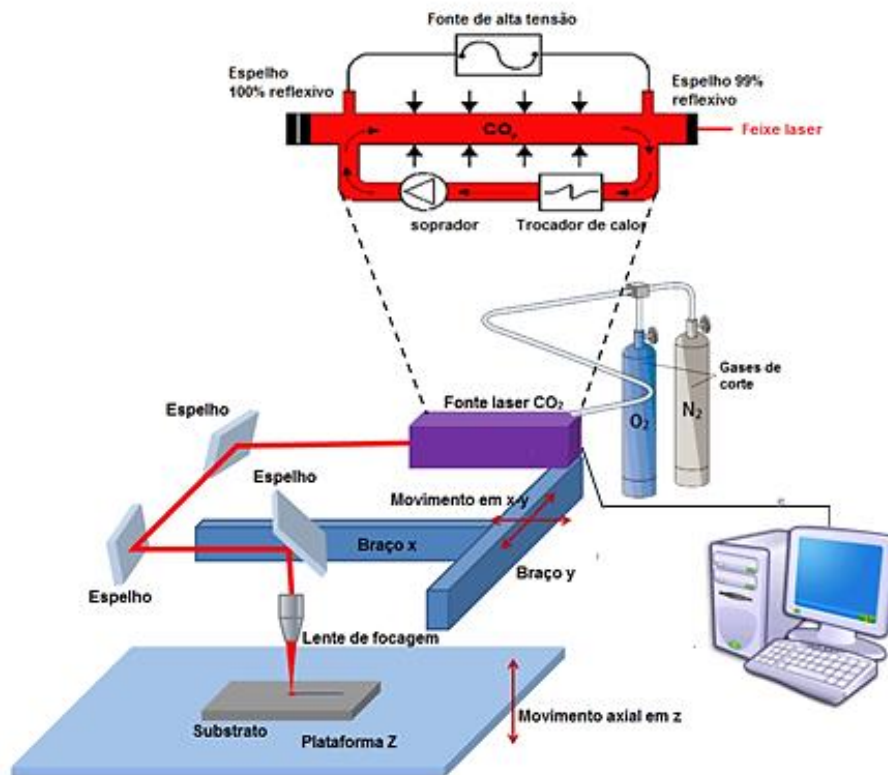


Figura 28 – Representação esquemática do funcionamento do laser de CO₂, adaptado de [80, 81, 82].

4.1.2. Parâmetros do processo de corte

Quando se pretende efetuar um corte por laser, é preciso ter em consideração inúmeros parâmetros operativos, dentro dos quais se destacam: a potência do laser, a velocidade de corte, PPI [48].

- **Velocidade:** O controlo deslizante de velocidade comanda a velocidade da máquina a laser durante a operação com uma configuração de intervalo de 0.1 - 100%. A velocidade máxima de processamento de laser do X252 é de 1067 mm por segundo. Esta é a velocidade que o laser se move ao cortar linhas retas. A máquina irá diminuir automaticamente no processamento de curvas [77].

- **Potência:** é um fator determinante da densidade de energia introduzida no material. Assim a potência deve ser determinada de modo a que a energia introduzida seja suficiente para executar o corte, para fundir todo o material no sentido da espessura, sem, contudo, fundir uma quantidade exagerada o que implica um aumento a largura de corte e da extensão da zona afetada pelo calor [48].
- **PPI:** Pulsos por polegada. O PPI determina o número de pulsos de laser por polegada linear. Por exemplo, um PPI de 500 significa que o laser dispara 500 vezes por polegada. Quanto maior o PPI, mais sobrepostos serão os pulsos de laser e maior a profundidade. Configurações mais baixas de PPI resultarão em pulsos de laser individuais, mais afastados, que não se tocam [48].

4.1.3. Manuseamento do *software* utilizado

A programação da máquina a laser é semelhante à programação de uma impressora comum, ou seja, é projetado um desenho no editor de imagens e enviado para o laser que tenta reproduzir os desenhos, ligando e desligando o laser nas regiões desejadas [51].

A máquina a laser funciona integrada a um sistema CAD/CAM, em que se desenvolve um projeto detalhado e que é utilizado como orientação no material onde será feito o trabalho [82].

O *software* utilizado neste estudo foi o *CorelDraw*, que permite ter acesso a todos os recursos disponíveis no laser e também permite alterar a ordem e o sentido dos desenhos, sem ter que se redesenhar todo o projeto [51].

O *LaserPro x252* incorpora o uso de 16 cores diferentes, que podem ser processadas numa representação gráfica. Para cada uma dessas cores é possível ajustar, independentemente, diferentes parâmetros como: a potência do corte, a velocidade do corte, o PPI, o modo de remoção do material ao efetuar o corte, etc. Através disto consegue-se uma infinidade de combinações obtendo diferentes acabamentos [83]. A Figura 29 mostra a janela do *driver* (nome dado ao programa que viabiliza a comunicação com outros *hardwares*, neste caso a máquina a laser) do laser X252.

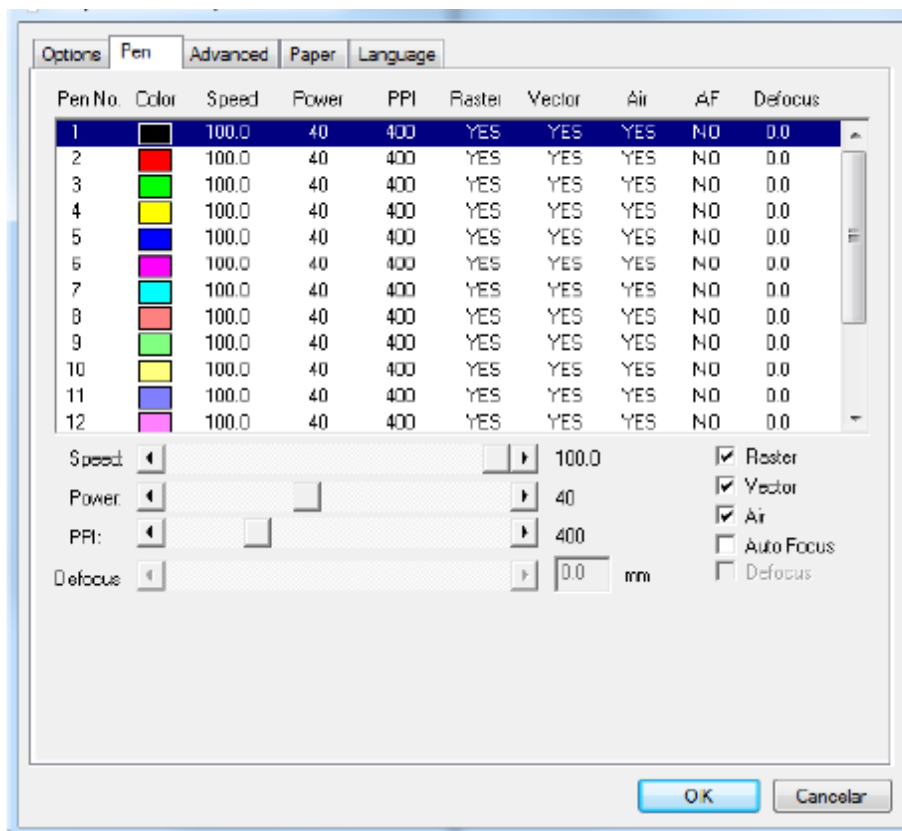


Figura 29 - Janela do *driver* da máquina de corte e gravação laser.

O laser X252 possui três modos de fazer remoções do material: o modo vetorial, o modo *raster* e o modo pontilhado. No modo vetorial, o feixe do laser faz apenas movimentos num único sentido. No modo *raster*, o laser percorre a área do desenho fazendo movimentos de ida e volta e, no modo pontilhado é semelhante ao modo vetorial, porém o laser é pulsado. Na figura 30 está ilustrada a ablação da letra “T” nos três diferentes modos.

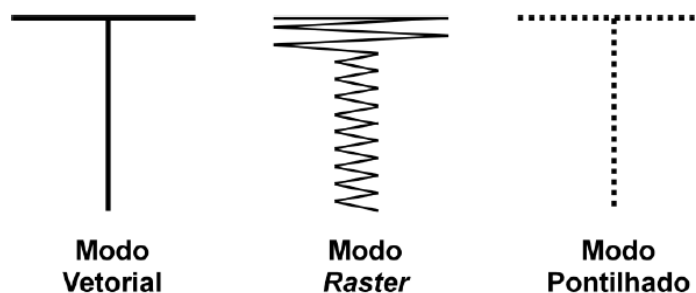


Figura 30 - Apresentação esquemática dos modos de ablação do laser X252 num modelo de corte em “T [51]”.

A representação do modo *raster* está ampliada para destacar a forma como é efetuado. Este modo permite ablações com dimensões similares aos demais [51].

4.1.4. Principais componentes e sistemas da máquina a laser de CO₂

Os principais componentes e sistemas da máquina a laser de CO₂ usada neste estudo apresentam-se a seguir.

4.1.4.1. Painel de Controlo

O painel de controlo na LaserPro X252 oferece fácil acesso a todos os comandos manuais necessários para o corte/gravação. O visor de cristal líquido (LCD), os botões funcionais, direcionais e de seleção tornam a navegação através do controlo manual da máquina fácil de manusear, permitindo gerenciar os arquivos que forem carregados. É possível percorrer os trabalhos, excluir um trabalho selecionado, excluir todos os trabalhos, guardar as configurações definidas, selecionar a lente pretendida, ir para o *link* de uma página para definir e organizar vários trabalhos carregados numa única fila de tarefas para processamento, entre outras funções. Na Figura 31 mostra-se o painel de controlo bem como a visualização dos parâmetros operativos estipulados na máquina a laser [77].



Figura 31 - Painel de controlo.

4.1.4.2. Abertura frontal e traseira

Este projeto de abertura de portas à frente e atrás da máquina permite o trabalho de peças de grandes dimensões, tal como se pode ver na Figura 32.



Figura 32 - Abertura da porta da frente do laser.

4.1.4.3. Focagem automática

A focagem automática ajusta o gravador do laser para o ponto focal exato sobre a área de gravação automaticamente [77]. A focagem automática é a ferramenta mais eficaz que impede o erro humano, quando é necessária a medição exata da distância da superfície do material de trabalho. Na Figura 33 pode-se visualizar a cabeça do laser.



Figura 33 - Cabeça do laser.

4.1.4.4. Botão de paragem de emergência

O botão vermelho (Figura 34) localizado na parte superior da máquina permite aos operadores parar o laser e o carro de movimento, imediatamente, para fornecer um ambiente operacional seguro, em qualquer momento que seja necessário.



Figura 34 - Botão de paragem de emergência.

4.1.4.5. Sistema de movimento com DC Servo Motor

O LaserPro X252 utiliza um DC servo motor de circuito fechado de alta velocidade para o movimento preciso e rápido, de modo a garantir saídas de corte excepcionalmente precisas. Na Figura 35 pode-se visualizar este sistema [77].

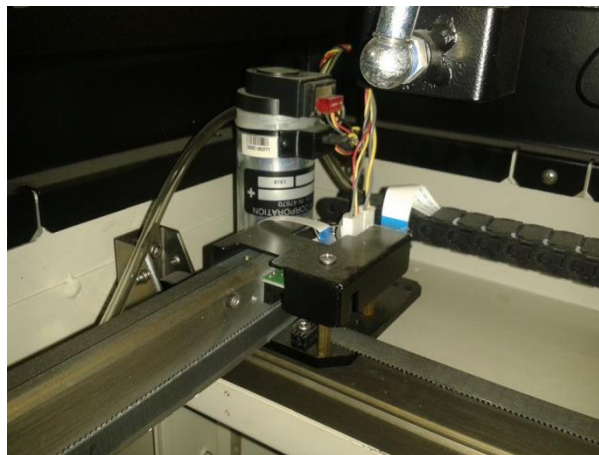


Figura 35 - DC Servo Motor.

4.1.4.6. Origem programável

A origem programável reduz consideravelmente os procedimentos complexos de configuração e permite que os usuários arrastem diretamente a cabeça do laser para o ponto de partida de um trabalho. Os fluxos de trabalho repetitivos podem ser drasticamente simplificados, transferindo a posição de origem para qualquer local [77]. Na Figura 36 está representada a origem programável do laser de CO₂.

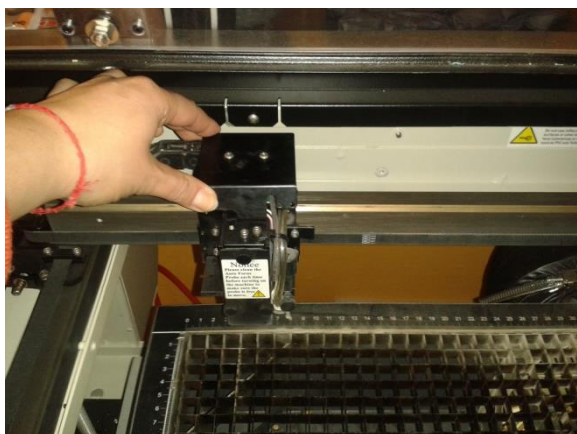


Figura 36 - Origem programável do laser.

4.1.4.7. Sistemas

O equipamento de corte por laser em estudo é constituído essencialmente pelos seguintes sistemas [51]:

- **Sistema de posicionamento:** consiste fundamentalmente numa estrutura fixa, num pórtico que se movimenta num eixo de direcção horizontal da cabeça de corte alinhada com a dimensão maior da chapa (eixo X) do tipo *gantry* (dois motores lineares sincronizados), numa carruagem que num eixo de direcção horizontal da cabeça de corte alinhada com a dimensão menor da chapa (eixo Y) e no eixo Z, isto é na direcção do movimento vertical da cabeça de corte perpendicular à chapa [51];
- **Sistema óptico:** consiste na fonte laser onde é criado o feixe laser, no caminho óptico que conduz o feixe ao longo da máquina e na cabeça de corte que foca o

feixe e o faz incidir adequadamente sobre o material. É composto pela fonte laser e espelhos [51];

- **Sistema de aspiração de fumos:** consiste fundamentalmente numa unidade de aspiração e filtragem de fumos [51];
- **Sistema de refrigeração:** destina-se a manter a água de refrigeração a temperatura constante e a distribuir o fluído pelos vários componentes a refrigerar [51];
- **Sistema de troca de mesa:** consiste num elevador que permite alinhar as mesas de apoio da chapa como a estrutura e um mecanismo de translação que movimenta a mesa adequada para a máquina [51].
- **Sistemas de segurança:** inclui blindagens, portas deslizantes, sinalizadores luminosos, etc [51].

Na Figura 37 apresenta-se um esquema simplificado dos componentes principais da máquina a laser.

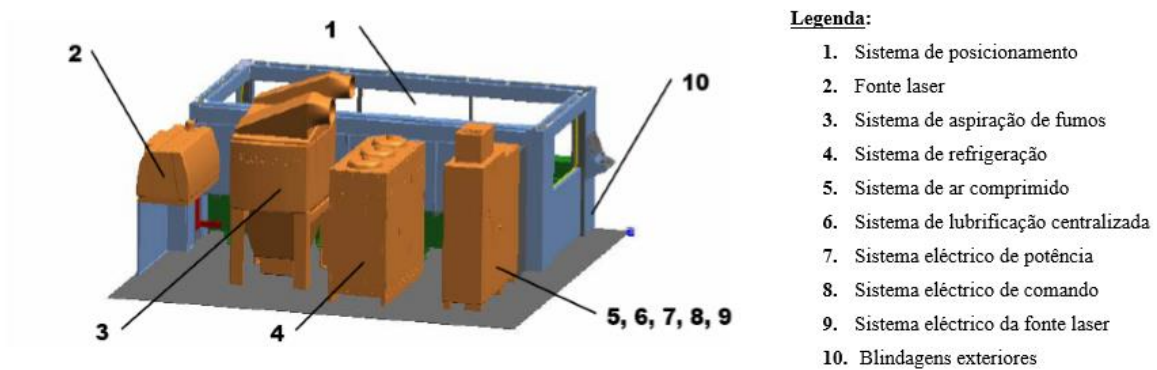


Figura 37 - Esquema simplificado dos componentes principais da máquina a laser [57].

4.2.1.1. Acrílico vazado e extrudido

Neste trabalho utilizou-se o acrílico vazado, pois no seu processo de fabrico (injeção) o material plástico é aquecido até o ponto de fusão e injetado em alta pressão em moldes refrigerados, onde arrefece e solidifica, uniformemente, na forma do objeto desejado. Em contrapartida, o acrílico extrudido (extrusão), é produzido pela compressão dos grânulos acrílicos através de uma rosca de extrusão convencional. O acrílico é fundido e empurrado através de uma matriz num processo contínuo. Desta forma, optou-se pelo uso do acrílico vazado, uma vez que permite um melhor corte e gravação, bem como um acabamento mais perfeito. O acrílico extrudido ao ser cortado também liberta mais gases nocivos que provocam mau cheiro e é muito mais frágil e quebradiço que o acrílico vazado.

4.3. Fabrico dos microcanais pela técnica de laser

O corte a laser permite, normalmente, obter perfis gaussianos (Figura 39-B). No entanto, tentou-se otimizar este processo, para que o microcanal ficasse o mais linear possível, isto é, que existisse equilíbrio entre os valores 1 e 2, com a menor profundidade alcançada.



Figura 39 - Perfis do laser. A – Perfil desejado; B - Perfil gaussiano normalmente obtido através do laser.

Inicialmente desenharam-se os microcanais com o perfil desejado no programa *CorelDRAW*, como referido anteriormente. Depois estipularam-se os parâmetros operativos (velocidade, potência e PPI) e definiram-se as letras da placa de PMMA para gravação e a geometria do rasgo para corte. De salientar, que foi sempre estipulada a espessura mínima, para que o traço possua uma área mínima que possa ser desenhada pelo laser. Na Figura 40 está representado o exemplo de um dos testes de corte/gravação

a laser efetuados neste trabalho, onde está representada a placa com os vários rasgos com os diferentes parâmetros estipulados, criados no *software CorelDRAW*.



