

**Desenvolvimento de um microdispositivo biomédico para a
separação e deformação de eritrócitos**

Susana Cristina Ribeiro Novais

Relatório Final de Projeto/Estágio apresentado à
**Escola Superior de Tecnologia e Gestão
Instituto Politécnico de Bragança**

Para obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia Biomédica

Outubro de 2012

**Desenvolvimento de um microdispositivo biomédico para a
separação e deformação de eritrócitos**

Susana Cristina Ribeiro Novais

Relatório Final de Projeto/Estágio apresentado à
**Escola Superior de Tecnologia e Gestão
Instituto Politécnico de Bragança**

Para obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia Biomédica

Orientadores:

Dr. Rui Lima (IPB)

Co-orientadores:

Dr^a Ana Isabel Pereira (IPB), Dr^a Mónica Oliveira (FEUP), Dr. Sergio
Arana e Dr^a. Maite Mujika (CEIT)

Este trabalho teve a cooperação da Universidade de Navarra, e do Centro
de Investigação (CEIT).



Outubro de 2012

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros gigantes”

Isaac Newton

Dedicatória: Aos meus pais e irmãos que sempre me acompanharam e apoiaram de forma incondicional.

O meu Muito Obrigada.

Agradecimentos

Dirijo o meu primeiro agradecimento aos meus pais e irmãos que sempre me ajudaram e acompanharam de forma incondicional nesta etapa da minha vida, e pelo incentivo na minha educação, pois sem eles nada seria possível.

De seguida e em especial gostaria de agradecer:

Ao Prof. Dr. Rui Lima, pela forma entusiasta e amigável com que sempre se dispôs a discutir assuntos relacionados com este projeto, incentivando ao rigor científico e propondo novos desafios e ideias que resultaram em contribuições para este trabalho;

À Prof^ª. Dra. Ana Isabel Pereira e Prof^ª. Dra. Mónica Oliveira pelas importantes sugestões e contribuições que deram a este trabalho;

Ao Prof. Dr. Sergio Arana, Prof^ª. Dra. Maite Mujika e grupo do departamento de Microeletrónica e Microssistemas do centro de Investigação, CEIT, pela ajuda e tempo disponibilizado;

O apoio da FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia) do QREN, da União Europeia (FEDER) e do programa COMPETE no âmbito dos projetos PTDC/SAU-BEB/105650/2008, PTDC/SAU-BEB/108728/2008, PTDC/EME-MFE/099109/2008, e PTDC/SAU-ENB/116929/2010, e, ao Instituto Politécnico de Bragança o qual me atribuiu a bolsa “Student Mobility Placements” no âmbito do Programa Aprendizagem ao Longo da Vida, para realização da tese em cooperação com o CEIT, Universidade de Navarra, San Sebastian, Espanha;

A todos aqueles que tive oportunidade de conhecer e conviver durante esta fase e que direta ou indiretamente me auxiliaram neste trabalho pelas palavras de confiança ou atos;

Por último, mas não menos importante ao meu namorado Nuno, pelo companheirismo, paciência, palavras de conforto e confiança nos momentos menos bons e pela sua presença em todo o caminho percorrido.

Resumo

Este relatório descreve o trabalho efetuado durante o 2º ano do curso de Mestrado em Tecnologia Biomédica no Instituto Politécnico de Bragança (IPB). Este trabalho consistiu no desenvolvimento de um dispositivo biomédico à micro escala, que tivesse a capacidade de num único passo, realizar a separação e a deformação das células da camada de plasma.

Inicialmente foi feita uma revisão de literatura onde foram abordados alguns temas de relevante interesse para uma melhor compreensão do presente estudo, como a biomicrofluídica, escoamento sanguíneo e técnicas e polímeros imprescindíveis para todo o processo de micro-fabricação. Numa etapa posterior, durante o percurso no CEIT, Universidade de Navarra, Espanha, foi realizada a primeira fase experimental deste projeto, ou seja, o desenho e fabricação do dispositivo. O passo limitante desta fase foi a fabricação dos moldes, através da técnica de fotolitografia, tendo sido necessário otimizar o protocolo desta técnica, na tentativa de obter os melhores resultados. Seguidamente, no Instituto Politécnico de Bragança procedeu-se ao estudo do escoamento sanguíneo nos dispositivos desenvolvidos no CEIT, com o objetivo de analisar o efeito das diferentes constrições presentes nas geometrias, o efeito da velocidade, o efeito dos diferentes hematócritos e o efeito da deformabilidade das células na camada de plasma. Assim, conclui-se que, quanto maior for a razão de expansão, maior é a espessura da camada de plasma a jusante da constrição. Relativamente aos caudais, aferiu-se que estes não têm grande influência na camada de plasma e face ao hematócrito, aferiu-se que à medida que se aumenta o hematócrito, a camada de plasma tende a diminuir. Adicionalmente e através do dispositivo que melhores resultados se obtiveram na etapa anterior, efetuou-se o estudo da rigidez celular, tentando mais uma vez compreender qual o efeito que a rigidez teria sobre a espessura camada de plasma. Para tal, foi necessário criar uma série de protocolos que possibilitassem a indução da rigidez celular. Por último, foram realizadas comparações entre a camada de plasma na presença de células saudáveis e a camada de plasma quando foi induzida rigidez nessas mesmas células, tendo-se concluído, que à medida que diminui a deformabilidade da célula, a espessura da camada de plasma tem tendência a diminuir.

Palavras-chave: Microdispositivo Biomédico, Biomicrofluídica, Eritrócitos, Fotolitografia, Camada de Plasma.

Abstract

This report describes the work performed during the 2nd year of the Master in Biomedical Technology at Instituto Politécnico de Bragança (IPB). The work consisted in designing and developing a biomedical micro-device that had the capacity, in a single step, to perform the separation of red blood cells as well as study their deformation under different flow conditions.

The initial step consisted on performing a literature survey, to review the topics relevant to a better understanding of the present project, including biomicrofluidics, blood flow, as well as polymers and techniques involved in the full process of micro-fabrication.