Figura 40 - Teste de variação da potência, com *Speed* (0.4).

Cada rasgo apresenta uma cor diferente consoante a variedade de parâmetros estipulados para cada um. Neste caso, são diferentes por causa da variação do *Power*.

Os testes realizados a laser num estudo feito anteriormente, e expostos num *poster* denominado *Assessing the capability of a laser engraving machine to fabricate microchannels*, efetuaram-se de forma distinta dos criados neste trabalho. A lente usada e o modo de efetuar o corte foram pontos que se alteraram nesta experiência. Nesse estudo anterior, primeiro foram efetuados os cortes dos rasgos e estes feitos de dentro para fora da placa, e só depois o corte da placa. A lente usada foi apenas a de 2”.

Relativamente a este trabalho, primeiro foi cortada a placa de acrílico. Depois foram efetuados os rasgos, cortados de fora para dentro da placa. Procedeu-se desta forma, para que a que as entradas dos rasgos não ficassem obstruídas pelo material fundido. Utilizaram-se as lentes de 1.5” e 2”.

O laser faz primeiro as gravações (letras) e só depois o corte dos rasgos. Nos primeiros testes foi usada a lente de 1.5”. Inicialmente a lente é limpa, para que a sujidade não interfira nos resultados e depois é estabelecida a focagem, neste caso, determinada automaticamente pelo laser. É empregada uma distância adequada entre a placa de acrílico e a ponta do laser. Depois de se definirem os parâmetros operativos, escolheu-se a lente de 1.5” para se efetuarem os rasgos. Voltou-se a fazer novos rasgos com os mesmos parâmetros, mas com a lente de 2”, para se constatarem as diferenças entre as duas lentes. A Figura 41 mostra a placa de acrílico com os rasgos feitos com os diferentes parâmetros.



Figura 41 - Rasgos efetuados a laser na placa de acrílico.

De seguida foi possível comparar ambos os resultados e, averiguou-se que os rasgos criados com a lente de 2'' apresentavam uma menor profundidade. A lente de 1.5'' concentrava o feixe de radiação numa área mais pequena, libertando toda a energia nesse ponto, obtendo-se assim, um rasgo mais fundo. Por esse motivo nos testes seguintes foi sempre usada essa lente. Na Figura 42 podem-se visualizar os dois rasgos criados pelas lentes de 1.5'' e 2'', com o *Speed* (0.4) e *Power* (1).

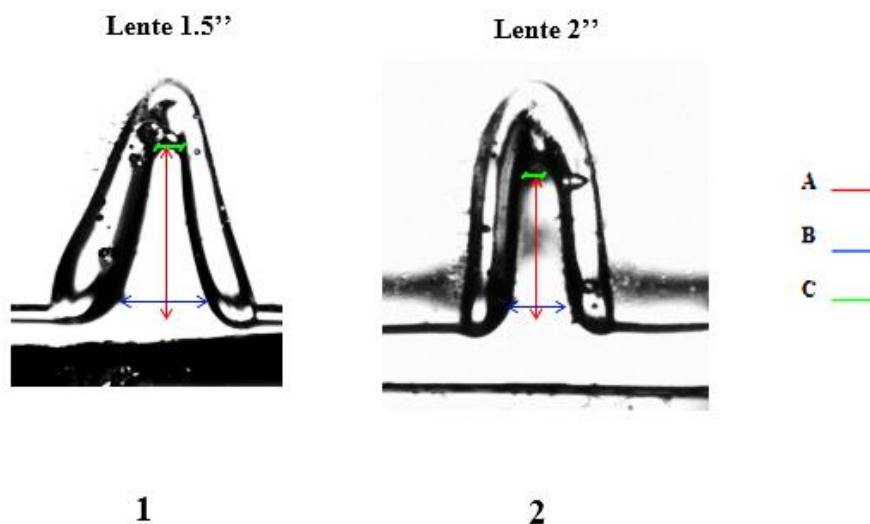


Figura 42 - Rasgos criados pelas lentes de 1.5'' e 2'' com *Power* (1) e *Speed* (0.4). 1 – A - 1016.667 μm ; B - 591.438 μm ; C - 141.613 μm ; 2 - A- 611.765 μm ; B - 294.118 μm ; C- 117.647 μm .

Depois de se efetuarem vários testes com a correlação entre os diferentes parâmetros, obtiveram-se quatro rasgos que se diferenciaram dos restantes. A partir daí

foi criada uma geometria simples de um rasgo que na região central apresentava um estreitamento, para averiguar como se comportava o laser com estes parâmetros. Na Figura 43 está representado o desenho das geometrias dos quatro canais com os melhores parâmetros operatórios e a placa de acrílico com os respectivos cortes feitos a laser.

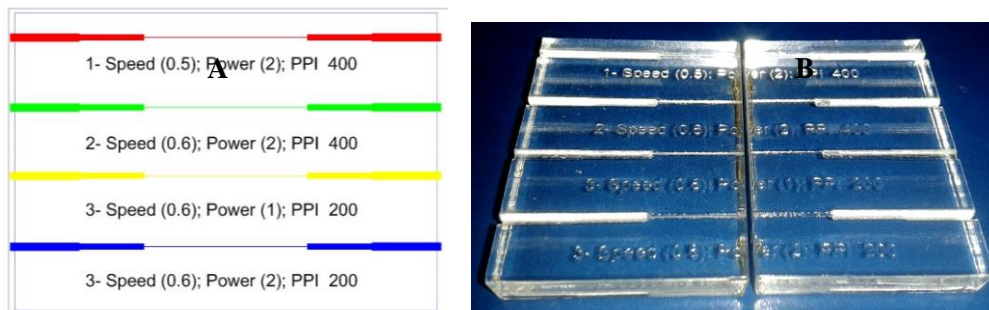


Figura 43 - Geometria simples com um estreitamento do canal. **A** – Desenho no *CorelDRAW*; **B** – Corte dos canais a laser na placa de PMMA.

Depois de se efetuarem todos os testes com os diferentes parâmetros e a partir do aspeto do corte dos mesmos, concluiu-se que os melhores resultados se obtiveram com o *Speed* (0.6), *Power* (1) e o *PPI* (200).

Na Figura 44 está representado o canal com os melhores parâmetros, visto de cima, bem como a profundidade da zona com estenose.

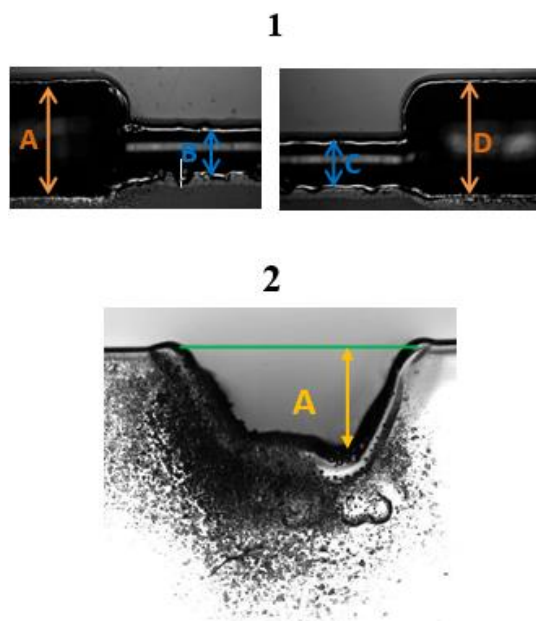


Figura 44 - *Speed* (0.6); *Power* (2); *PPI* (200). **1. A** - 1272.222 μm ; **B** - 538.889 μm ; **C** - 533.333 μm ; **D** - 1277.778 μm . **2. A** - 725 μm .

Seguidamente tentou-se reproduzir a mesma geometria dos canais feitos por litografia, mas esta teve de ser alterada para se adaptar melhor ao corte a laser, visto que as dimensões dos canais por litografia eram muito pequenas. Inicialmente as geometrias dos canais foram feitas no *SolidWorks*, que se trata de um *software* CAD (*computer aided design*) ou seja “desenho assistido por computador”. Baseia-se em computação paramétrica, ou seja, cria corpos tridimensionais a partir de formas geométricas elementares, os esboços em 2D. Uma vez construídas as geometrias, guardaram-se as mesmas na extensão Dxf. para ser possível abrir no *CorelDRAW*, para se efetuarem as devidas definições e estipular os parâmetros operativos para o corte dos microcanais a laser. A Figura 45 apresenta os desenhos das geometrias dos canais no *software* *CorelDRAW*. A cor verde definiu-se para o corte da geometria, com os parâmetros estipulados, o limite a vermelho estipulou-se para o corte da placa e para os furos na entrada e saída do microcanal e a cor preta definiu-se para a gravação das letras.

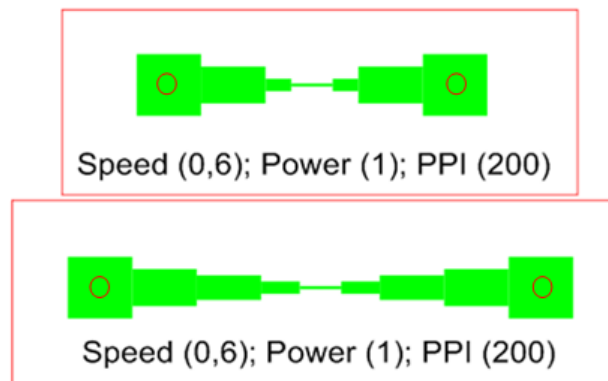


Figura 45 - Geometria dos microcanais e respetivos parâmetros no *Corel Draw*.

O processo de corte a laser demorou apenas alguns minutos. A Figura 46 mostra os canais em PMMA obtidos através do corte a laser.



Figura 46 - Geometrias dos canais obtidos através do laser.

De seguida os canais foram colocados num gobelé com água destilada e detergente e postos num agitador magnético (Figura 47), para limpar qualquer tipo de impurezas. Depois foram secos perto de um termoventilador, para o processo de secagem ser mais rápido.

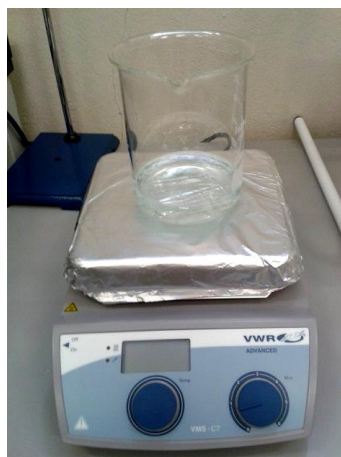


Figura 47 - Limpeza dos microcanais através do agitador magnético.

4.4. Selagem dos microcanais

Uma das etapas mais desafiadoras na microfabricação é a selagem. A selagem é um processo que procura manter as diferentes partes de um dispositivo unidas, de forma a

garantir o pleno funcionamento dos microcanais. Ou seja, o dispositivo após selado não pode conter vazamentos, regiões com bolhas e tem de ser forte o suficiente para resistir às condições de funcionamento.

Primeiro tiraram-se as pontas das *tips* das seringas com um alicate para colocar em cada furo, isto é, nas entradas e saídas dos microcanais. Depois usou-se uma cola própria para plástico para isolar as ranhuras junto aos furos e deixou-se a secar durante um dia. Seguidamente, na base do dispositivo foi colocada uma película de poliéster para isolar o canal. Esta foi pressionada para ficar bem presa à geometria, principalmente junto às suas rebordas, uma vez que são as zonas mais problemáticas em termos de selagem. Na Figura 48 pode-se ver a película de poliéster usada na selagem, bem como os dispositivos microfluídicos obtidos.

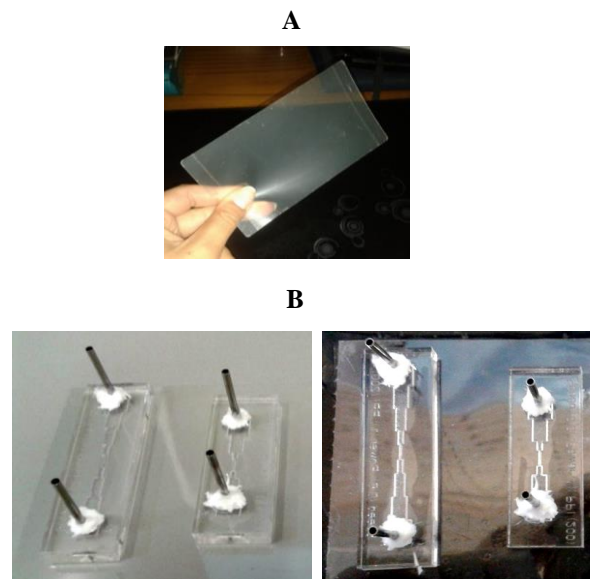


Figura 48 - A - Película de poléster usada na selagem; B – Dispositivos microfluídicos.

4.5. Visualização dos escoamentos sanguíneos

Com os dispositivos microfluídicos preparados, passou-se à montagem de todo o sistema usado para a caracterização dos escoamentos. Usou-se o mesmo equipamento que nos canais feitos por litografia durante todo o estudo em causa. Neste caso, para ambos os canais usou-se um caudal mais elevado, de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ e o hematócrito de 5%. Na Figura 49 está representada a ligação dos tubos às pontas das *tips* na entrada e saída do microcanal durante o escoamento sanguíneo.

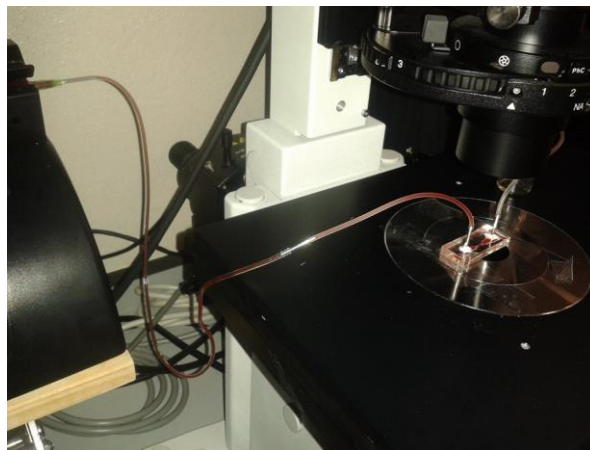


Figura 49- Sistema microfluídico usado no escoamento sanguíneo.

Após se testar e visualizar os escoamentos verificou-se que no canal mais pequeno, o sangue estava a sair pela entrada do mesmo, ou seja, o isolamento do canal falhou porque a cola usada não aderiu devidamente. Nos dois canais averiguou-se que a película de poliéster interferia na visualização dos escoamentos, pois notavam-se as bordas do canal dificultando a visualização. Depois disto, os microcanais foram limpos e, para solucionar este problema, foi usado um disco de lixa de 1000 (granulometria) para polir a geometria, na tentativa de eliminar o máximo possível as bordas resultantes do processo de microfabricação. Usou-se um pouco de corante para fluir no microcanal para verificar se as bordas ainda se notavam e verificou-se que as rebarbas desapareceram de forma significativa, permitindo distinguir os limites do canal. Na Figura 50 pode-se observar a diferença na visualização dos canais, antes e depois de serem polidos.

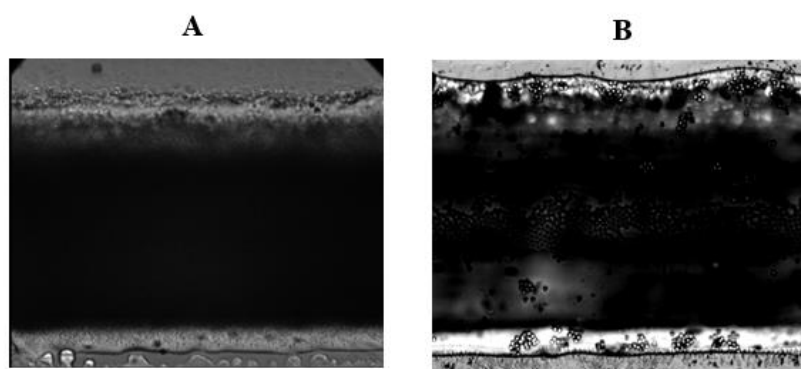


Figura 50 - Visualização do escoamento no microcanal (região da estenose). A – Antes do polimento; B – Depois do polimento.

O passo seguinte foi aumentar a extensão da estenose no canal maior para se apurar se este aumento interferia na existência de mais ou menos camada de plasma depois e estreitamento do microcanal. O tamanho da estenose foi aumentado em duas vezes mais (L2) e 5 vezes mais (L5), como se pode observar na Figura 51.

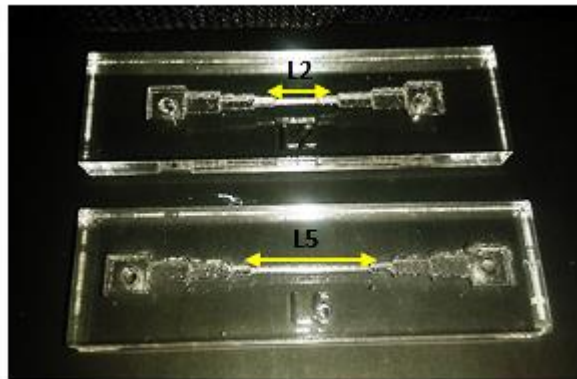


Figura 51 - Canais com o aumento da estenose. L2 (aumento da estenose em duas vezes mais) e L5(aumento da estenose em 5 vezes mais).

Depois da microfabricação dos canais projetados, estes foram polidos para retirar a maior parte das rebarbas, e depois foram limpos e secos devidamente. Prosseguiu-se para o isolamento dos microcanais com a película de poliéster e depois para a montagem do equipamento de forma a visualizar-se o escoamento da amostra preparada. Foram testados caudais de 5, 10, 15, 20 e 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ com um hematócrito de 5%. Quanto à construção do sistema microfluídico, foi alterado o método de encaixe dos tubos aos furos do microcanal, isto é, não se usaram as pontas das *tips*, uma vez que os tubos foram encaixados diretamente na entrada e saída dos microcanais. Por outro lado a cola usada também foi diferente, optou-se por uma cola transparente, ultrarresistente, que permitia uma selagem hermética, ou seja, completamente fechada, que não deixava penetrar o ar. Na Figura 52 podem-se visualizar os canais com os tubos inseridos nas entradas e saídas bem como o isolamento perto dos tubos através da cola transparente e também a montagem do equipamento para se iniciarem os testes de escoamento.

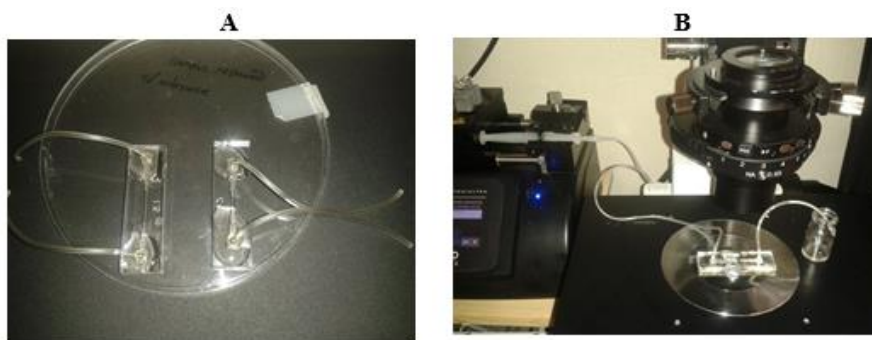


Figura 52 - A - Ligação dos tubos e isolamento com cola transparente nos microcanais; B - Montagem do equipamento para a visualização dos escoamentos sanguíneos.

4.6. Otimização do método de selagem

Numa tentativa de melhorar o método de selagem, a película de poliéster foi substituída por uma lâmina de vidro. Primeiro escolheu-se a lâmina mais adequada para a base do microcanal, neste caso, uma lâmina retangular. De seguida foi preparado o PDMS que serviu de agente de ligação entre o microcanal e a lâmina. Para tal, foi utilizado um copo como recipiente. Neste foi colocado, 10 gramas de PDMS e 0.5 gramas de agente de cura (pesados numa balança analítica), numa proporção de 20:1. Para homogeneizar a solução usou-se uma espátula e mexeu-se a mistura. O polímero e o agente de cura são misturados durante 3-5 minutos, verificando-se a ocorrência de bolhas de ar. Assim é necessário proceder à sua remoção utilizando, para tal, uma bomba de vácuo, como é possível ver na Figura 53-D. Este processo é bastante lento, mas leva a que no final a solução fique completamente isenta de bolhas. A Figura 53 mostra as etapas realizadas nesta parte do trabalho.

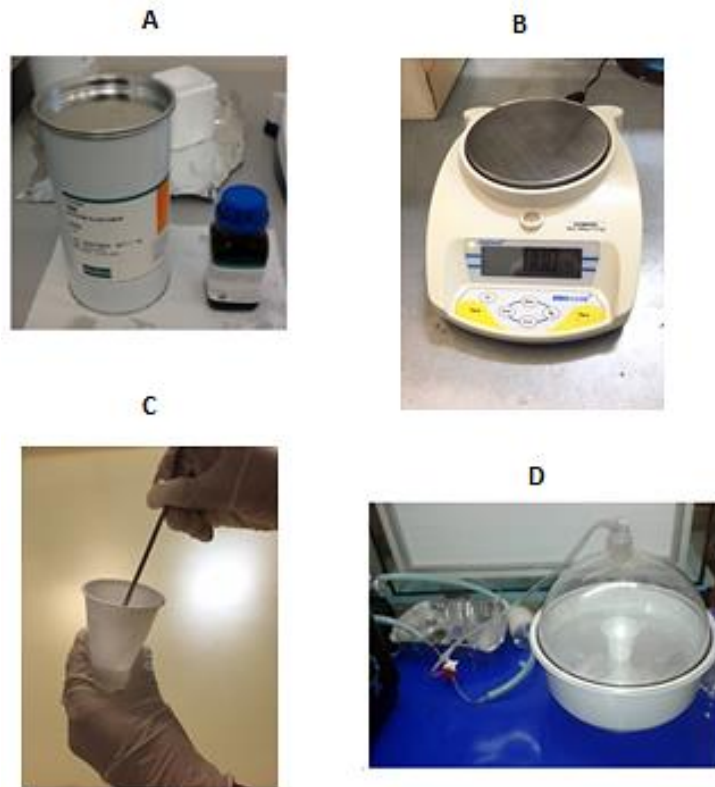


Figura 53 - A - Polímero PDMS e agente cura, respectivamente; B – Balança analítica; C – Homogeneização da solução através da espátula; D – Bomba de vácuo para a remoção das bolhas de ar.

Na etapa seguinte lavaram-se as lâminas com álcool etílico, depois passou-se água destilada e secou-se com papel absorvente. Para prevenir possíveis lixos ou pêlos existentes usou-se o jato de ar nas lâminas, cuidadosamente, para não partirem. De seguida utilizou-se a *spin-coater*, utilizada para depositar camadas finas uniformes em substratos lisos. Normalmente, uma pequena quantidade de material é aplicada sobre o centro do substrato, que gira a uma determinada velocidade, de modo a espalhar o material pela superfície, uniformemente, através da força centrífuga. Inicialmente colocou-se papel aderente ao longo das bordas do encaixe da *spin-coater* (Figura 54), para esta parte não se sujar uma vez que é de borracha e é mais difícil de limpar. Colocou-se a lâmina no centro da *spin-coater* com esta desligada, depois ligou-se para a lâmina ficar presa à máquina devido á sucção desta. Com a ajuda de uma espátula, espalhou-se um pouco de PDMS ao longo da lâmina e fechou-se a tampa da *spin-coater*. A *spin-coater* inicialmente rodou durante 1 minuto a 4000 rpm para espalhar a mistura, seguindo-se mais 1 minuto a 5000 rpm para uniformizar a camada de PDMS ao longo da lâmina. Efetuaram-se os mesmos procedimentos para as duas lâminas usadas.

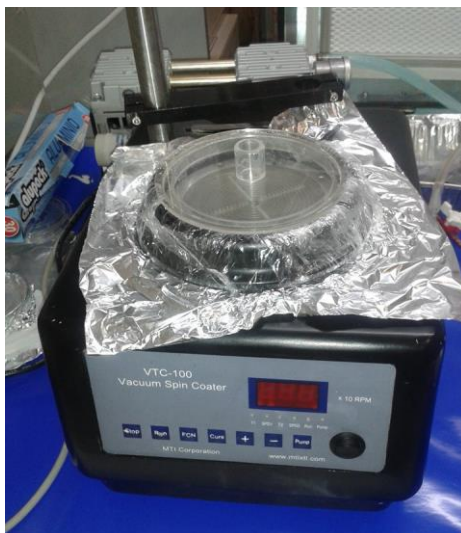


Figura 54 - Spin-coater.

Obtendo-se a lâmina com uma superfície uniforme, foi levada à estufa durante 13 minutos a 80°C, com o intuito de curar o PDMS. Com o PDMS curado, colocou-se cuidadosamente o microcanal em cima da lâmina e deixou-se na estufa de um dia para o outro. Na Figura 55 pode ver-se o microcanal com a lâmina de vidro como elo de selagem.



A seguir **Figura 55** - Microcanal selado com a lâmina de vidro. passou-se à visualização dos escoamentos, com um hematócrito de 5% e caudais de 50, 70 e 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Estes caudais foram maiores para averiguar até que ponto os microcanais aguentavam os escoamentos sem existirem possíveis fugas.

Perante os testes de escoamento verificou-se que a selagem com as lâminas e o PDMS não era um método adequado, oferecendo uma menor resistência aos caudais impostos. Notavam-se algumas bordas perto da parede do canal, tal como acontecia com a película de poliéster. Quanto à visualização foi muito melhor, pois notavam-se muito mais os glóbulos vermelhos, mesmo nas regiões com mais aglomeração destes. Na Figura 56 pode-se verificar a passagem do escoamento sanguíneo no microcanal selado com a lâmina de vidro.

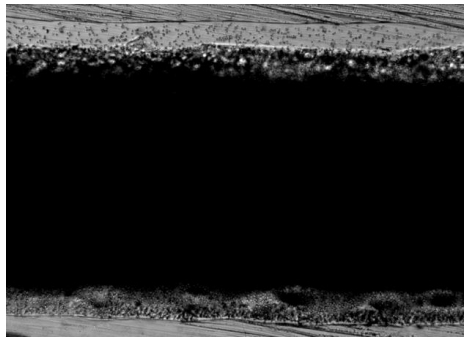


Figura 56 - Escoamento sanguíneo em microcanal selado com a lâmina.



Capítulo 5

Resultados e sua Discussão

Apresentam-se neste capítulo os resultados obtidos relativamente à microfabricação, medidas dos microcanais, métodos de selagem e visualização e medição da espessura da camada de plasma.

5.1. Microfabricação

5.1.1. Otimização dos parâmetros a laser

Nesta secção é feita a comparação dos vários parâmetros utilizados na máquina a laser em prol de três medidas específicas: A - Profundidade do canal; B - Entrada do canal e C - Saída do canal. Na Figura 57 representam-se as três medidas bem como a geometria do rasgo obtida.

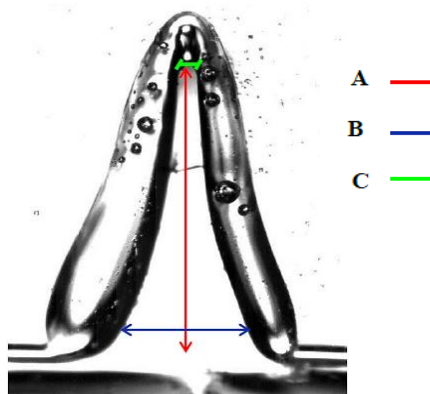


Figura 57 - Representação de um rasgo feito através do laser. A - Profundidade do canal; B - Entrada do canal e C - Saída do canal.

Nas Tabelas II a XII apresentam-se os valores obtidos de A, B, C, B-C e a validação dos melhores resultados em função do *Power*, *Speed* e PPI.

- **Variação do *Power1* com *Speed* (0.4)**

Tabela II - Variação do *Power1* com *Speed* (0.4)

	A (µm)	B (µm)	C (µm)	B - C (µm)	Validação
<i>Power</i> (1)	1016.667	591.438	141.613	449.825	✓
<i>Power</i> (2)	1216.667	754.167	141.612	612.555	✓
<i>Power</i> (3)	1666.667	883.334	166.602	716.732	✗
<i>Power</i> (4)	1938.889	907.983	133.282	774.701	✗
<i>Power</i> (6)	2408.333	991.284	141.612	849.672	✗
<i>Power</i> (7)	2725.000	996.294	133.282	863.012	✗

Como se pode observar pelos resultados da Tabela II, os rasgos onde se usou o *Power* (1 e 2) foram selecionados para continuar os testes face à variação dos parâmetros da máquina a laser, uma vez que apresentam os valores mais baixos referentes à profundidade do canal bem como menores diferenças entre o valor B e C.

- **Variação do *Power2* com *Speed* (0.4)**

Tabela III - Variação do *Power2* com o *Speed* (0.4)

	A (µm)	B (µm)	C (µm)	B - C	Validação
<i>Power</i> (2)	931.250	325.490	74.510	250.980	✓
<i>Power</i> (5)	1537.500	535.294	70.588	464.706	✗
<i>Power</i> (10)	2475.000	572.549	86.275	486.274	✗
<i>Power</i> (15)	3862.500	555.863	70.588	485.275	✗
<i>Power</i> (20)	4637.500	976.471	458.823	517.648	✗

Como se pode constatar pelos valores da Tabela III, o único valor de interesse é o rasgo onde se usou o *Power* (2) com um *Speed* de 0.4, pois foi onde se obteve uma diferença menor entre B e C e se verificou o valor mais baixo da profundidade do canal. De salientar que foi também usado o *Power* (25), no entanto, os valores do canal não foram retirados porque em algumas regiões deste, o material acabou por fundir e isolar o rasgo como se vê na Figura 58, devido à potência usada ser elevada.



Figura 58 - Rasgo obtido com o *Power* (25) e *Speed* (0.4).

- **Variação do *Speed* com *Power* (2) e PPI (400)**

Tabela IV - Variação do *Speed* com *Power* (2) e PPI (400).

	A (µm)	B (µm)	C (µm)	B - C (µm)	Validação
<i>Speed</i> (0.1)	1598.230	263.158	41.025	222.133	✘
<i>Speed</i> (0.2)	825.664	342.105	55.264	286.841	✘
<i>Speed</i> (0.3)	520.354	257.895	60.527	197.368	✓
<i>Speed</i> (0.4)	398.230	284.211	54.386	229.825	✘
<i>Speed</i> (0.5)	329.204	263.158	50.000	213.158	✘
<i>Speed</i> (0.6)	277.876	255.263	52.631	202.632	✓

Através dos resultados da Tabela IV, pode-se averiguar que o *Speed* (0.3) com *Power* (2) e PPI (400) apresentou uma menor diferença entre os valores de B e C. Por outro lado, com o *Speed* (0.6) obteve-se uma menor profundidade do rasgo e também um dos valores mais baixos entre B e C.

- **Variação do PPI com *Speed* (0.4) e *Power* (2)**

Tabela V- Variação do PPI com *Speed* (0.4) e *Power* (2).

	A (µm)	B (µm)	C (µm)	B - C (µm)	Validação
PPI (500)	772.881	332.241	80.874	251.367	✓
PPI (600)	718.644	371.584	83.061	288.523	✓
PPI (700)	742.373	426.229	96.175	330.054	✗
PPI (800)	762.712	417.486	100.547	316.939	✗
PPI (900)	723.203	397.814	89.617	309.197	✗
PPI (1000)	691.525	417.486	91.803	325.683	✓

Pela observação da Tabela V, constata-se que o PPI (500) foi um dos valores mais adequado para os testes seguintes, uma vez que a diferença entre B e C foi a mais baixa de todas. Com PPI (600) alcançaram-se um dos valores mais baixos, tanto no valor da profundidade como na diferença entre B e C. Com o uso do PPI (1000) o valor da profundidade foi a menor de todas, apesar da diferença entre os valores de B e C ter sido maior do que com o PPI (500) e PPI (600).

- **Variação do *Power1* com *Speed* (0.4)**

Tabela VI - Variação do *Power1* com *Speed* (0.4)

	A (μm)	B (μm)	C (μm)	B - C	Validação
<i>Power</i> (1)	611.765	294.118	117.647	176.471	✓
<i>Power</i> (2)	700.025	317.647	105.882	211.765	✗
<i>Power</i> (3)	952.941	388.236	100.000	288.236	✗
<i>Power</i> (4)	1164.706	435.294	117.647	317.647	✗
<i>Power</i> (6)	1711.765	558.824	105.882	452.942	✗
<i>Power</i> (7)	1829.412	564.706	76.470	488.236	✗

De acordo com os dados obtidos e apresentados na Tabela VI, é possível verificar que os únicos valores de interesse foram alcançados com o *Power* (1), uma vez que a menor profundidade e a menor diferença entre B e C se obtiveram com este parâmetro e com *Speed* (0.4).

- **Variação do *Power2* com *Speed* (0.4)**

Tabela VII - Variação do *Power2* com *Speed* (0.4).

	A (μm)	B (μm)	C (μm)	B - C (μm)	Validação
<i>Power</i> (2)	664.706	305.882	117.647	188.235	✓
<i>Power</i> (5)	1149.02	525.49	101.961	423.529	✗
<i>Power</i> (10)	2180.392	588.235	86.274	501.991	✗
<i>Power</i> (15)	3184.314	635.294	78.432	556.862	✗
<i>Power</i> (20)	3874.51	623.53	141.177	482.353	✗
<i>Power</i> (25)	4376.471	635.294	294.118	341.176	✗

A partir dos dados da Tabela VII, pode-se constatar que o único valor de interesse é quando se usou o *Power* (2) com *Speed* (0.4), pois obtiveram-se os menores valores tanto de profundidade do microcanal como entre a diferença entre B e C.

- **Variação do *Speed* com *Power* (2) e PPI (400)**

Tabela VIII- Variação do *Speed* com *Power* (2) e PPI (400).

	A (µm)	B (µm)	C (µm)	B - C (µm)	Validação
<i>Speed</i> (0.1)	1933.333	241.096	109.589	131.507	✘
<i>Speed</i> (0.2)	1105.556	257.534	131.506	126.028	✘
<i>Speed</i> (0.3)	786.111	268.493	120.548	147.945	✘
<i>Speed</i> (0.4)	616.667	284.931	136.986	147.945	✘
<i>Speed</i> (0.5)	404.167	241.096	142.466	98.630	✓
<i>Speed</i> (0.6)	383.333	258.904	139.726	119.178	✓

Através dos resultados da Tabela VIII, pode-se afirmar que o *Speed* (0.5) e *Speed* (0.6) apresentaram os valores mais indicados no que diz respeito a uma menor profundidade, sendo que o *Speed* (0.6) foi o que proporcionou um valor mais baixo deste parâmetro. O *Speed* (0.5) permitiu obter o valor mais baixo da diferença entre B e C.

- **Variação do PPI com *Speed* (0.4) e *Power* (2)**

Tabela IX- Variação do PPI com *Speed* (0.4) e *Power* (2).