After drawing series of geometries, the first steps towards the conception of the devices were carried out during the course of stay in CEIT, University of Navarra, Spain, which included the design and manufacture of the molds required for micro-channel fabrication by soft-lithography. The mold fabrication step was performed using photolithography and required an extensive trial-and-error experimental study, to optimize the protocol of this technique in an attempt to obtain better results in terms of accuracy and feature definition.

The devices manufactured in the previous step were used at IPB to study the flow of blood with the aim of analyzing the effect of various parameters on the size of the plasma layer and therefore on red blood cell separation. This study included the effect of constrictions present in different geometries, the effect of the velocity of the fluid and the effect of different hematocrit levels. It was found that the flow rate does not greatly influence the size of the plasma layer. On the other hand, an increase in the expansion ratio (due to a presence of the constriction) induces a larger plasma layer downstream of the expansion, while an increase in hematocrit level reduces the size of the plasma layer. For the flow rates measured, the results showed a slight influence on the plasma layer whereas for the hematocrits tested, the results revealed that as it increases the hematocrit, the plasma layer tends to decrease.

The device which achieved the best results in terms of cell separation was then used to study the effect of the cell stiffness on the size of the plasma layer. For this purpose it was necessary to create a series of protocols that enabled the modification of cell rigidity or deformability.

The size of the plasma layer was then analyzed in the case of cells with increased rigidity (corresponding to diseased cells) and compared to the results with the healthy cells showing that the thickness of the plasma layer decreases as the cells become more rigid.

Keywords: Biomedical Microdevice, Biomicrofluidics, Red Blood cells, Photolithography, Plasma Layer.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Lista de Tabelas	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas.....	xiii
1 Introdução	1
1.1 Motivação e Objetivos.....	1
1.2 Estado de arte.....	2
1.3 Estrutura do Projeto	3
2 Biomicrofluídica	4
2.1 O Sangue e a Hemodinâmica do Sistema Circulatório.....	4
2.2 Composição do Sangue	5
2.2.1 Plasma.....	7
2.2.2 Glóbulos Vermelhos	7
2.2.3 Glóbulos Brancos.....	8
2.2.4 Plaquetas	8
2.3 Micro-circulação.....	8
2.3.1 Reologia do sangue em micro-canais	9
2.3.2 Comportamento dos Fluidos	12
2.3.3 O perfil de velocidade do Sangue	12
2.4 Técnicas Usadas na Separação Sanguínea.....	13
2.4.1 Micro-Filtros.....	13
2.4.2 Filtração Hidrodinâmica	13
2.4.3 <i>Deterministic Lateral Displacement</i>	13
2.4.4 Biomimética.....	14

2.4.5	Ótica.....	15
2.5	Técnicas de Visualização do Escoamento Sanguíneo na Micro-circulação...	16
2.6	Deformabilidade dos Globúlos Vermelhos	17
2.6.1	Métodos de estudo da Deformabilidade dos Eritrócitos.....	19
3	Micro-Fabricação.....	23
3.1	Fabricação do molde por fotolitografia	25
3.1.1	Limpeza	26
3.1.2	Desidratação.....	27
3.1.3	Aplicação do fotorresiste	27
3.1.4	Cura para a estabilização do fotorresiste	28
3.1.5	Alinhamento e Exposição do fotorresiste	28
3.1.6	Revelação.....	29
3.2	Fabricação de micro-canais por Litografia suave.....	29
3.2.1	Polímeros usados na Litografia suave	30
3.2.2	Vantagens e Inconvenientes do PDMS.....	30
3.3	BioMEMS, Uma Nova Geração de Micro-Canais	31
3.3.1	BioMEMS.....	32
4	Fabricação e Caracterização dos Micro-Canais	33
4.1	Métodos e Materiais	34
4.1.1	Confeção da Máscara Litográfica.....	34
4.1.2	Processo de Fotolitografia (fabricação do molde)	35
4.1.3	Medição da espessura do fotorresiste depositado na wafer	36
4.1.4	Fabricação dos moldes em PDMS (litografia suave).....	38
4.1.5	Tratamento de superfície	38
4.1.6	Caraterização dos canais.....	40
4.2	Fabricação.....	43
4.2.1	Material e Equipamentos (Sala Limpa, classe 100).....	44

4.2.2	Procedimento Experimental com a SU-8 5.....	44
4.3	Ensaio experimentais e discussão dos resultados	44
4.4	Conclusão	60
4.5	Trabalhos Futuros	61
5	Ensaio Experimentais Executados no IPB-Parte 1: a separação com células saudáveis	62
5.1	Materiais e Métodos	63
5.2	Testes Experimentais	64
5.3	Análise de Imagem/Vídeo	65
5.4	Resultados.....	66
5.4.1	Resultados obtidos na geometria 1	67
5.4.2	Resultados obtidos na geometria 2	70
5.5	Discussão dos Resultados	73
5.5.1	Comparação da Camada de Plasma e da diferença das constrições para diferentes Hct's para as geometrias 1 e 2	73
5.5.2	Comparação da geometria 1 e 2 relativamente à diferença entre constrições	76
6	Ensaio Experimentais Executados no IPB- Parte 2: a separação com células sujeitas a um tratamento térmico	79
6.1	Materiais e Métodos	79
6.2	Métodos de Indução da Rigidez Celular.....	83
6.3	Resultados.....	84
6.4	Discussão dos Resultados	86
7	Conclusões e Trabalhos Futuros.....	88
7.1	Conclusões.....	88
7.2	Trabalhos Futuros	90
	Bibliografia.....	91

Lista de Tabelas

Tabela 1:Tabela relativa às características das células sanguíneas [Adaptado de Caro et al. (1978)].	6
Tabela 2:Propriedades reológicas dos GVs em adultos normais [Adaptado de Musielak (2009)].	18
Tabela 3:Características do fotorresiste negativo [Adaptado de Rivera (2009)].	44
Tabela 4:Parâmetros experimentais do processo de fotolitografia com o fotorresiste SU-8 5 (15 μm no total).	45
Tabela 5:Parâmetros experimentais do processo de fotolitografia com o fotorresiste SU-8 5, duas camadas (25 μm no total).	49
Tabela 6:Parâmetros usados nas novas geometrias, com a SU-8 2015.	57
Tabela 7:Índice de Deformação nas distintas regiões.	82
Tabela 8:Parâmetros dos protocolos criados.	84
Tabela 9:Valores obtidos a partir dos protocolos criados.	84