	A (μm)	B (μm)	C (μm)	B - C (μm)	Validação
PPI (500)	724.996	227.273	90.909	136.364	✓
PPI (600)	672.723	247.727	95.454	152.273	✗
PPI (700)	656.814	243.181	84.091	159.090	✗
PPI (800)	640.905	265.909	93.182	172.727	✓
PPI (900)	654.542	281.818	120.454	161.364	✗
PPI (1000)	706.814	295.453	75.000	220.453	✗

Dos resultados apresentados na Tabela IX, constata-se que o PPI (500) proporcionou uma menor diferença entre os valores de B e C. Contudo, o PPI (800) fez com que se obtivesse o valor mais baixo da profundidade do rasgo, apesar da diferença entre B e C ter sido maior do que com o PPI (500).

- **Variação do PPI com *Speed* (0.6) e *Power* (1).**

Tabela X- Variação do PPI com *Speed* (0.6) e *Power* (1).

	A (μm)	B (μm)	C (μm)	B - C (μm)	Validação
PPI (500)	388.506	319.541	156.322	163.219	✗
PPI (400)	393.103	328.736	151.724	177.012	✓
PPI (300)	370.115	331.034	163.219	167.815	✓
PPI (200)	390.805	321.839	179.310	142.529	✓
PPI (100)	524.138	317.241	158.621	158.620	✗
PPI (50)	379.310	319.54	165.518	154.022	✗

Relativamente aos valores da Tabela X, pode-se constatar que o PPI (300) fez com que se alcançasse o valor mais baixo em relação à profundidade do rasgo e, por outro lado, o PPI (200) fez com que a diferença entre B e C fosse a menor.

- **Variação do PPI com *Speed* (0.6) e *Power* (2)**

Tabela XI - Variação do PPI com *Speed* (0.6) e *Power* (2).

	A (µm)	B (µm)	C (µm)	B - C (µm)	Validação
PPI (500)	496.552	287.356	103.448	183.908	✘
PPI (400)	491.954	491.954	158.621	333.333	✘
PPI (300)	468.966	296.552	137.931	158.621	✘
PPI (200)	466.667	296.552	140.230	156.322	✓
PPI (100)	648.276	305.747	126.436	179.311	✘
PPI (50)	402.299	363.219	103.448	259.771	✓

Através da Tabela XI verificou-se que o PPI (200) permitiu obter o valor mais baixo entre a diferença entre B e C. O valor menor da profundidade do rasgo foi com o PPI (50), apesar da diferença entre B e C com este parâmetro ter sido a maior.

- **Variação do *Speed* com *Power* (1) e PPI (100)**

Tabela XII - Variação do *Speed* com *Power* (1) e PPI (100).

	A (µm)	B (µm)	C (µm)	B - C (µm)	Validação
Speed (0.4)	583.333	312.500	125.000	187.500	✘
Speed (0.5)	479.167	354.167	166.667	187.500	✓
Speed (0.6)	400.000	329.167	158.333	170.834	✘
Speed (0.7)	300.000	329.167	179.167	150.000	✓

Através da análise da análise da Tabela XII, conclui-se que os parâmetros mais adequados e que permitiram obter melhores resultados face à fabricação dos canais, foram *Speed* (0.5 e 0.6) com *Power* (1) e PPI (200). Nas Figuras 59 e 60 estão representados os rasgos obtidos com os melhores parâmetros encontrados.

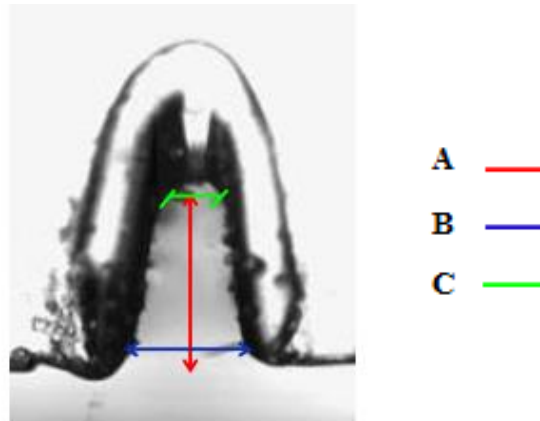


Figura 59 - Rasgo obtido com *Speed* (0.6), *Power* (2), PPI (400). A - 383.333 μm ; B - 258.904 μm ; C - 139.726 μm .

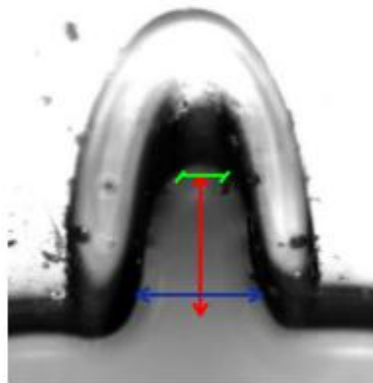


Figura 60 - Rasgo obtido com *Speed* (0.6), *Power* (1), PPI (200). A- 390.805 μm ; B - 321.839 μm ; C- 179.31 μm .

Os dois rasgos acima representados nas Figuras 59 e 60 foram os que proporcionaram melhores resultados, tanto na obtenção do valor mais baixo possível da profundidade, como na menor diferença entre B e C. As diferenças de valores entre os

dois rasgos são mínimas, mas o rasgo com o PPI (400) apresentou valores ligeiramente menores. Contudo, optou-se por escolher o rasgo com o PPI (200), pois como se pode observar na Figura 59, o acabamento superficial é melhor, expondo um corte mais limpo. Isto acontece, porque com o PPI (400), o laser vai efetuar mais pontos em menos espaço, logo o material vai sofrer uma maior deformação e, conseqüentemente, aumenta a rugosidade do canal.

5.2. Medidas dos microcanais

Nesta secção apresentam-se as medidas dos microcanais fabricados a laser e por litografia.

5.2.1. Laser

Com a criação dos canais a laser foi possível fazer a comparação entre os valores práticos das medidas destes em comparação com os valores teóricos estipulados. Como se pode observar, depois de se medirem os microcanais com o *MTrackJ*, pode-se concluir que os valores práticos estão muito próximos dos teóricos. Existem umas discrepâncias mínimas que podem ter surgido devido à superfície do material ser irregular ao longo do microcanal e também devido a erros de medições, dependendo da região onde foi medida a largura do microcanal. Nas Figuras 61 e 62 apresentam-se os microcanais estenosados criados inicialmente (canal grande e pequeno), bem como as geometrias em 2D desenhadas no *SolidWorks* (mm) e os microcanais obtidos pelo corte a laser.

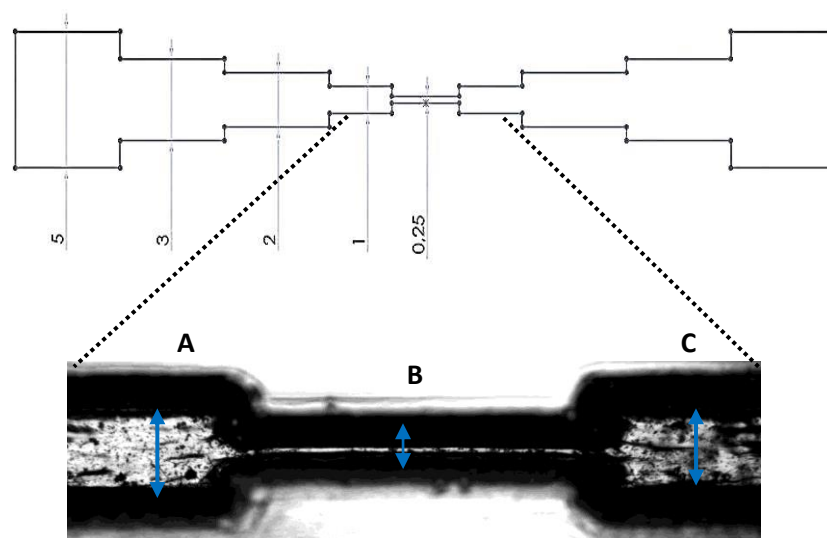


Figura 61 - Largura do microcanal grande. A - 1240.205 μm ; B - 354.838 μm ; C - 1260.648 μm .

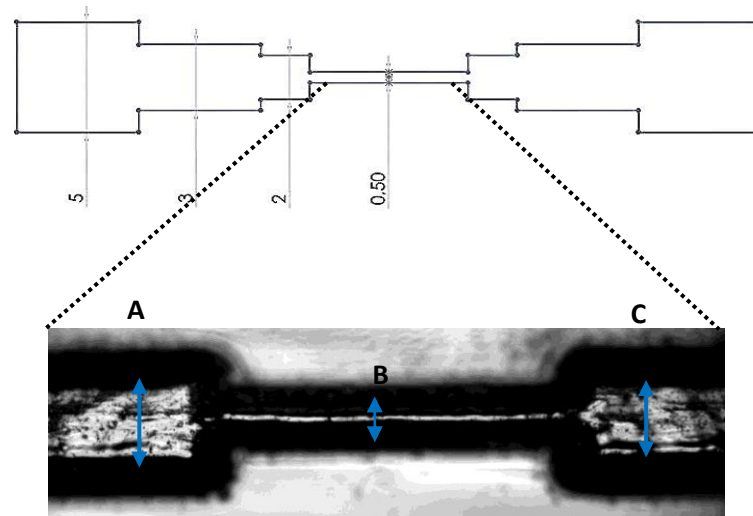


Figura 62 - Largura do microcanal pequeno. A - 1345.826 μm ; B - 531.183 μm ; C - 1339.012 μm .

De salientar que foram somente usadas as medidas do canal grande para aumentar a estenose em duas e cinco vezes mais, L2 e L5, respetivamente. Os escoamentos do sangue realizaram-se nestes dois canais (L2 e L5) ao longo do trabalho.

5.2.2. Litografia

A técnica de litografia permite obter microcanais mais pequenos comparado aos microcanais fabricados pelo laser. Isto deve-se ao facto do polímero na litografia ser depositado sobre o molde fabricado, passando pelo processo de cura. Numa fase seguinte o polímero solidifica, adquirindo o padrão similar ao molde. No que diz respeito ao laser, este tem um limite de fabrico, pois usa um feixe de radiação, que vai insidir no substrato, removendo material através da ação do calor. Por este motivo, quanto mais pequenas forem as dimensões do canal, mais difícil se torna o seu fabrico, pois ao fazer o rasgo do canal este pode ser obstruído, uma vez que a radiação pode fundir o material. Na Figura 63 estão representadas as dimensões dos microcanais obtidos por litografia neste estudo.

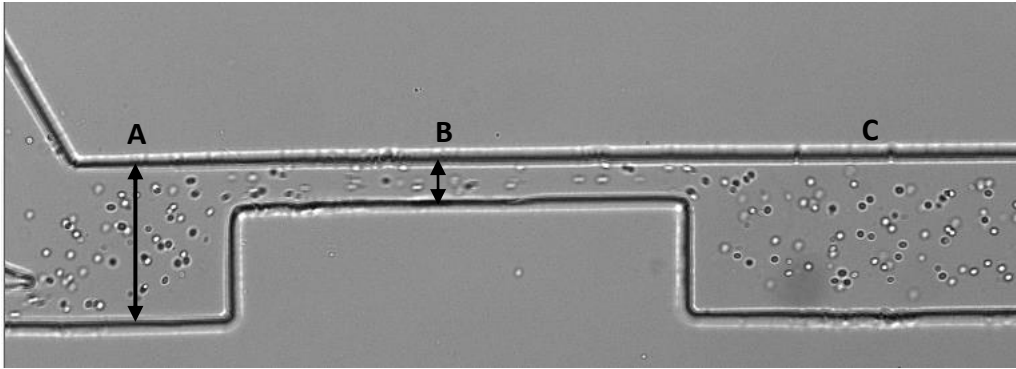


Figura 63 - Largura do microcanal criado por litografia. A -108.108 μm ; B - 32.432 μm ;

C - 108.108 μm

5.3. Métodos de selagem e visualização

O processo que apresentou melhores resultados a nível de selagem foi com o uso da película de poliéster, permitindo uma melhor aderência ao microcanal, impedindo possíveis fugas do sangue. Em contrapartida, o método de selagem através da lâmina de vidro, permitiu uma melhor visualização do fluxo sanguíneo, uma vez que se distinguiam bem os glóbulos vermelhos e as suas trajetórias, bem como os limites do microcanal. De salientar que o processo de polimento, ao retirar o excesso de material resultante da microfabricação, também ajudou muito na melhoria da visualização das imagens. Na Figura 64 podem-se ver as diferenças entre a selagem com a película de poliéster e com a lâmina de vidro, nos canais previamente polidos.

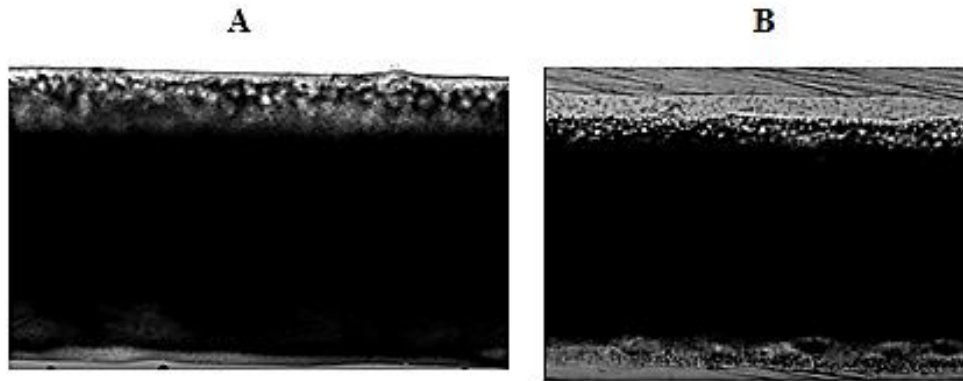


Figura 64 - Escoamento sanguíneo nos microcanais para o caudal de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. A – Selagem com a película de poliéster; B – Selagem com a lâmina.

5.4. Medição da espessura da camada de plasma

Depois de se efetuarem as respectivas medições da espessura da camada de plasma junto às paredes do microcanal, na região depois da estenose, em função do caudal do sangue e do hematócrito, Htc, através do *MtrackJ*, obtiveram-se os seguintes gráficos relativamente aos dois processos de fabrico, litografia suave e laser de CO_2 , conforme a Figura 65 e Figura 66, respetivamente.

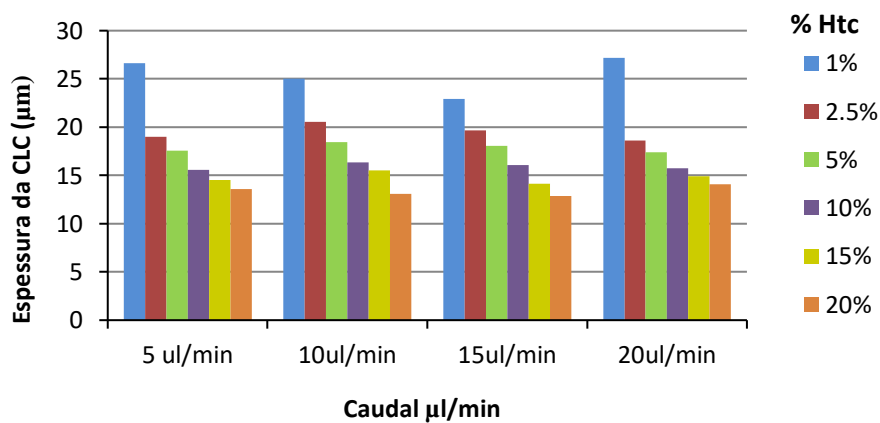


Figura 65 - Medição da espessura da camada de plasma, para vários valores de caudal e hematócritos.

Com a observação da Figura 65, podemos concluir que, com o aumento da percentagem de hematócrito a camada de plasma diminui, aumentando a viscosidade do sangue, o que vai de encontro com os resultados encontrados na literatura. O aumento

do Htc diminuiu a tendência que os GV's possuem em migrarem para o centro do microcanal. O aumento do número de células presentes no escoamento diminui o espaço disponível na zona axial, provocando um aumento da pressão da CLC e a sua subseqüente diminuição.

Quanto à medição da camada de plasma nos microcanais feitos a laser, esta foi efetuada na região da estenose, porque as dimensões da entrada e saída dos microcanais eram grandes e por isso foram desprezadas. Na estenose não se pode afirmar que há uma camada livre de células, mas sim menos células que no resto do canal. Isto acontece, porque apesar da zona de estreitamento ter uma largura menor, mesmo assim as dimensões desta ainda são grandes, logo é difícil verificar uma camada isenta de células. Na Figura 66 estão representados os valores da camada de células existentes, para o canal L2 e L5, com um Htc de 5%.

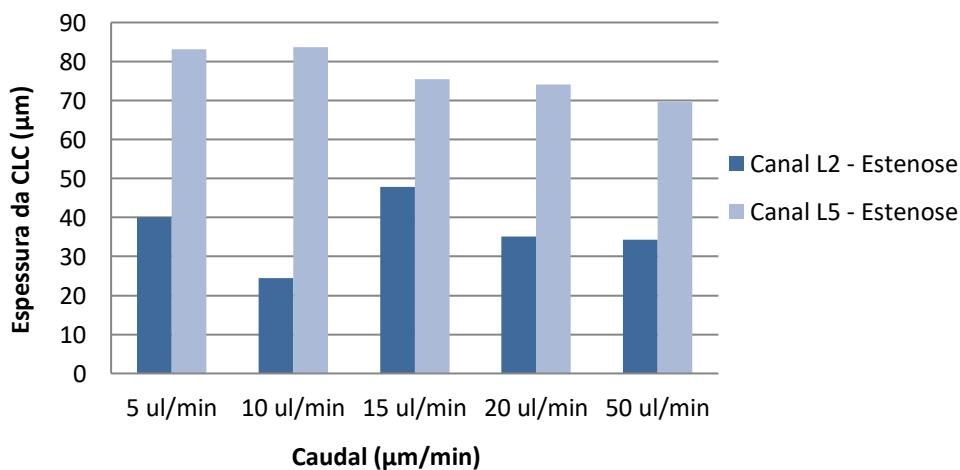


Figura 66 - Espessura da camada de células para o canal L2 e L5, variando o caudal com um Htc de 5%.

Ao visualizar a Figura 66, podemos concluir que a espessura da camada quase livre de células é significativamente maior no microcanal L5, que tem uma maior extensão da região da estenose. Os GV's tendem a ir para o centro do microcanal, aumentando a

espessura que esta camada quase livre de células (existem nesta região alguns GV's junto da parede dos microcanais) ocupa.



Capítulo 6

Conclusões e Trabalhos Futuros

A miniaturização de componentes e sistemas incorporados nos mais diversos ramos de indústria, aplicações médicas e domésticas têm vindo a ser uma realidade nas duas últimas décadas. A evolução constante de técnicas de microfabricação e de materiais tem criado novas aplicações, mais complexas, mais eficazes e mais ambiciosas no que toca à visão do futuro. A massificação destes mini, micro e nanosistemas dependem fortemente da capacidade de replicação dos seus componentes.

O uso de lasers em microfabricação está a crescer rapidamente e a utilização de materiais poliméricos na conceção de dispositivos microfluídicos é uma tendência recente e apresenta vantagens sobre outros materiais, tais como o vidro, silício, quartzo, uma vez que os polímeros têm um custo mais baixo, são mais leves e mais fáceis de fabricar.

O polimetilmetacrilato (PMMA) tem sido um dos polímeros mais usados para a construção de dispositivos microfluídicos. Este possui alta absorvência na zona média do infravermelho, o que o torna particularmente adequado para o laser de CO₂. Por outro lado, possui baixa capacidade térmica e baixa condutividade térmica, o que faz com que toda a energia transferida para o material seja utilizada na vaporização rápida. Possui uma grande rigidez, estabilidade dimensional e resistência aos riscos. O PMMA também oferece alto grau de transparência ótica que o torna perfeitamente adequado para estudos de escoamentos em dispositivos microfluídicos, como neste trabalho.

Este trabalho teve como objetivos principais: a microfabricação a laser de CO₂ de microcanais com estenose, a comparação com o processo de farico por litografia suave, a visualização de escoamento sanguíneo nos microcanais fabricados e a influência da estenose na espessura da camada livre de células.

Com a execução deste trabalho averiguou-se que a microfabricação de canais a laser é um método mais vantajoso em relação aos métodos mais convencionais, como o caso da litografia suave. A litografia suave envolve várias etapas até à criação do microdispositivo, o que envolve sistemas mais caros e aumento dos custos de produção, uma vez que requer salas limpas, a fim de evitar a contaminação. A técnica a laser é um

método rápido, que possui grande versatilidade e rapidez na execução das peças nos mais variados formatos, executando os microcanais à escala micrão em alguns minutos, aumentando, desta forma, a produtividade do processo. Trata-se de uma metodologia de simples operação, a baixo custo. A microfabricação a laser é um processo de remoção de material à base de calor que permite obter uma maior tolerância dimensional. Todas estas características tornam esta técnica uma boa opção para prototipagem rápida.

A desvantagem da microfabricação a laser é que a radiação provoca alterações físicas e/ou químicas nas vizinhanças dos cortes, isto é, há formação de material condensado nas bordas dos canais, podendo dificultar a selagem ou até mesmo inviabilizando-a. Uma das soluções encontradas neste estudo foi o polimento da superfície do microcanal com um disco de lixa de 1000, removendo a maior parte das rebarbas existentes. O processo de polimento dos microcanais juntamente com a selagem destes com a película de poliéster possibilitou um sistema microfluídico funcional. Um aspecto que não foi totalmente conseguido neste trabalho foi a alteração do perfil do rasgo obtido nos microcanais, visto que o corte a laser na maioria dos casos, apresenta um perfil de seção transversal gaussiano, não sendo algo muito flexível neste aspeto. O que se obteve foi uma harmonização entre os valores encontrados.

Os melhores resultados do fabrico dos microcanais pela tecnologia laser usada neste estudo foram *Speed* (0.6), *Power* (1) e *PPI* (200). Valores muito elevados de velocidade tendem a produzir estrias na superfície de corte e rebarbas na parte posterior da superfície atingida pela radiação. Velocidades baixas, por outro lado, produzem um aumento da zona termicamente afetada e um decréscimo na qualidade do corte. Um número elevado de pontos de disparo do laser (*PPI*) também afeta a zona de corte, pois os pontos são tão próximos uns dos outros num determinado espaço que acabam por fundir mais o material nessas zonas. O ideal é correlacionar o *Speed*, *PPI* e *Power*, de modo a obter-se um corte mais perfeito.

Quanto à quantificação da espessura da CLC depois da estenose, nos microcanais obtidos pela técnica de litografia, pode-se concluir que estes apresentavam uma considerável camada de plasma que se distinguia bem, uma vez que as dimensões do canal eram muito pequenas, tendo-se verificado que com o aumento do *Htc* a CLC diminuía. Por outro lado, com os microcanais obtidos pela máquina a laser de CO₂ a visualização do escoamento sanguíneo foi mais difícil, uma vez que as profundidades dos microcanais eram maiores e as estrias criadas pelo fabrico escureceram a imagem. Com o uso da lâmina de vidro como método de selagem, a visualização melhorou

significativamente, conseguindo-se distinguir bem os GV's e, posteriormente, uma maior facilidade nas medições efetuadas, apesar da medição da CLC ser mais difícil em algumas partes do microcanal.

Como a largura dos canais criados a laser era maior, não existiu uma camada isenta de células, mas uma camada com menos células que no restante canal. Desprezou-se a entrada e a saída por causa das dimensões serem grandes e efetuou-se a medição somente na região da estenose. Desta forma, verificou-se que a camada com poucas células junto da parede dos microcanais era maior no canal com uma extensão de estenose maior.

Como trabalhos futuros, sugere-se que se usem diferentes substratos para o corte/gravação a laser, desde que não comprometam a sua funcionalidade. É preciso ter em conta que esses materiais sejam transparentes para uma boa visualização e caracterização do escoamento do sangue nos microcanais.

Num próximo estudo podia-se usar uma máquina a laser de radiofrequência ou de fibra ótica e comparar os resultados com a máquina a laser de CO₂, averiguando qual é a melhor para o fabrico de microcanais. Podem também ser utilizadas lentes diferentes para ver a influência do feixe laser na obtenção dos rasgos.

Uma sugestão também pode ser a medição de rugosidade dos microcanais criados a laser para quantificar e classificar a superfície destes e a sua influência nos escoamentos de sangue e na selagem dos microcanais.

Podem ser criados sistemas microfluídicos mais complexos, por exemplo, um microdispositivo com várias microestenoses e uma estenose mais crítica, usando velocidades e hematócritos diferentes para ser possível entender a influência desses fenómenos na microcirculação.



Bibliografia

- [1] I. Papautsky, T. Ameel e A. B. Frazier, “A review of single-phase flow in microchannels,” *Proceedings of 2001 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition*, p. 9, 16 November 2001.
- [2] J. D. N. Schianti, “Sistemas de microcanais em vidro para aplicações em microfluídica”, Tese de mestrado em Engenharia Elétrica - Microeletrônica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- [3] D. d. C. Mirim, J. R. Berretta, W. d. Rossi e M. Castagnet, “Estudo da tensão residual na soldagem laser entre o aço carbono aisi 1010 e o aço inoxidável aisi 304,” *6º Congresso Brasileiro De Engenharia De Fabricação*, p. 10, 11-15 Abril 2011.
- [4] A. K. Gupta e S. P. Agrawal, “Computational modeling and analysis of the hydrodynamic parameters of blood through stenotic artery”, em *3rd International Conference on Recent Trends in Computing 2015*, Índia, 2015.
- [5] M. Kang, H. S. Ji e K. C. Kim, “In-Vitro investigation of rbc’s flow characteristics and hemodynamic feature through a microchannel with a micro-stenosis”, *International Journal of Biology and Biomedical Engineering*, vol. 2, p. 8, 2008.
- [6] J.M. e Silva, *Conceitos Sobre Hemorreologia e Microcirculação Humanas*, Lisboa, 2012.
- [7] V. O. d. S. e. Silva, “Caracterização microestrutural e reológica de emulsões óleo/água em cisalhamento”, Projecto de Graduação em Engenharia Mecânica, Universidade de Brasília ,Brasília, 2011.

- [8] D. M. M. Sampaio, “caracterização experimental in vitro da camada de plasma em escoamentos de sangue de cavalo no interior de microcanais de secção rectangular, Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica, Técnico de Lisboa,” Lisboa, 2014.
- [9] E. P. Widmaier, H. Raff e K. T. Strang, *Vander's Human Physiology - The Mechanisms of Body Function*, 1221 Avenue of the Americas, New York, NY 10020: Mc Graw Hill, 2014, p. 806.
- [10] F. R. Marinho, “XXI Prêmio Jovem Cientista: Sangue - Fluido da vida,” [Online].Available:
<http://www.ib.usp.br/microgene/index.php?pagina=biblioteca>. [Acedido em 17 Fevereiro 2016].
- [11] D. A. M. Lopes, “Caracterização experimental da dinâmica e da organização celular de escoamentos estacionários de sangue animal em microcanais rectos”, Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica, Técnico de Lisboa, Lisboa, 2012.
- [12] B. C. d. S. Pires, “Conceção de um dispositivo de micro-cromatografia hidrodinâmica para separação de células sanguíneas e visualização do mecanismo de separação”, Tese de Mestrado em Tecnologia Biomédica, IPB - ESTiG, Bragança, 2012.
- [13] Universidade de Cuiabá - Núcleo de disciplinas integradas (Disciplina de Ciências Morfofuncionais IV), *Sangue e Hematopoes*.
- [14] “Circulatory System & Cardiothoracics,” [Online]. Available:
<http://seattlegraceinterning.weebly.com/circulatory-system.html>. [Acedido em 11 Janeiro 2016].

-
- [15] L. M. E. Pimparel, “Escoamento de células sanguíneas em redes microcapilares”, Tese de Mestrado em Engenharia Química, IPB - ESTiG, Bragança, 2012.
- [16] A. C. Guyton e Hall, Tratado de Fisiologia Médica, Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- [17] P. C. J. Aleksander S. Popel, “Microcirculation and Hemorheology,” *Fluids Mechanics*, pp. 43-65, 2005.
- [18] N. Bumseok, “Rheological aspect of cell-free layer formation in micro-blood flow : experimental and numerical study”, Tese de Mestrado em Psicologia - Departamento de Bioengenharia, ” singapore, 2012.
- [19] S. Kim, P. K. Ong, O. Yalcin, M. Intaglietta e P. C. Johnson, “The cell-free layer in microvascular blood flow”, *Biorheology* , pp. 181-189, 27 January 2009.
- [20] B. Namgung, L. H. Liang e S. Kim, “Physiological significance of cell-free layer and experimental determination of its width in microcirculatory vessels”, pp. 75-87, 2014.
- [21] S. C. R. Novais, “Desenvolvimento de um microdispositivo biomédico para a separação e deformação de eritrócitos”, Tese de Mestrado em Tecnologia Biomédica, IPB - ESTiG,” Bragança, 2012.
- [22] F. M. T. Cerdeira, R. Lima, M. Oliveira, Y. I. T. Ishikawa e T. Yamaguchi, “Determination of the cell-free layer in circular PDMS microchannels,” COMPUTATIONAL VISION AND MEDICAL IMAGING PROCESSING VIP Image 2009, FEUP, Porto.

- [23] S. Doddi, “Three-dimensional computational modeling and simulation of biological cells and capsules”, Dissertação de Doutoramento em Psicologia - Programa de Engenharia Mecânica e Aeroespacial, Universidade Estadual de New Jersey, New Jersey, 2008.
- [24] R. Lima, T. Ishikawa, Y. Imai, T. Yamaguchi, "Blood Flow Behavior in Microchannels: Past, Current and Future Trends". In: Dias et al., Single and two-Phase Flows on Chemical and Biomedical Engineering. Bentham Science; 513-547, 2012.
- [25] B. Grobelnik, “Blood Flow”, Liubliana, apontamentos, 2008.
- [26] P. J. Oliveira, “Biotransporte: noções básicas de mecânica dos fluidos e de fluidos não newtonianos – Parte II”, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2010.
- [27] S. Rosa, Sebenta teórica de biofluidos, IPB - ESTiG, Bragança, 2010.
- [28] Silva, J. M., “Conceitos sobre hemorreologia e microcirculação humanas”, Tema 8- Fluxo Sanguíneo: Boletim da SPHM, Lisboa, 2013. Vol. 28.
- [29] Silva, J. M., “Conceitos sobre hemorreologia e microcirculação humanas”, Tema 7- Hemorreologia: Conceitos Biofísicos: Boletim Da Sphm, Lisboa, 2013. Vol. 28.
- [30] Alunos de Farmácia, “Minha ciência é farmacêutica,” 2009. [Online].Available: <http://minhacienciaefarmaceutica.blogspot.pt/2009/10/reologia-noco-es-basicas.html>. [Acedido em 24 Março 2016].
- [31] A. B. Steudner, “Estudo da viscosidade do sangue: quantidade de amostra necessária à obtenção da medida”, Trabalho de Conclusão de Curso para

obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, unesp - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, Brasil, 2012.

- [32] Fineartamerica, “Rouleaux Blood Cells Ar”, [Online]. Available: <http://images.fineartamerica.com/images-medium-large/coloured-sem-of-red-blood-cells-rouleau-formation-power-and-syred.jpg>. [Acedido em 18 Fevereiro 2016].
- [33] Y. Kim, K. Kim e Y. Park, “Measurement techniques for red blood cell deformability: recent advances”, *INTECH*, 21 Setembro 2012.
- [34] P. J. Oliveira, Viscosidade do Sangue (apontamentos), Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2009.
- [35] J. A. C. Calejo, “Desenvolvimento de fluidos bifásicos análogos ao sangue: estudo reológico, escoamento em microcanais e simulações numéricas”, Tese em Tecnologia Biomédica, IPB - ESTiG, Bragança, 2013.
- [36] L. Jain, “Modelling and analysis of blood flow in an artery having mild stenosis with and without bypass: effects of blood and wall characteristics”, Tese de Doutoramento em Filosofia em Matemática, Instituto Educacional Dayalbagh, Índia, 2012.
- [37] J. P. CABEZAS, “Medicina biológico-naturista,” [Online]. Available: <http://jaimepachecocabezas.blogspot.pt/2015/07/1a-terapia-de-quelacion-laterapia-de.html>. [Acedido em 28 Março 2016].
- [38] MAYFIELD - Brain & Spine, “MAYFIELD - Brain & Spine,” [Online]. Available: http://www.mayfieldclinic.com/HT_brain.htm. [Acedido em 28 Março 2016].

- [39] J. Sloan, “Axillobifemoral bypass graft occlusion”, 15 Agosto 2008. [Online]. Available: <https://www.mypacs.net/cases/17359006.html>. [Acedido em 22 Maio 2016].
- [40] E. I. Galanzha e V. P. Zharov, “Photoacoustic and photothermal cytometry for monitoring multiple blood rheology parameters in vivo,” *PubMed Central® (PMC)*, vol. 79A, n.º 10, p. 746–757, October 2011.
- [41] T. T. d. Oliveira, “Mecânica dos Fluidos aplicada a escoamento do sangue”, em *16º Posmec - Simpósio de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica*, Uberlândia - Brasil, 2006”.
- [42] D. Pinho, R. O. Rodrigues, T. Yaginuma, V. Faustino, D. Bento, C. S. Fernandes, V. Garcia, A. I. Pereira, R. Lima, “Motion of rigid particles flowing in a microfluidic device with a pronounced stenosis: trajectories and deformation index”, 11th World Congress on Computational Mechanics, Barcelona, 2014.
- [43] M. Kang, H. S. Ji e K. C. Kim, “In-vitro investigation of RBCs’ flow characteristics and hemodynamic feature through a microchannel with a micro-stenosis”, *International Journal of Biology and Biomedical Engineering*, vol. 2, p. 8, 2008.
- [44] R. Lima, T. Ishikawa, Y. Imai, M. Takeda, S. Wada, T. Yamaguchi, “Measurement of individual red blood cell motions under high hematocrit conditions using a confocal micro-ptv system,” *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 37, pp. 1546-59, 2009.
- [45] Fujiwara H, Ishikawa T, Lima R, Marsuki N, Imai Y, Kaji H, Nishizawa M, Yamaguchi T. “Red blood cell motions in a high hematocrit blood flowing

- through a stenosed micro-channel” *Journal of Biomechanics* 42, 838-843, 2009.
- [46] H. Fujiwara, T. Ishikawa, R. Lima, H. Kaji, N. Matsuki, Y. Imai, M. Nishizawa e T. Yamaguchi, “Observation of the blood flow in microchannel with stenosis by confocal-micro-PIV”, em *Third Asian Pacific Conference on Biomechanics*, Tokyo, 2007.
- [47] R. D. Conrado, “Efeitos do corte por laser sobre a integridade superficial de um aço médio carbono”, Dissertação de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, UCS, Caxias do Sul, 2014.
- [48] M. E. R. D. Silva, “Instalação, teste e lançamento em exploração de equipamento de corte por laser”, Projecto Final em Engenharia Mecânica, FEUP, Porto, Julho 2008.
- [49] “Ciências no Século XXI,” WordPress.com , 8 Setembro 2013. [Online]. Available: <https://cienciasnoseculoxxi.wordpress.com/category/fisica/>. [Acedido em 23 Junho 2016].
- [50] A. B. azouz, “Microfluidic device prototyping via laser processing of glass and polymer materials”, Tese de Doutoramento em Filosofia, Escola de Engenharia Mecânica e de Fabrico, Dublin, October 2013.
- [51] E. T. d. Costa, “Processo de fabricação de mini e microdispositivos fluídicos por ablação a laser de dióxido de carbono”, Tese de Mestrado em Química Analítica, ” São Paulo, 2009.
- [52] T. M. C. C. d. B. e. Faro, “Estudo e optimização do corte laser de alta velocidade em chapa metálica fina”, Tese de Mestrado em Engenharia Mecânica, FEUP, ” Porto, Junho de 2006.