Lista de Figuras

Figura 1:Diagramas representativos da hemodinâmica do sistema circulatório [Adaptado de Burton (1966), Caro et al. (1978) e Levick (2003)].	5
Figura 2:Constituintes do sangue (Adaptado de http://cardiovasculogando.blogspot.com/).	6
Figura 3:Dimensão e forma do Glóbulo Vermelho Humano [Adaptado de Lima et al. (2012)].	7
Figura 4:Viscosidade aparente do sangue através de capilares de vidro com diâmetros entre os 3.3 µm e os 800 µm [Adaptado de Pries et al. (1992), Wada e Kobayashi (2002) e Tsubota et al. (2006)].	10
Figura 5:Migração axial dos GVs devido ao gradiente de velocidade do escoamento [Adaptado de Mchedlishvili e Maeda, (2001)].	11
Figura 6:Movimentos típicos das partículas rígidas e deformáveis [Adaptado de Goldsmith (1971)].	11
Figura 7:Perfil de velocidade para $Hct < 1$ e $Hct > 1$ [Adaptado de Lima et al. (2012)].	12
Figura 8:Representação de diferentes filtros [Adaptado de Ji et al. (2008)].	13
Figura 9:Microdispositivos que imitam as micro-vasculaturas através da biomimética [Gossett et al. (2010)].	15
Figura 10: Microdispositivo para separar as células sanguíneas do plasma [Adaptado de Abkarian et al. (2006)].	15
Figura 11:Visualização de GVs adjacentes a poros de um filtro “ <i>Nucleopore</i> ” [Adaptado de Silva e Saldanha, (2005)].	19
Figura 12:Equipamento “ <i>Single Pore Rigidometer</i> ” [Adaptado de Kieseeweter et al. (1991)].	20
Figura 13:Equipamento “ <i>Rheodyn SSD</i> (Myrenne, Roetgen, Germany) usado na determinação automática da DE por difração de laser [Adaptado de Silva e Saldanha (2005)].	22
Figura 14:Escolha dos materiais relativamente à aplicação e ao tamanho pretendido [Adaptado de Yole Developpement (2011)].	24
Figura 15: Principais materiais usados na microfluídica [Adaptado de Yole (2011)].	24

Figura 16: Fabricação dos canais.	25
Figura 17:Fases da Fotolitografia.....	26
Figura 18:Processo de aplicação do fotorresiste [Adaptado de Mishra (2002) e Tamaiuolo (2008)]......	27
Figura 19:Processo global até à fabricação do modelo em PDMS e posterior descolagem do molde [Adaptado de Nianzhen et al. (2003) e Tamaiuolo (2008)].	29
Figura 20:Estrutura do polidimetilsiloxano, onde n representa o número de unidades monoméricas, [Adaptado de Somosundaran et al. (2006)].	30
Figura 21:Desenho esquemático da fabricação de micro-canais com secções transversais circulares [Adaptado de Linsey et al. 2010)].	32
Figura 22: Etapas desde a modelação geométrica até à caracterização dos micro-canais realizadas no CEIT.	33
Figura 23:Geometrias iniciais para estudar a separação dos GVs.	34
Figura 24:Diferenças estruturais das geometrias.	35
Figura 25:Representação do equipamento de fabrico do molde -EVG® 620.....	36
Figura 26:Representação do equipamento mecânico Perfilómetro P-6 e exemplo de um perfil obtido por este equipamento.	37
Figura 27:Fases da fabricação dos moldes em PDMS.	38
Figura 28:Demonstração dos principais passos a seguir na câmara de oxigénio/plasma.	40
Figura 29:Equipamento de deposição catódico (<i>Sputter Coater</i>).	41
Figura 30:Esquema geral do MEV/SEM [Goldstein et al (1992)]......	42
Figura 31:Resultado final das geometrias na primeira fase de testes.....	47
Figura 32:Perfil representativo da espessura em diferentes locais da geometria e em diversas geometrias.	48
Figura 33:Perfis representativos das diferentes geometrias.	51
Figura 34:Molde em PDMS.	52
Figura 35:Processo de preparação da amostra.	53
Figura 36:Visualização dos canais ao MEV.	54
Figura 37:Moldes de PDMS fixados ao substrato de vidro.	54
Figura 38:Resultados do escoamento obtidos.	55
Figura 39:Representação exemplo das geometrias criadas na primeira parte deste projeto. ...	55

Figura 40:Novas geometrias para testar o escoamento.	56
Figura 41:Novos micro-canais quando observados no Perfilómetro.	58
Figura 42:Perfil correspondente à medição da espessura no Perfilómetro.	58
Figura 43:Resultados obtidos no Microscópio Eletrónico de Varredura.	59
Figura 44:Sistema de microscopia utilizado na ESTIG, IPB.	64
Figura 45:Tratamento de imagem efetuado no presente trabalho.	66
Figura 46:Geometrias usadas na apresentação dos resultados.	67
Figura 47:Geometria 1 com visualização das diferentes áreas de medição da CP (antes e depois).	68
Figura 48:Estudo da espessura da CP do Hct 5% em função dos diferentes caudais.	68
Figura 49:Estudo da espessura da CP do Hct 10% em função dos diferentes caudais.	69
Figura 50:Análise da espessura da CP do Hct 5% em função dos caudais.	70
Figura 51:Estudo da camada de plasma para o Hct de 5%.	71
Figura 52:Observação da camada de plasma quando usado um Hct de 10%.	72
Figura 53:Estudo da camada de plasma quando usado um Hct de 15%.	72
Figura 54:Análise da camada de plasma, antes e depois da constrição para todos os Hct em estudo.	73
Figura 55:Diferença das constrições para todos os Hct quando comparadas com os distintos caudais ($\Delta_{cp} = cpD - cpA$) entra a camada de plasma antes (cpA) e depois da constrição (cpD).	74
Figura 56:Análise da CP, antes e depois da constrição para os Hct 5%, 10% e 15%.	75
Figura 57:Diferença das constrições para todos os Hct quando comparadas com caudal de 2, 5 e 10 $\mu\text{l}/\text{min}$	75
Figura 58:Comparação das duas geometrias face à diferença das constrições, para o Hct 5%.	76
Figura 59:Comparação das duas geometrias face à diferença das constrições para o Hct 10%.	77
Figura 60:Comparação das duas geometrias face à diferença das constrições para o Hct 15%.	78
Figura 61:Geometria usada na deformação de GVs.	80