- [53] R. M.C., “Brief introduction to lasers and applications: scientific approach”, *Research Journal of Material Sciences*, vol. 1, pp. 20-24, 2013.
- [54] L. V. A. A. M. Anza, “Lasers e espectroscopia de fotoelétrons”, Tese de Mestrado em Química - Departamento de Ciências Naturais e Matemática, ” Nampula, 2015.
- [55] A. B. Bartz, D. I. d. Silva, T. W. d. Figueredo e C. B. Spohr, “Processo de corte em máquinas laser,” em *SIEF – Semana Internacional das Engenharias da FAHOR*, Horizontina.
- [56] T.-F. Hong, W.-J. Ju, M.-C. Wu, C.-H. Tai, C.-H. Tsai e L.-M. Fu, “rapid prototyping of PMMA microfluidic chips utilizing a CO₂ laser,” *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 9, n.º 6, p. 1125–1133, 2010.
- [57] KantRishi, G. Ankur e B. S., “Studies on CO₂ laser micromachining on PMMA to fabricate micro channel for microfluidic applications”, em *5th International & 26th All India Manufacturing Technology, Design and Research Conference*, India, 2014.
- [58] S. Prakash e S. Kumar, “Energy based analysis of laser microchanneling process on polymethyl methacrylate (PMMA)”, em *5th International & 26th All India Manufacturing Technology, Design and Research Conference*, India, 2014.
- [59] L. M. Machado, R. E. Samad, A. Z. de Freitas, J. T. Vidal, M. L. M. Vieira, R. E. Samad, A. Z. de Freitas, J. T. Vidal, M. L. M. Vieira e R. E. Samad, “Usinagem de microcanais com laser de femtossegundos para uso em microfluídica”, em *6º Congresso Brasileiro de Engenharia de Fabricação*, Caxias do Sul, Brasil, 2011.

- [60] A. Webster, J. Greenman e S. J. Haswell, “Development of microfluidic devices for biomedical and clinical application”, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 86, n.º 1, 2010.
- [61] C. A. R. Dantas, “Fabricação de dispositivos para aplicação de conceitos de microfluídica a uma “Língua Eletrônica”, Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, Sorocaba, 2013.
- [62] M. Abkarian, M. Faivre, R. Horton, K. Smistrup e C. A. B.-P. a. H. A. Stone, “Cellular-scale hydrodynamics,” *Biomedical Materials* , vol. 3, n.º 3, 2008.
- [63] [Online].Available:<http://previews.123rf.com/images/frenta/frenta1504/frenta150400015/39001828-Process-division-of-cell-Isolated-on-black-background-Stock-Photo.jpg>. [Acedido em 3 Fevereiro 2016].
- [64] shotsstudio,[Online].Available: <http://pt.depositphotos.com/27703321/stock-photo-scientific-research.html>. [Acedido em 3 Fevereiro 2016].
- [65] “Scientific Dna Wallpapers 2015,” wallpapercave, 2015. [Online]. Available:<http://wallpapercave.com/scientific-dna-wallpapers-2015>. [Acedido em 3 Fevereiro 2016].
- [66] “Pipeline,”Ziel Biosciences, [Online].Available: <http://www.zielbiosciences.com/pipeline.php>. [Acedido em 3 Fevereiro 2016].
- [67] “As Indústrias e o Meio Ambiente,” 2011. [Online]. Available: <http://meioambiente.culturamix.com/desenvolvimento-sustentavel/as-industrias-e-o-meio-ambiente>. [Acedido em 3 Fevereiro 2016].

- [68] Irochka, Depositphotos, 2011. [Online]. Available: <http://pt.depositphotos.com/5121216/stock-photo-assorted-laboratory-glassware-equipment.html>. [Acedido em 3 Fevereiro 2016].
- [69] D. Hill, “Positive,” 9 Março 2009. [Online]. Available: <http://www.uv.es/positive/loc.html>. [Acedido em 3 Fevereiro 2016].
- [70] M. Aurélio, “Medicamentos,” MarcoAurélio ADDED - Tratamento não invasivo para coluna, [Online]. Available: <http://marcoadded.com.br/tag/medicamentos/>. [Acedido em 3 Fevereiro 2016].
- [71] X. Han, “Development of microfabrication process for micro inductive sensors”, Tese de Mestrado em Ciências da Engenharia, Universidade de Western Ontario, London, Canada, 2013.
- [72] A. Ovsianikov e B. Chichkov, “Three-dimensional microfabrication by two-photon polymerization technique”, *Methods in molecular biology*, vol. 868, pp. 311-25 , 2012.
- [73] A. C. C. Vaz, “Desenvolvimento de um Biossensor de adn integrado num chip de microfluídica”, Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2012.
- [74] Nano-Optics Group - Joachim R. Krenn, “Nano-Optics Graz Methods - Electron Beam Lithography,” [Online]. Available: <http://nanooptics.uni-graz.at/>. [Acedido em 16 Abril 2016]
- [75] G. N. d. Santos, “Fabricação de dispositivos microfluidicos por fotolitografia e projeto de fotoexpositora de luz pontual”, Projeto Final em Engenharia Mecânica, Rio de Janeiro, 2013.

- [76] A. He, “A Brief Analysis on the Working Principles and Categories of the CO₂ laser,” 12 Outubro 2015. [Online]. Available: <https://www.linkedin.com/pulse/brief-analysis-working-principles-categories-co2-laser-apple-he>. [Acedido em 20 Abril 2016].
- [77] GCC Laser Pro, *GCC Laser Pro X252 - User Manual*, Taiwan.
- [78] A. Zicatto, F. Girardi, F. Rigoni, L. Tonin e M. O. Skowronski, “Processos de usinagem a laser e feixe de elétrons”, Tese de Mestrado em Engenharia Mecânica, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2013.
- [79] L. I. d. P. Cargo, “Oficina da Net,” 17 Fevereiro 2010. [Online]. Available: https://www.oficinadanet.com.br/artigo/ciencia/como_funciona_laser. [Acedido em 5 Junho 2016].
- [80] J. C. Rico, “Interempresas net - Metalmecânica,” 1 Fevereiro 2003. [Online]. Available: <http://www.interempresas.net/MetalMecanica/Articulos/12110-Tecnologias-de-corte-de-chapa.html>. [Acedido em 29 Março 2016].
- [81] W. C. d. Araújo, “Processo de Usinagem”, Tese de Mestrado em Engenharia Metalúrgica, Fesurv, Rio Verde, 2011.
- [82] Engraver&Lexno, “Corte a laser: Entenda o que ocorre dentro da máquina.,” [Online]. Available: <http://engraver.com.br/como-funciona-uma-maquina-de-corte-a-laser/>. [Acedido em 8 Abril 2016].
- [83] P. G. M. Acúrcio, “Estágio na Novotecna – Associação para o Desenvolvimento Tecnológico”, Tese de mestrado em Engenharia

Eletrotécnica – Controlo e Eletrónica industrial, IPT - Instituto Politécnico de Tomar, Tomar, Setembro de 2015.

- [84] Á. Vieira, K. Sossai, R. Micaela, M. Tonon, V. Vescovi e R. Valle, “Polimetilmetacrilato”, *Educação e Tecnologia*, 2006.
- [85] V. S. d. S. Sousa, “Processo de fabricação de acrílico”, Tese de Mestrado em Tecnologia em Automação Industrial, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Salvador, 2012.



Anexos

Nesta secção vão ser apresentados todos os rasgos inicialmente testados com os diferentes parâmetros e depois as geometrias dos canais estenosados, criados pela técnica de laser de CO₂ usada neste estudo.

- **Variação do *Power1* - *Speed* (0.4)**

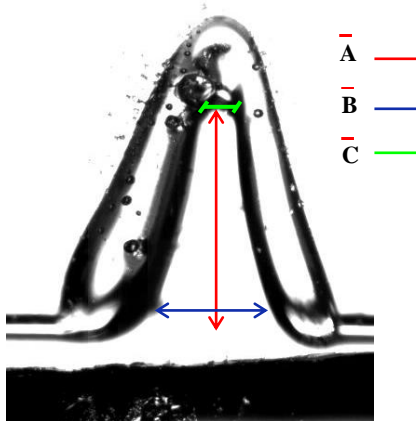


Figura 1 - *Power* (1). A - 1016.667 μm ; B - 591.438 μm ;
C - 141.613 μm .

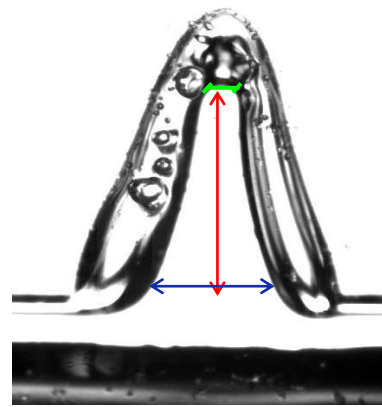


Figura 2 - *Power* (2). A - 1216.667 μm ; B - 754.167 μm ;
C - 141.612 μm .

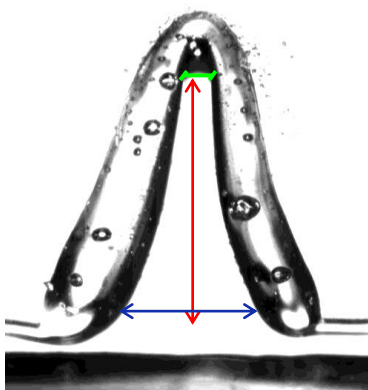


Figura 3 - *Power* (3). A - 1666.667 μm ; B - 883.334 μm ;
C - 166.602 μm .

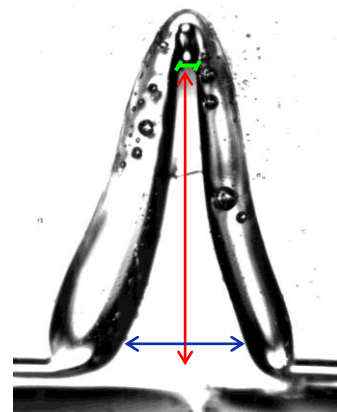


Figura 4 - *Power* (4). A - 1938.889 μm ; B - 907.983 μm ;
C - 133.282 μm .

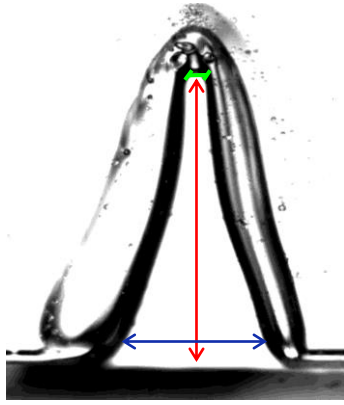


Figura 5 - Power (6). **A** - 2408.333 μm ; **B** - 991.284 μm ;
C - 141.612 μm .

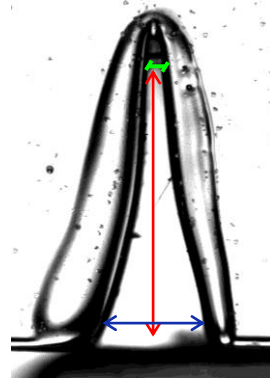


Figura 6 - Power (7). **A** - 2725 μm ; **B** - 996294 μm ;
 μm ; **C** - 133.282 μm .

- **Variação do *Power2 – Speed (0.4)***

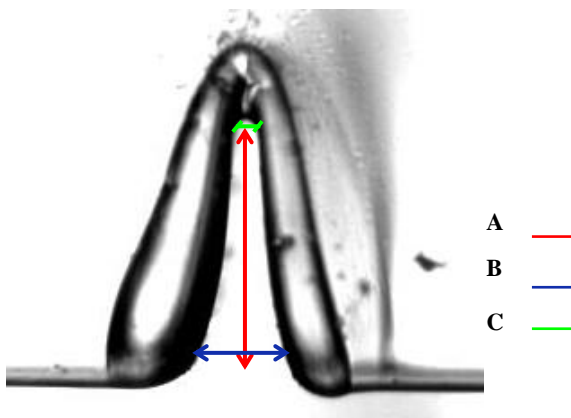


Figura 1 - Power (2). A - 931.250 μm ; B - 325.490 μm ; C - 74.510 μm .

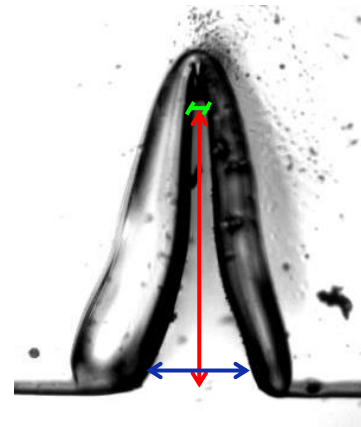


Figura 2 - Power (5). A - 1537.500 μm ; B - 535.294 μm ; C - 70.588 μm .

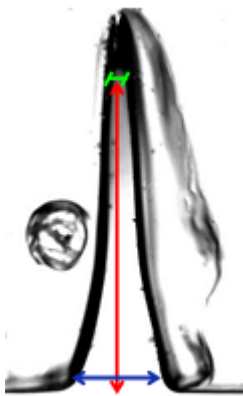


Figura 3 - Power (10). A - 2475 μm ; B - 572.549 μm ; C - 86.275 μm .



Figura 4 - Power (15). A - 3862.500 μm ; B - 555.863 μm ; C - 70.588 μm .



Figura 5 - Power (20). A - 4637.500 μm ; B - 976.471 μm ; C - 458.823 μm .

- **Variação do Speed - Power (2); PPI (400).**

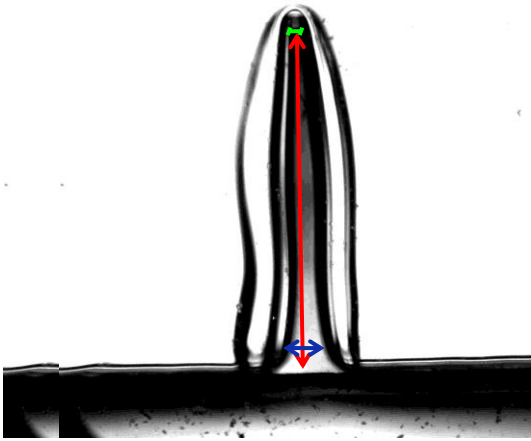


Figura 1 - Speed (0.1). A - 1598.23 μm ; B - 263.158 μm ;
C - 41.025 μm .

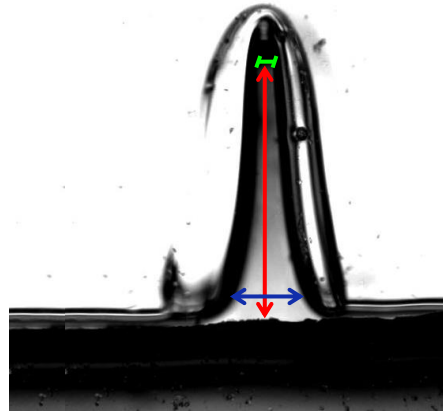


Figura 2 - Speed (0.2). A - 825.664 μm ; B - 342.105 μm ;
C - 55.264 μm ;

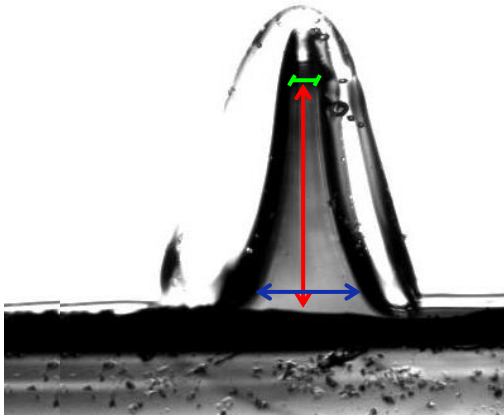


Figura 3 - Speed (0.3). A - 520.354 μm ; B - 257.895 μm ;
C - 60.527 μm .

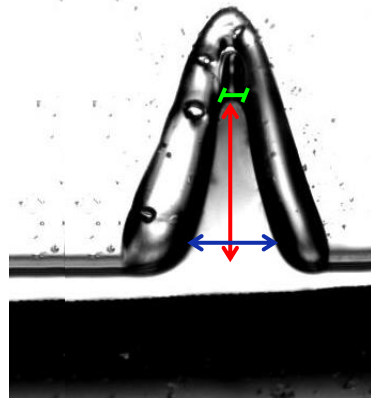


Figura 4 - Speed (0.4). A - 398.23 μm B - 284.211 μm ;
C - 54.386 μm .

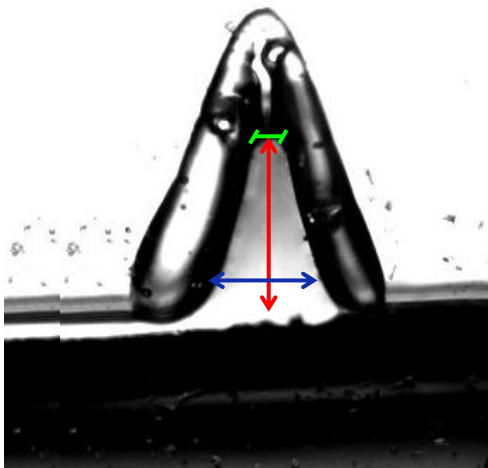


Figura 5 - Speed (0.5). A - 329.204 μm ; B - 263.158 μm ;
C - 50 μm .

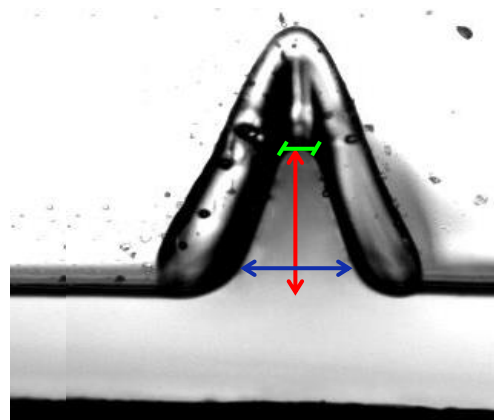


Figura 6 - Speed (0.6). A - 277.876 μm ; B - 255.263 μm ;
C - 52.631 μm .

- **Variação do PPI – *Speed* (0.4); *Power* (2).**

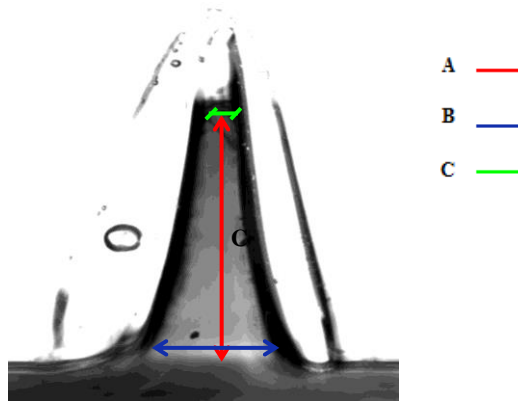


Figura 1 - PPI (500). A - 772.881 μ m; B - 332.241 μ m;
C - 80.874 μ m.

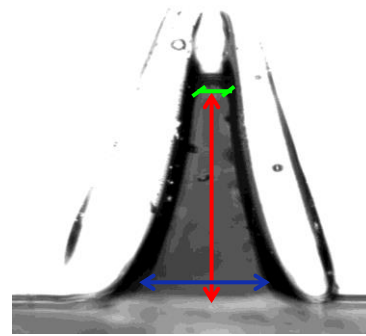


Figura 2 - PPI (600). A - 718.644 μ m; B - 371.584 μ m;
C - 83.061 μ m.

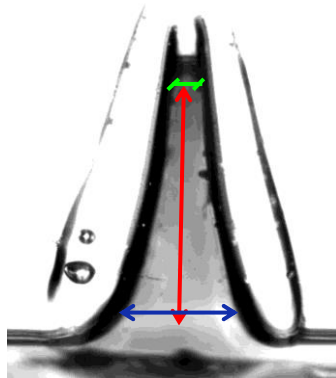


Figura 3 - PPI (700). A - 742.373 μ m; B - 426.229 μ m;
C - 96.175 μ m.

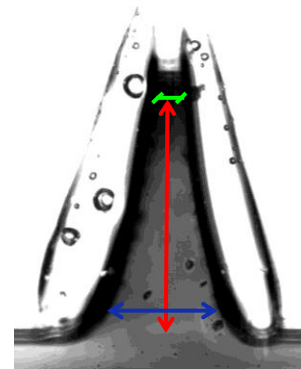


Figura 4 - PPI (800). A - 762.712 μ m; B - 417.486 μ m;
C - 100.547 μ m.

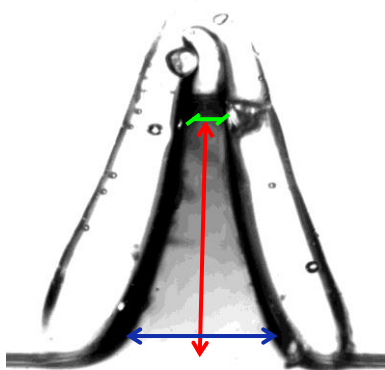


Figura 5 - PPI (900). A - 732.203 μ m; B - 397.814 μ m;
C - 89.617 μ m.

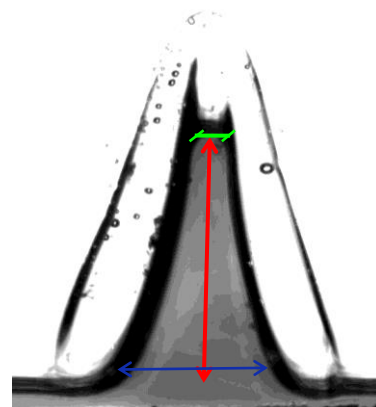


Figura 6 - PPI (1000). A - 691.525 μ m; B - 417.486 μ m;
C - 91.803 μ m.

• **Variação do Power1 - Speed (0.4)**

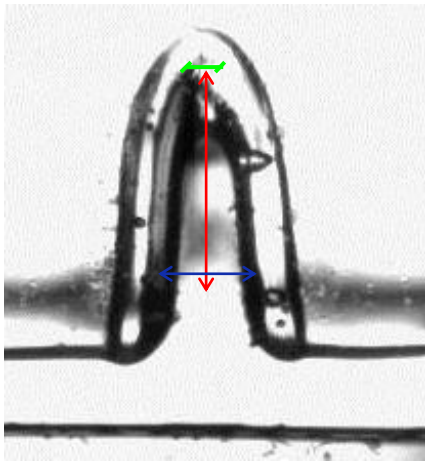


Figura 1 - Power (1). A- 611.765 μm ; B - 294.118 μm ;
C - 117.647 μm .

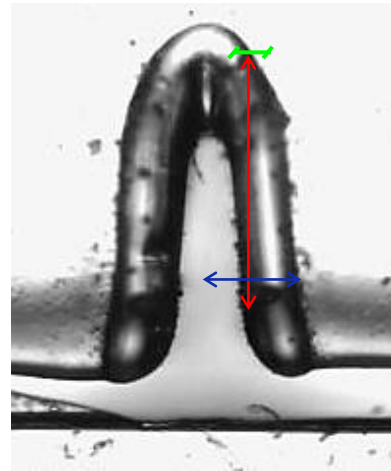


Figura 2 - Power (2). A- 700.025 μm ; B- 317.647 μm ;
C - 105.882 μm .

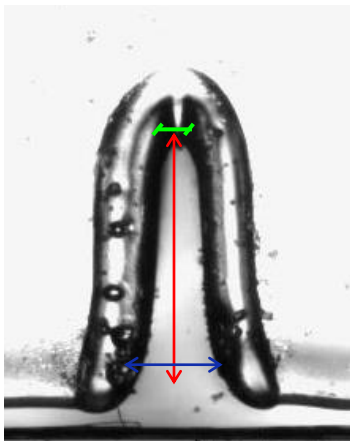


Figura 3 - Power (3). A - 952.941 μm ; B - 388.236 μm ;
C - 100 μm .

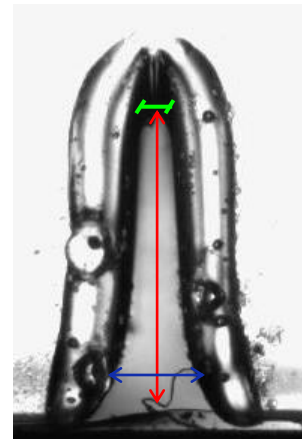


Figura 4 - Power (4). A- 1164.706 μm ; B- 435.294 μm ;
C - 117.647 μm .

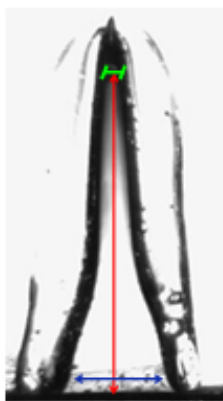


Figura 5 - Power (6). A - 1711.765 μm ; B - 558.824 μm ;
C - 105.882 μm .

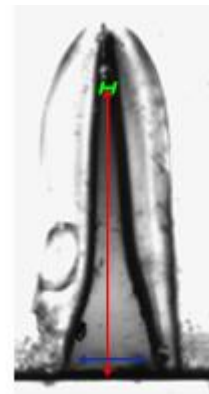


Figura 6 - Power (7). A - 1829.412 μm ; B - 564.706 μm ;
C - 76.47 μm .

• **Variação do *Power2 – Speed* (0.4)**

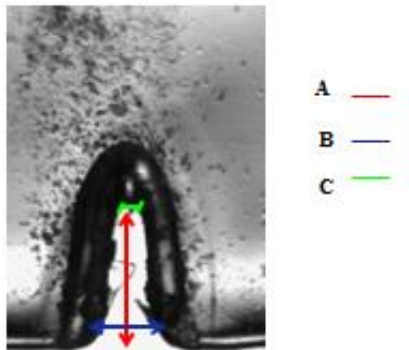


Figura 1 - *Power* (2). A - 664.706 μm ; B - 305.882 μm ;
C - 117.647 μm .

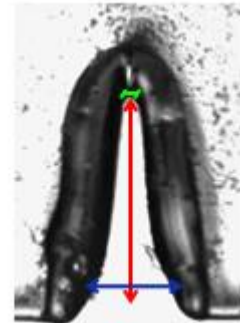


Figura 2 - *Power* (5). A - 1149.02 μm ; B - 525.49 μm ;
C - 101.961 μm .



Figura 3 - *Power* (10). A - 2180.392; B - 588.235
 μm ; C - 86.274 μm .



Figura 3 - *Power* (15). A - 3184.314 μm ; B - 635.294
 μm ; C - 78.432 μm .

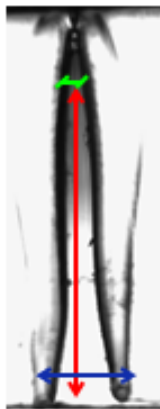


Figura 5 - *Power* (20). A - 3874.51 μm ; B - 623.53 μm ;
C - 141.177 μm .

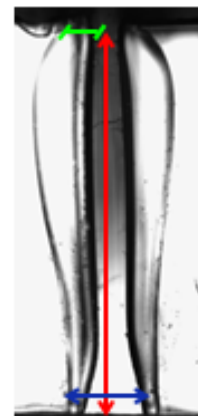


Figura 6 - *Power* (25). A - 4376.471 μm ; B - 635.294
 μm ; C - 294.118 μm .

• **Variação do *Speed - Power (2); PPI (400)***

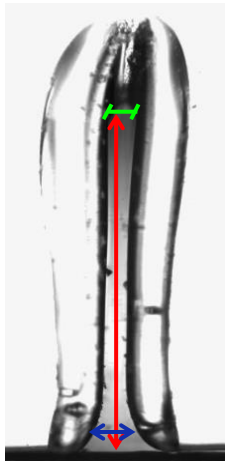


Figura 1 - *Speed (0.1)*. A - 1933.333 μm ; B - 241.096 μm ;
C - 109.589 μm .

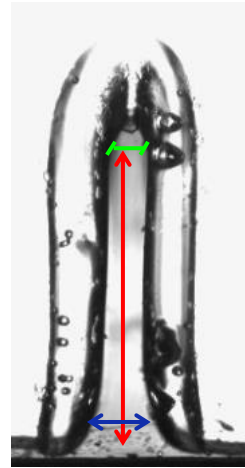


Figura 2 - *Speed (0.2)*. A - 1105.556 μm ; B - 257.534 μm ;
C - 131.506 μm ;

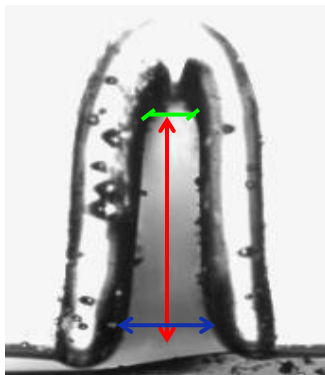


Figura 3 - *Speed (0.3)*. A - 786.111 μm ; B - 268.493 μm ;
C - 120.548 μm .

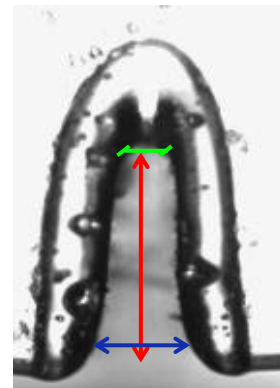


Figura 4 - *Speed (0.4)*. A - 616.667 μm B - 284.931 μm ;
C - 136.986 μm .

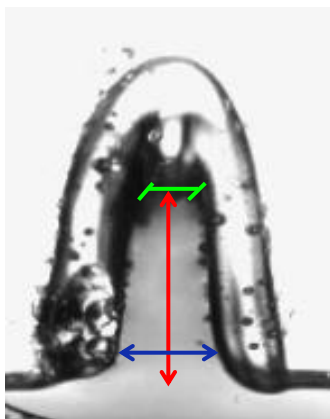


Figura 5 - *Speed (0.5)*. A - 404.167 μm ; B - 241.096 μm ;
C - 142.466 μm .

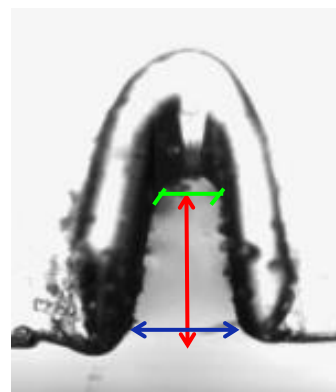


Figura 6 - *Speed (0.6)*. A - 383.333 μm ; B - 258.904 μm ;
C - 139.726 μm .

- **Variação do PPI – *Speed* (0.4); *Power* (2)**

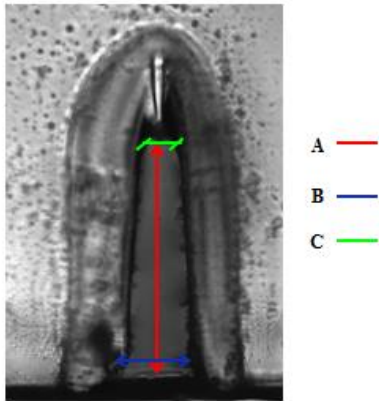


Figura 1 - PPI (500). A - 724.996 μm ; B - 227.273 μm ;
C - 90.909 μm .

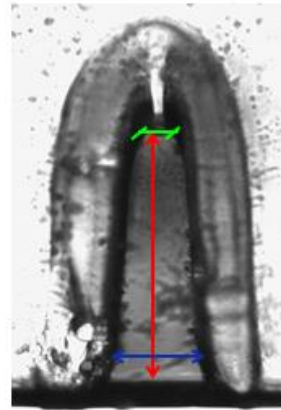


Figura 2 - PPI (600). A - 672.723 μm ; B - 247.727 μm ;
C - 95.454 μm .

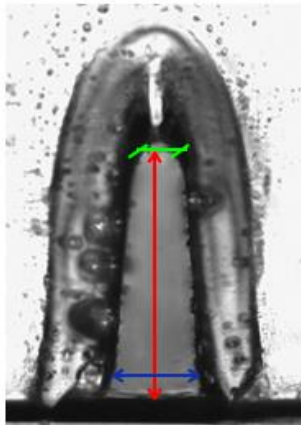


Figura 3 - PPI (700). A - 656.814 μm ; B - 243.181 μm ;
C - 84.091 μm .

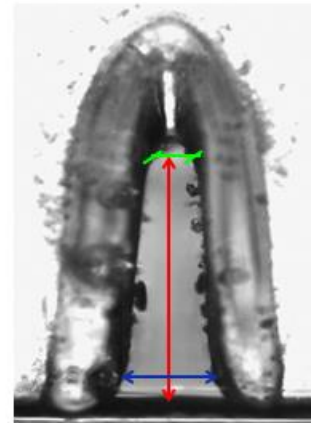


Figura 4 - PPI (800). A - 640.905 μm ; B - 265.909 μm ;
C - 93.182 μm .

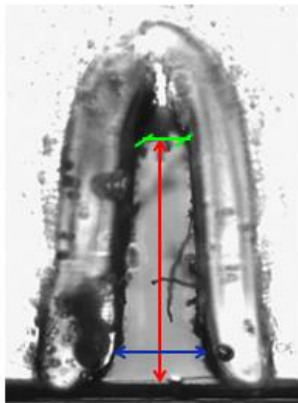


Figura 5 - PPI (900). A - 654.542 μm ; B - 281.818 μm ;
C - 120.454 μm .

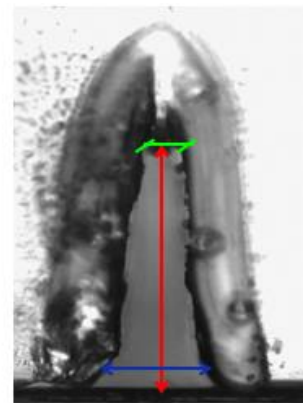
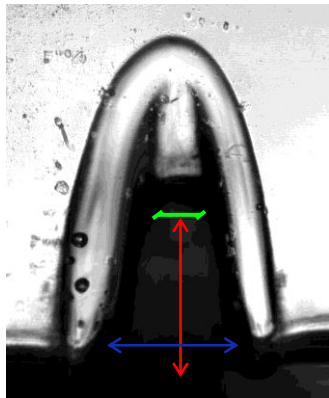


Figura 6 - PPI (1000). A - 706.814 μm ; B - 295.453 μm ;
C - 75 μm .

• **Variação do PPI - *Speed* (0.6); *Power* (1)**



A —
B —
C —

Figura 1 - PPI (500). **A**- 388.506 μm ; **B** - 319.541 μm ;
C- 156.322 μm .

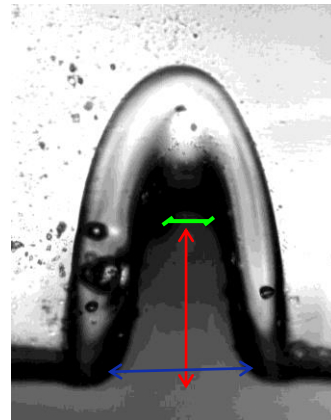


Figura 2 - PPI (400). **A**- 393.103 μm ; **B** - 328.736 μm ;
C- 151.724 μm .

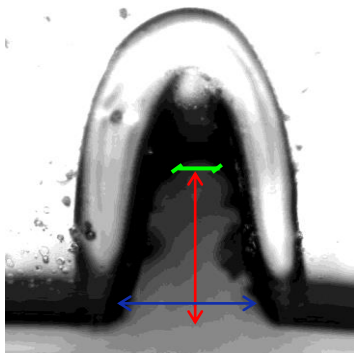


Figura 3 - PPI (300). **A**- 370.115 μm ; **B** - 331.034 μm ;
C- 163.219 μm .