Figura 62:Região 1 do micro-canal onde se estudou o índice de deformação com tratamento.	80
Figura 63:Região 1 do micro-canal onde se estudou o índice de deformação sem tratamento.	81
Figura 64:Regiões (2, 3 e 4) do micro-canal de análise do índice de deformação com tratamento.....	81
Figura 65: Regiões (2, 3 e 4) do micro-canal de análise do índice de deformação sem tratamento.....	81
Figura 66:Fórmula de cálculo do índice de deformação.....	82
Figura 67:Índice de deformação nas diferentes regiões.....	83
Figura 68:Estudo da CP antes e depois da constrição para todos os protocolos e para um caudal de 5 µl/min.....	85
Figura 69:Estudo da CP antes e depois da constrição para todos os protocolos e para um caudal de 10 µl/min.....	86
Figura 70:Diferença de constrições (antes e depois) em função de distintos caudais para todos os protocolos.....	87

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFM	Força de Microscopia Atómica
<i>AutoCAD</i>	<i>Computer Aided Design</i>
BSE	<i>Backscattered Electron</i>
CFL	<i>Cell Free Layer</i>
CP	Camada de Plasma
DE	Deformabilidade de eritrócitos
DLD	<i>Deterministic Lateral Displacement</i>
Dx	Dextrano
Fps	Frame per second
GBs	Glóbulos Brancos
GVs	Glóbulos Vermelhos
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio;
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
Hct	Hematócrito
ID	Índice de deformabilidade
IPA	Isopropanol
IPB	Instituto Politécnico de Bragança
K	Constante de integração
LOC's	<i>Lab on a Chip</i>
LVDT	Transformador Diferencial Variável Linear
MEMS	Sistemas Micro Eletromecânicos
MEV	Microscópio Eletrónico de Varrimento
MRI	Imagens por Ressonância Magnética;
NaCl	Cloreto de sódio
PDMS	Polidimetilsiloxano
PIV	Velocimetria por imagem de micro partículas
R	Raio
<i>Re</i>	Número de Reynolds
SDCM	Microscópio Confocal de Disco Giratório
SE	Electrões Secundários
SEM	<i>Scanning Electron Microscope</i>
SU-8 5 e SU-8-2015	Permanet Epoxy Negative Photoresit
UV	Ultravioleta
ΔCp	Diferença da Camada de Plasma
η	Viscosidade do fluido
μl/min	Microlitro por minuto
μm	Micrómetros
μTAS	<i>Micro total analysis systems</i>

Primeiro Capítulo

1 Introdução

Neste capítulo encontra-se apresentada a motivação para o desenvolvimento da tese, assim como os objetivos da mesma. Apresenta-se ainda, o estado de arte e a estrutura da tese.

1.1 *Motivação e Objetivos*

Este relatório descreve o trabalho realizado no Centro de Investigação (CEIT), São Sebastian, em Espanha, durante o 2º ano do curso de Mestrado em Tecnologia Biomédica, tendo sido o estágio financiado pelo programa Erasmus com uma duração de 5 meses. O restante período até a apresentação deste projeto realizou-se no Instituto Politécnico de Bragança, em Portugal.

Em diversos estudos, tem sido afirmado que a deformação dos eritrócitos depende do estado de saúde do próprio paciente. Por exemplo, como seria de esperar células infetadas por com malária ou até diabetes, ostentam índices de deformação diferentes, comparativamente a células saudáveis.

Os métodos tradicionais habitualmente usados no estudo da deformação dos GVs podem modificar o estado original das células e por consequência, os resultados de análises posteriores podem ser alterados. Por estes motivos, é de fulcral importância que se encontrem novas abordagens de separação, capazes de serem integradas em estratégias existentes de análise das células, para que seja exequível desenvolver um processo de análise de células, sem que estas sejam alteradas.

A finalidade deste projeto é a criação de um *biochip*, que possua a capacidade de unicamente num passo, realizar a separação e a deformação de células sanguíneas. O desenvolvimento deste *biochip* integrado poderá suprimir horas de trabalho laboratorial e

minimizar erros de procedimentos, ampliando deste modo a exatidão do diagnóstico de diversas doenças.

1.2 Estado de arte

O sangue é uma suspensão de 45% das células (plaquetas, eritrócitos e leucócitos) no plasma. Os eritrócitos (glóbulos vermelhos) constituem a maioria das células no sangue e são normalmente cerca de 1000 vezes mais abundantes do que os leucócitos. Os métodos atualmente disponíveis para fazer a separação do sangue são por vezes muito complicados, daí ser de extrema importância o desenvolvimento de métodos simples e eficientes, para que seja possível isolar os leucócitos diretamente do sangue total [Cheng et al. (1998), Kricka e Wilding (2003), Paegel, et al. (2003), Andersson e Van den Berg (2003), Abramowitz, (1999), De Mello, Beard (2003) e Vilknér et al. (2004)].

Visto que o projeto em questão se baseia no desenvolvimento de um microdispositivo biomédico, para a separação e deformação de eritrócitos, é importante mencionar que a separação e classificação das células são importantes para uma vasta gama de aplicações biomédicas, incluindo o diagnóstico, terapêutica e a biologia celular.

Muitos dos atuais testes de diagnóstico, dependem de componentes fracionados do sangue, como por exemplo: o plasma, glóbulos vermelhos (GVs), glóbulos brancos (GBs) e plaquetas. A título de curiosidade, evidenciando apenas dois exemplos, pode-se referir que a **camada livre** das células é usada para a deteção do cancro através de biomarcadores no sangue, ao passo que os **GBs** são necessários para vários exames hematológicos, bem como o sequenciamento do ácido desoxirribonucleico (ADN) [Gossett et al. (2010)].