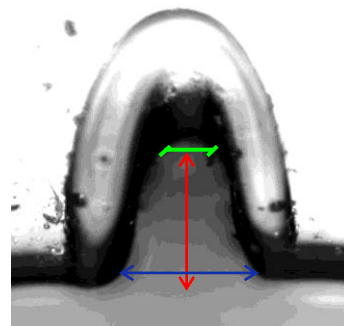


Figura 4 - PPI (200). **A**- 390.805 μm ; **B** - 321.839 μm ;
C- 179.31 μm .

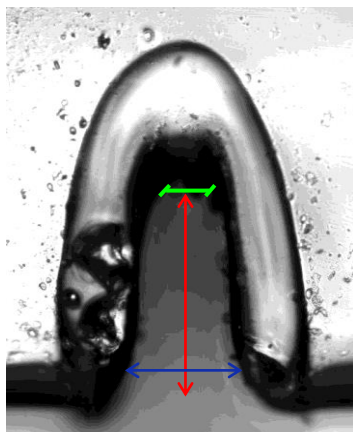


Figura 5 - PPI (100). **A**- 524.138 μm ; **B** - 317.241 μm ;
C- 158.621 μm .

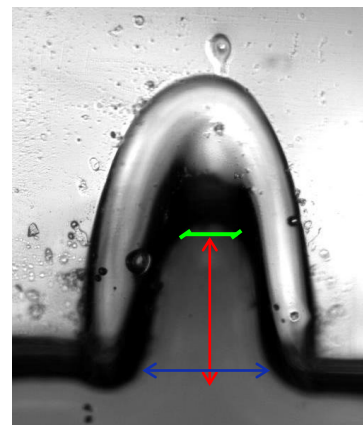


Figura 6 - PPI (50). **A**- 379.310 μm ; **B** - 319.54 μm ; **C**-
165.518 μm .

- **Variação do PPI - *Speed* (0.6); *Power* (2)**

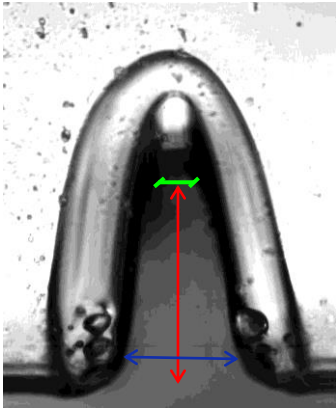


Figura 1 - PPI (500). A- 496.552 μm ; B - 287.356 μm ; C- 103.448 μm .

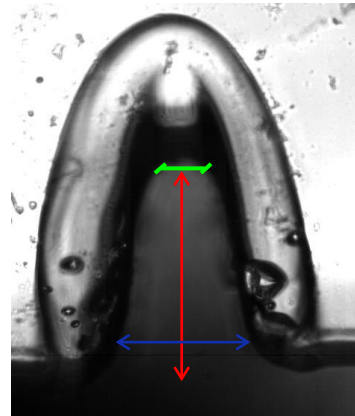


Figura 2 - PPI (400). A- 491.954 μm ; B - 379.31 μm ; C- 158.621 μm .

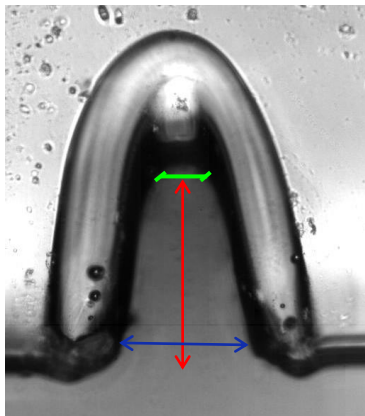


Figura 3 - PPI (300). A- 468.966 μm ; B - 296.552 μm ; C- 137.931 μm .

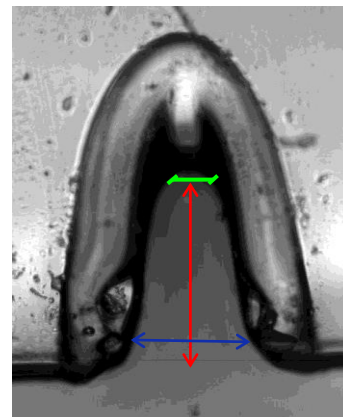


Figura 4 - PPI (200). A- 466.667 μm ; B - 296.552 μm ; C- 140.23 μm .

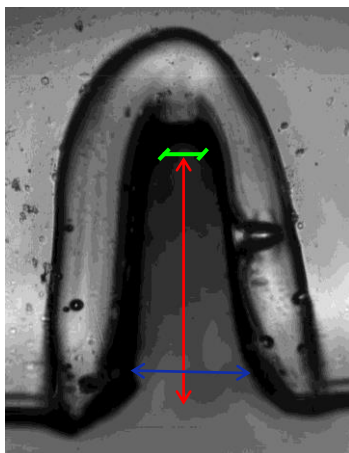


Figura 5 - PPI (100). A- 648.276 μm ; B - 305.747 μm ; C- 126.436 μm .

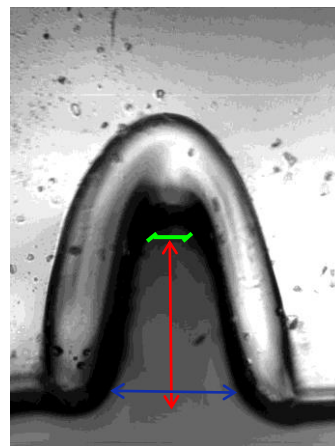


Figura 6 - PPI (50). A- 402.299 μm ; B - 363.219 μm ; C- 103.448 μm .

- **Variação do *Speed* - *Power* (1); PPI (100)**

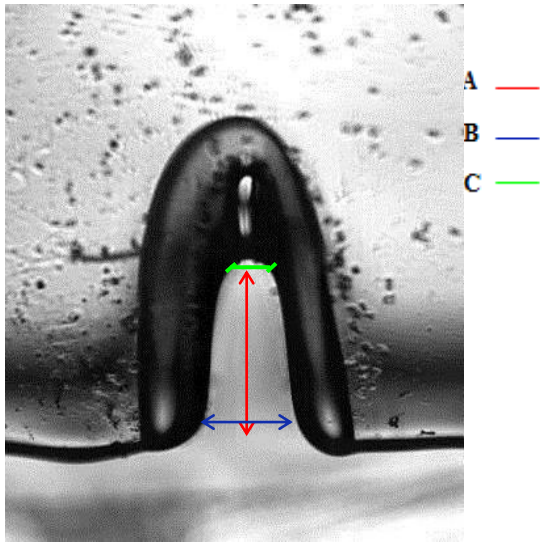


Figura 1 - *Speed* (0.4). **A** - 583.333 μm ; **B** - 312.5 μm ; **C** - 125 μm .

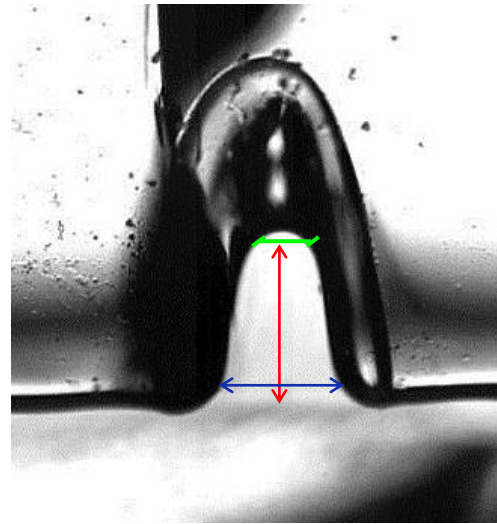


Figura 2 - *Speed* (0.5). **A** - 479.167 μm ; **B** - 354.167 μm ; **C** - 166.667 μm .

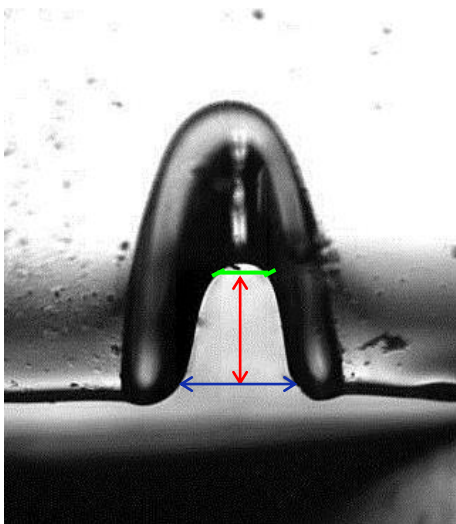


Figura 3 - *Speed* (0.6). **A** - 400 μm ; **B** - 329.167 μm ; **C** - 158.333 μm .

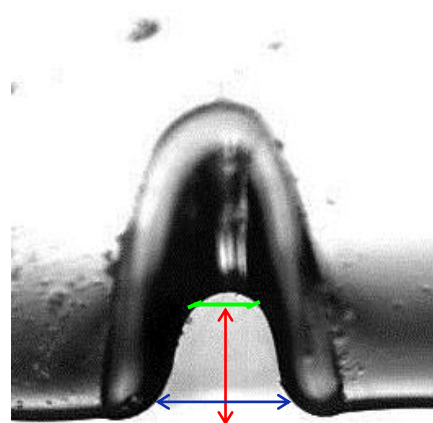


Figura 4 - *Speed* (0.7). **A** - 300 μm ; **B** - 329.167 μm ; **C** - 179.167 μm .

- Canais com estenose (vista superior)

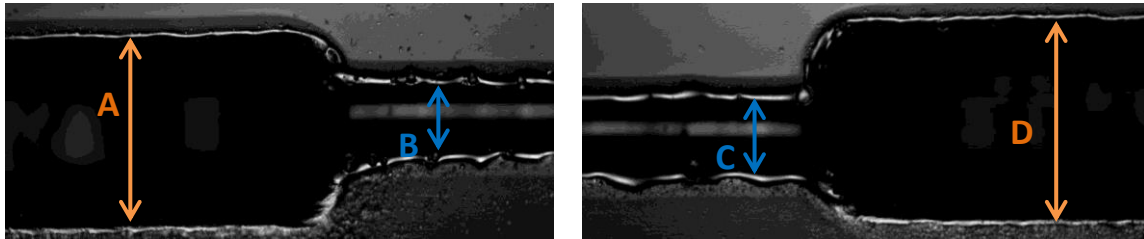


Figura 1 - *Speed* (0.5); *Power* (2); PPI (400). **A** - 1261.111 μm ; **B** - 516.667 μm ; **C** - 511.111 μm ; **D** - 1294.444 μm .

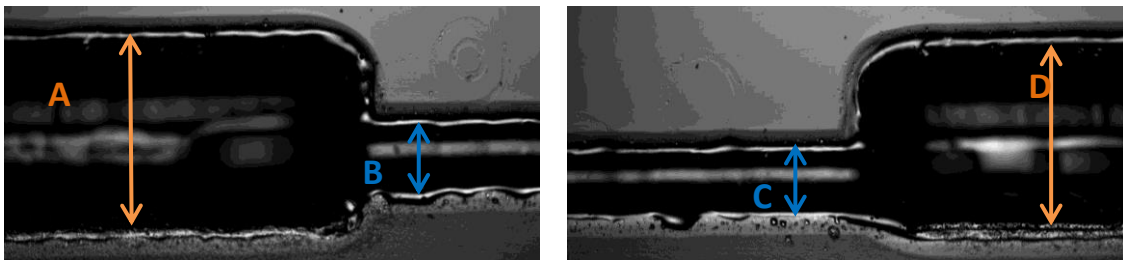


Figura 2 - *Speed* (0.6); *Power* (1); PPI (200). **A** - 1277.778 μm ; **B** - 444.444 μm ; **C** - 455.556 μm ; **D** - 1327.789 μm .

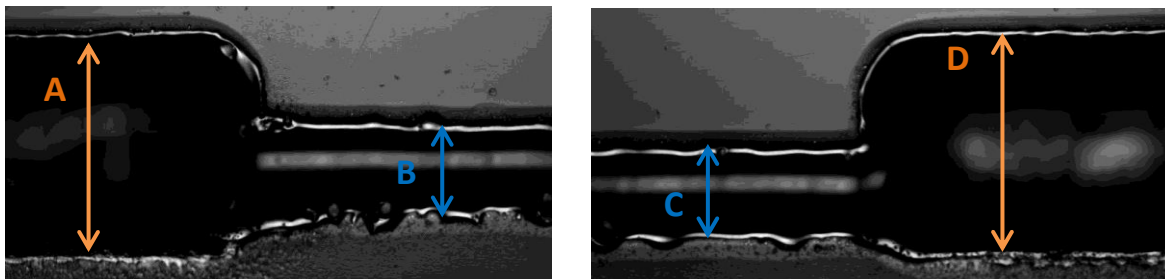


Figura 3 - *Speed* (0.6); *Power* (2); PPI (200). **A** - 1272.222 μm ; **B** - 538.889 μm ; **C** - 533.333 μm ; **D** - 1277.778 μm .

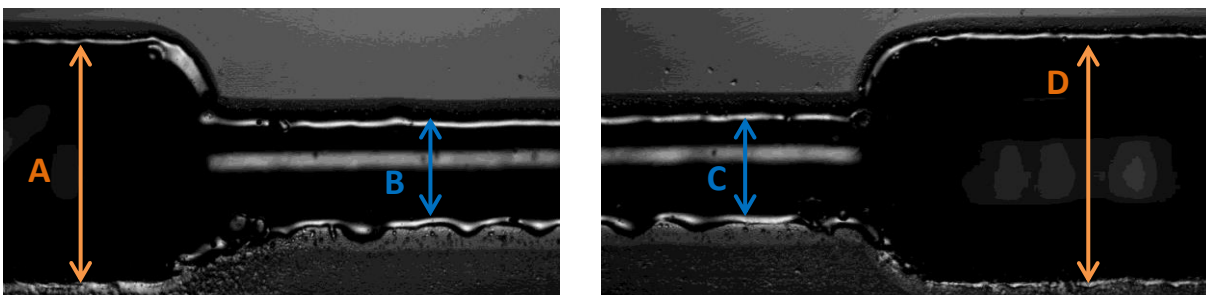


Figura 4 - *Speed* (0.6); *Power* (2); PPI (400). **A** - 1305.556 μm ; **B** - 500.000 μm ; **C** - 511.111 μm ; **D** - 1288.901 μm .

- **Canais com estenose - Profundidade**

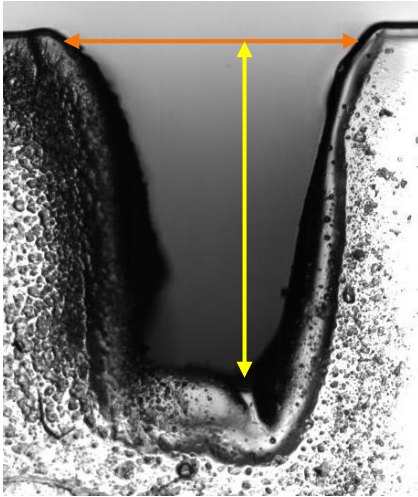


Figura 1 - *Speed (0.5); Power (2); PPI (400)*. A - 1675.000 μm ; B - 922.2567 μm .

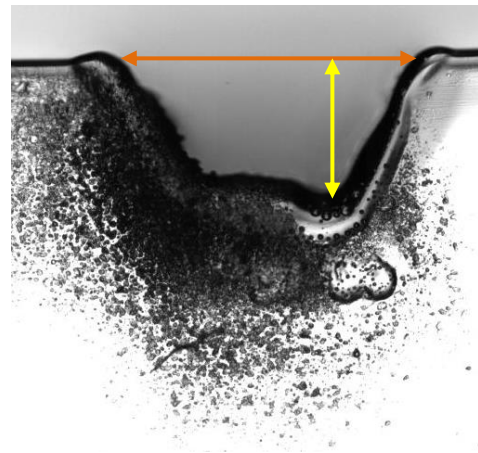


Figura 2 - *Speed (0.6); Power (1); PPI (200)*. A - 725 μm ; B - 1005.644 μm .

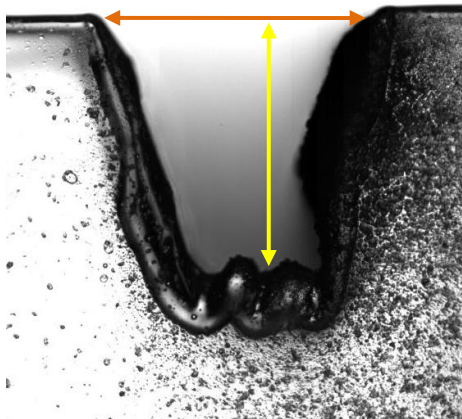


Figura 3 - *Speed (0.6); Power (2); PPI (200)*. A - 1333.333 μm ; B - 991.699 μm .

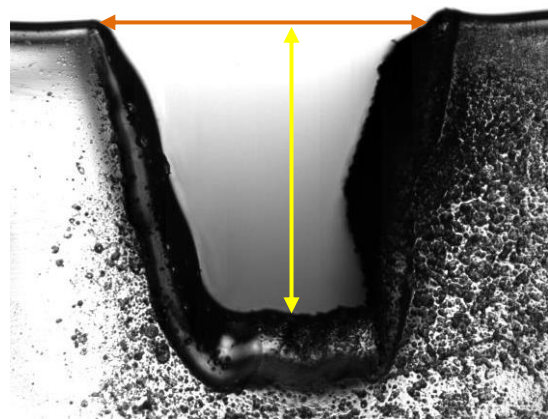


Figura 4 - *Speed (0.6); Power (2); PPI (200)*. A - 1275 μm ; B - 1019.469 μm .