Além do **diagnóstico**, os componentes do sangue são utilizados na **terapêutica**. Em muitas amostras clínicas podem ser encontradas células estaminais, existindo um grande interesse na utilização destas células, tanto na área da engenharia dos tecidos como para o tratamento de doenças, encontrando-se grande parte destas células estaminais no líquido amniótico.

Para finalizar, outra das aplicações biomédicas em que a separação e classificação das células são muito importantes é a **biologia celular**. Esta tenta compreender o comportamento das células, requerendo muitas vezes o isolamento de diferentes tipos de células, como por exemplo os GBs, células estaminais, de forma a reduzir a heterogeneidade na amostra

estudada. Os atuais métodos de isolamento de células estaminais envolvem o uso de marcadores bioquímicos, [Li et al. (2002), Toner, Irimia (2005), Villanueva et al. (2006), Gossett et al. (2010)].

O uso de dispositivos micro-fluídicos para a separação de células micro-fluídicas tem um número de vantagens bem conhecidas, em comparação com os métodos tradicionais de separação. Podem ser referidos, entre muitos outros, o menor consumo de volume da amostra, a facilidade de portabilidade, a fabricação a custo reduzido, uma melhor esterilização e uma análise mais rápida e eficiente, [Chong et al. (2004), Milica et al. (2006), Kyongmi et al. (2007), Nan et al. (2007), Mohamed et al. (2011)].

A rápida expansão dos “*lab-on-a-chip*” face aos dispositivos de micro análise, proporcionará ferramentas à micro escala, que podem revolucionar as análises clínicas, reduzindo drasticamente o tamanho da amostra e o seu manuseio, [Ramsey (1999) e Vilkner et al. (2004)].

1.3 Estrutura do Projeto

Procurou-se dar uma ordem aos temas desenvolvidos neste trabalho, que permita ao leitor um acompanhamento, e percepção das questões envolvidas em cada assunto tratado. Este projeto divide-se em 7 capítulos, estando eles ordenados da seguinte maneira.

No primeiro capítulo, apresenta-se a motivação e objetivos deste trabalho, uma breve abordagem ao estado de arte e a estrutura do presente projeto.

No segundo capítulo, é exposta uma aprofundada revisão de literatura, onde serão abordados assuntos relacionados com a biomicrofluídica.

No terceiro capítulo, sob o título de micro-fabricação, são apresentadas técnicas de fabricação usuais na produção de micro-sistemas analíticos e o tipo de polímero empregue na fabricação do dispositivo do presente projeto.

No quarto, quinto e sexto capítulo, serão expostos os ensaios experimentais executados no CEIT e no IPB.

No sétimo e último capítulo, serão apresentadas as conclusões deste projeto, bem como propostas para trabalhos futuros.

Segundo Capítulo

2 Biomicrofluídica

Neste capítulo serão abordados assuntos relativos ao sangue, e a toda a sua envolvente, bem como a hemodinâmica do sistema circulatório, a composição do sangue, a micro-circulação, técnicas usadas na separação sanguínea, entre outros.

2.1 *O Sangue e a Hemodinâmica do Sistema Circulatório*

O sangue circulante tem como principal função, o transporte de oxigénio, nutrientes, produtos residuais e calor para todo o corpo. Pode-se referir que o sangue oxigenado sai do coração a uma elevada velocidade e pressão, através da aorta e dirige-se seguidamente para outras artérias de grande porte, arteríolas e por fim para os capilares. No retorno, este movimenta-se para as vénulas, veias e finalmente volta para o coração e o processo é novamente repetido, processo este representado pela Figura 1 (A). Ainda nesta figura é visível um exemplo da natureza não-Newtoniana do sangue, onde se pode observar a formação de uma camada de plasma em micro-vasos com diâmetro inferior a $300\mu\text{m}$ [Fåhræus, Lindqvist (1931)].

Segundo Fung (1993) e Yamaguchi et al. (2006), em grandes artérias onde o diâmetro dos vasos sanguíneos é suficientemente grande comparativamente a células individuais, é adequado considerar o sangue como um fluido Newtoniano. Deste modo, o sangue nas grandes artérias pode ser estudado como um fluido homogéneo, onde a influência das partículas no escoamento é ignorada. Adicionalmente, graças ao elevado número de Re nas artérias, o escoamento é regido por forças de inércia.

No entanto, como as artérias se dividem em contínuas artérias com menores diâmetros, a área da secção transversal vai ser amplificada, logo tanto a pressão como a velocidade,

abrandam à medida que o sangue flui para os vasos de menor porte [Fung (1993) e Yamaguchi et al. (2006)].

Quando o sangue atinge as arteríolas e capilares, o número de Reynolds (Re) torna-se menor que um, onde a força viscosa domina sobre as forças de inércia (ver Figura 1 (B)). Em dimensões à escala micro, é essencial ter em conta o efeito das propriedades não-Newtonianas do sangue, visando o estudo do seu comportamento em micro-vasos e micro-canais [Caro et al. (1978) e Fung (1993)].

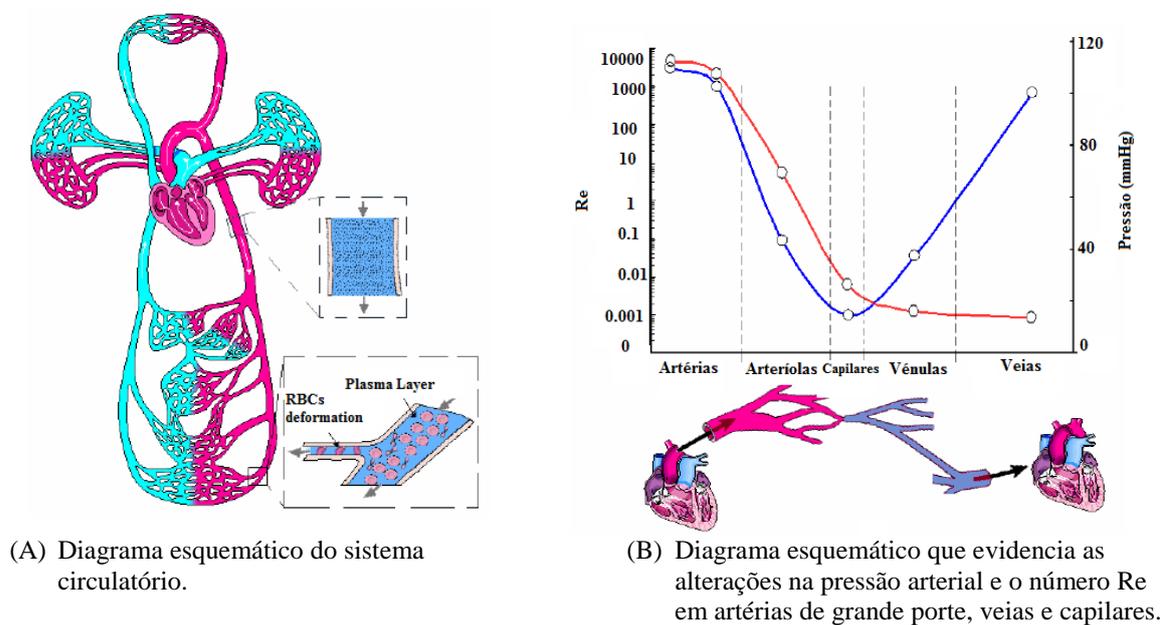


Figura 1: Diagramas representativos da hemodinâmica do sistema circulatório [Adaptado de Burton (1966), Caro et al. (1978) e Levick (2003)].

2.2 Composição do Sangue

Do sangue fazem parte elementos celulares, que correspondem 40% a 45% da sua composição. Fazem parte desses elementos os glóbulos vermelhos (GVs) ou eritrócitos, glóbulos brancos (GBs) ou leucócitos e plaquetas ou trombócitos, como se pode visualizar na Figura 2 [Wait e Fine (2007) e Cidre (2010)]. O plasma, elemento sanguíneo (ver Figura 2), constitui 55% a 60% da restante composição do sangue. Este elemento é um líquido transparente, de cor âmbar, que possui elementos celulares suspensos. Denomina-se de soro, o

plasma do sangue onde foram eliminados os fatores de coagulação [Wait e Fine (2007) e Cidre (2010)].

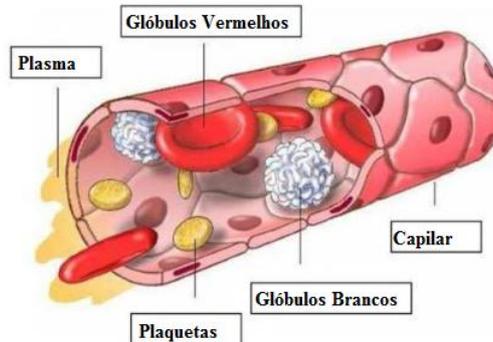


Figura 2:Constituintes do sangue (Adaptado de <http://cardiovasculogando.blogspot.com/>).

A consistência viscosa é uma característica típica do sangue, variando essa consistência mediante o conteúdo de proteínas e GBs. A viscosidade é um fator de elevada relevância, uma vez que é graças a esta que é exequível determinar a pressão e a taxa de deformação do sangue que circula nos vasos sanguíneos do sistema circulatório. A circulação dos diferentes tipos de células é outro fator de relevância no escoamento do sangue. Os GBs tendem a fluir de forma individual rolando ao longo das paredes dos vasos sanguíneos, enquanto GVs, deslocam-se individualmente, ou em agregados, e tendem a concentrar-se no centro dos vasos sanguíneos, ou seja, possuem um escoamento axial [Wait e Fine (2007) e Cidre (2010)].

Na Tabela 1, pode-se visualizar um resumo das características das células sanguíneas.

Tabela 1:Tabela relativa às características das células sanguíneas [Adaptado de Caro et al. (1978)].

Célula	Forma e dimensão (μm)	Concentração em volume (%) no sangue
Glóbulos Vermelhos (GVs)	Forma Bicôncava, (8×1-3)	
Glóbulos Brancos (GBs)	Aproximadamente Esférica (7-22)	45
Plaquetas	Redonda ou oval (1-4)	1

Seguidamente, serão abordados mais especificamente cada um dos constituintes do sangue, para que seja possível, um melhor entendimento destes.

2.2.1 Plasma

Este fluido tem como função, transportar para o interior do aparelho cardiovascular todos os elementos que se encontrem presentes no sangue, por exemplo, as células sanguíneas, os nutrientes (gorduras, aminoácidos e açúcares), vitaminas, substâncias minerais e até mesmo medicamentos [Teixeira (2008)].

2.2.2 Glóbulos Vermelhos

Os Glóbulos vermelhos (GVs) possuem hemoglobina, são destituídos de núcleo e organelos originados e deteriorados na medula óssea. Os GVs são considerados 700 vezes mais abundantes que os GBs e 17 vezes mais numerosos que as plaquetas. Os GVs têm forma de disco bicôncavo e possuem um diâmetro de aproximadamente **8 μm** , uma espessura de 2 μm e um volume entre os 80-90 μm^3 [Cidre (2010) e Lima et al. (2012)], como se pode observar pela Figura 3, sendo as extremidades mais espessas que o centro da célula. Para que seja exequível um fácil movimento por parte dos pequenos vasos, os GVs dobram-se pelo centro.

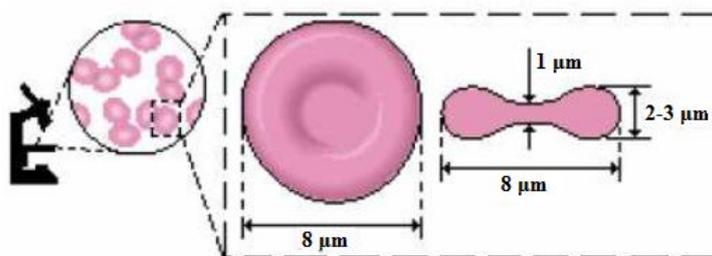


Figura 3: Dimensão e forma do Glóbulo Vermelho Humano [Adaptado de Lima et al. (2012)].

A vida de um GV é cerca de 125 dias, ou seja, 0,8% destes GVs são destruídos a cada dia, por conseguinte a mesma quantidade de GVs é produzida na medula óssea. Os GVs são os principais responsáveis pelo transporte de oxigénio dos pulmões para todos os tecidos do corpo humano [Cidre (2010)].

Considera-se hematócrito (Hct) como a percentagem ocupada pelos GVs, no volume total de sangue. Mediante o sexo e a idade, os valores médios vão variando, cerca de 45% na mulher e 40-50% no homem [Cidre (2010)].

2.2.3 Glóbulos Brancos

Os Glóbulos Brancos (GBs) são aqueles que se encarregam pelo mecanismo de defesa, a que se dá o nome de resposta imunitária. Estes decompõem-se em dois grupos organizados por função, fagócitos e linfócitos, ou em dois grupos dispostos por aparência, os granulócitos e agranulócitos. Pode-se ainda referir que os GBs têm um diâmetro que varia numa gama dos **7-22 μm** , mediante o seu tipo [Lima et al. (2012)].

2.2.4 Plaquetas

As plaquetas, também designadas por trombócitos são células incolores, têm corpos nucleares habitualmente esféricos ou ovais. São consideradas fragmentos celulares de megacariócitos (células poliplóides, existentes na medula óssea em contato com os vasos sanguíneos). Desempenham um papel fundamental na coagulação do sangue, sendo a sua principal função a formação de coágulos. Relativamente ao seu diâmetro, estas possuem um diâmetro cerca de **1-2 μm** [Wait e Fine (2007), Cidre (2010) e Lima et al. (2012)].

2.3 *Micro-circulação*

Face aos critérios morfológicos, pode-se referir que fazem parte da micro-circulação os vasos sanguíneos que possuam um diâmetro inferior a 150 μm , o que abrange arteríolas (ou pequenas artérias), capilares e vénulas. Tendo em conta que o sangue não flui de forma contínua pelos capilares, mas de forma descontinuada, ligando-se e desligando em distintos intervalos de tempo, pode-se referir que, a causa dessa descontinuidade é o resultado de distintos graus de contração da túnica média das arteríolas, e dos esfíncteres pré-capilares, que tem por nome vasomotilidade [Teixeira, (2008)]. A micro-circulação estabelece o ponto em que o sangue e os tecidos dos distintos órgãos corporais entram realmente em contato [Silva (1997)].

2.3.1 Reologia do sangue em micro-canais

A maior parte dos fluidos biológicos (como por exemplo o sangue) são considerados viscosos. O efeito mais evidente de se considerar, face à viscosidade de um fluido num escoamento, é o seu perfil de velocidades ao longo de uma secção. Independentemente do escoamento ser ou não laminar, a partir do momento em que o fluido tenha viscosidade, a sua velocidade irá variar com a distância ao centro do tubo, sendo válida a derivação da equação (1). Na Equação (1), pode-se visualizar o modo matemático de cálculo do gradiente de velocidades, na direção radial em fluidos viscosos (v), sendo esta equação dada por:

$$v = -\frac{(P_1 - P_2) \times r^2}{4\eta l} + k \quad (1)$$

Através da integração da Equação (1), é obtido o gradiente de velocidades, onde o η representa a viscosidade do fluido, o comprimento do vaso é representado pela letra l , o p representa a pressão num ponto e, o r e o k , o raio do vaso e a constante de integração gerada pela aplicação das condições de fronteira, onde junto à parede a $v=0$ [Westerhof e Stergiopoulos et al. (2005)]. É importante referir que, a viscosidade do sangue depende do Hct, ou seja, quanto maior este for, maior é o atrito gerado entre as camadas de sangue e por conseguinte a viscosidade amplia expressivamente com o aumento do Hct.

As características do escoamento sanguíneo mais surpreendentes são conhecidas como efeito de *Fåhræus* e efeito *Fåhræus-Lindqvist*. Estes dois efeitos para além de já terem sido observados em ensaios experimentais *in vivo*, estão fortemente relacionados com o diâmetro de micro-tubos. Na notável obra de Robin Fåhræus, constata-se que ele observou que, tanto o comportamento do escoamento do sangue como o Hct são fortemente afetados, por micro-tubos de diâmetros inferiores a 300 μm , o que sugere que o Hct diminui à medida que o sangue prossegue através de micro-vasos mais estreitos. Este fenómeno resulta da migração axial dos GVs para o centro do micro-tubo e consequente movimento mais rápido das células, quando comparado com o meio de suspensão, como o plasma ou o dextrano [Fåhræus e Lindqvist (1931), Chien et al. (1984), Pries et al. (1992), Fung (1993), Maeda (1996) e Pries e Secomb (2003)]. Ainda Fåhræus e Lindqvist observaram que para micro-tubos de diâmetro inferior a 300 μm , a viscosidade aparente diminuía à medida que o diâmetro do micro-tubo se tornava menor [Fåhræus e Lindqvist (1931)]. Depois deles, vários investigadores estudaram este fenómeno para micro-tubos com diâmetros até 3 μm e observaram um aumento da

viscosidade aparente para diâmetros com aproximadamente 7 μm , como se pode visualizar na Figura 4.

É de ressaltar que a viscosidade do sangue, depende da viscosidade do plasma conjuntamente com o Hct e a deformabilidade dos GVs, [Westerhof e Stergiopulos et al. (2005)], e ainda se acredita que a camada de plasma e, também os movimentos dos GVs desempenham um papel importante sobre a viscosidade aparente [Chien et al. (1984), Pries et al. (1992), Maeda (1996) e Pries e Secomb (2003)].

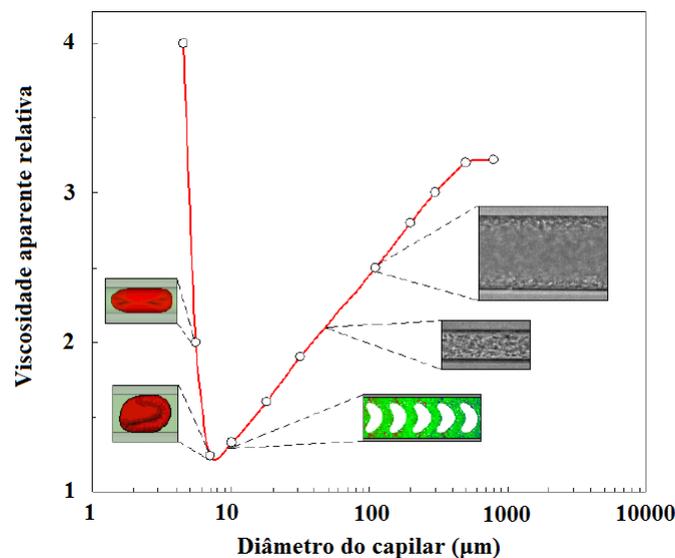


Figura 4:Viscosidade aparente do sangue através de capilares de vidro com diâmetros entre os 3.3 μm e os 800 μm [Adaptado de Pries et al. (1992), Wada e Kobayashi (2002) e Tsubota et al. (2006)].

Uma explicação óbvia para o efeito Fahraeus-Lindqvist, é a diminuição do Hct dinâmico (Hct no micro-tubo) com o decréscimo do diâmetro dos micro-vasos ou micro-tubos, e conseqüente diminuição da viscosidade aparente. Este efeito também pode ser explicado pela formação de uma camada de plasma (CP) marginal perto da parede do micro-canal. Esta CP fica localizada entre os GVs em suspensão e a parede (onde as forças de corte são máximas), o que contribui para uma redução da viscosidade aparente. Acredita-se que na micro-circulação, a CP tenha como função reduzir o atrito entre os glóbulos GVs e as células endoteliais e conseqüentemente a resistência ao escoamento. No entanto, a formação bastante complexa da CP não foi ainda demonstrada de forma convincente, sobretudo devido a fatores multi- físicos e hemoreológicos que afetam a CP. Atualmente, a explicação mais aceitável é devido à tendência que os GVs têm de migrar em

direção ao eixo do micro-tubo, reforçada pela deformação dos GVs, (ver Figura 5) [Schmid-Schonbein e Wells (1969), Goldsmith (1971 a/b, 1984), Caro et al. (1978), Fung (1993) e Maeda (1996)].

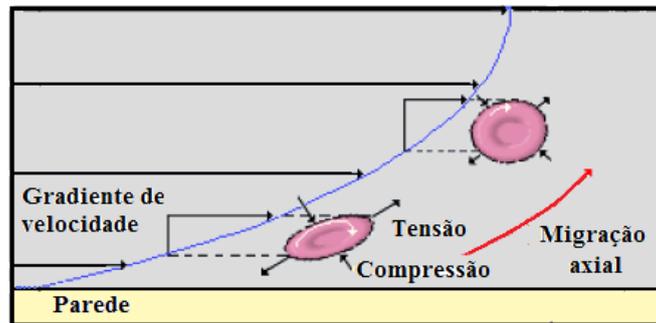


Figura 5: Migração axial dos GVs devido ao gradiente de velocidade do escoamento [Adaptado de Mchedlishvili e Maeda, (2001)].

No escoamento de Poiseuille, o comportamento das partículas em suspensão depende de vários fatores, tais como, deformação da partícula, tamanho e forma. Os GVs deformáveis tendem a migrar em direção ao eixo do tubo, devido a uma força radial hidrodinâmica. Para um $Re > 1$, onde as forças de inércia se tornam importantes, os corpos deformáveis têm migração axial enquanto as partículas esféricas rígidas têm um comportamento transiente, ou seja, migram para o centro e para junto das paredes. As partículas esféricas que se encontram perto da parede movimentam-se para o centro, enquanto as que se encontram no centro se movem em direção à parede. Estas partículas rígidas têm tendência a atingir uma posição de equilíbrio radial de $0.6R$, onde R é o raio do tubo. Na Figura 6 são apresentados os movimentos típicos das partículas rígidas e das células sanguíneas deformáveis [Goldsmith (1971 a/b), Caro et al. (1978)].

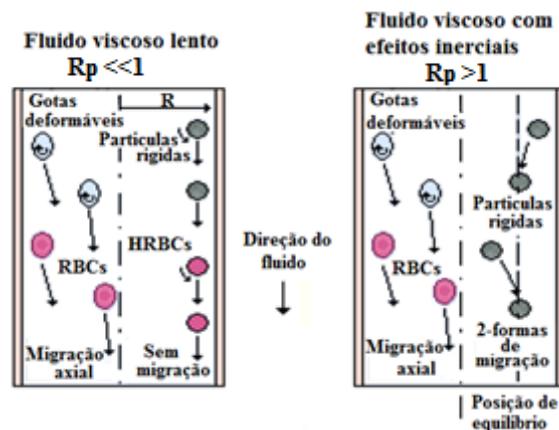


Figura 6: Movimentos típicos das partículas rígidas e deformáveis [Adaptado de Goldsmith (1971)].

2.3.2 Comportamento dos Fluidos

Os fluidos podem ser considerados Newtonianos e não-Newtonianos, mediante o seu comportamento. São considerados fluidos Newtonianos, aqueles que demonstram a mesma viscosidade em qualquer velocidade de escoamento, por exemplo, a água, o ar, o plasma e a gasolina. Estes exibem um comportamento viscoso ideal, onde a variação da tensão de corte vs gradiente de velocidade é linear, [Lima et al. (2012)].

Denomina-se fluido não-Newtoniano, um fluido cuja viscosidade varia mediante o grau de deformação exercido.

O sangue como fluido não-Newtoniano caracteriza-se por possuir uma viscosidade de aproximadamente $\eta=4e^{-3}$ Pa.s e uma densidade de $\rho=1.0595e^3$ Kg.m⁻³, demonstrando ter um comportamento não linear [Lima et al. (2012)].

2.3.3 O perfil de velocidade do Sangue

Durante anos mediu-se a velocidade do escoamento sanguíneo em micro-canais, e a disseminação dos resultados reflete a complexidade do fenómeno. Contudo, segundo Goldsmith [Goldsmith e Turitto (1986)] é indicado um perfil de velocidades próximo de uma parábola para soluções muito diluídas (1 Hct), e um perfil tipo pistão para soluções que possuam um Hct maior, [Lima et al. (2012)]. Na Figura 7, pode-se observar os perfis de velocidade quando o hematócrito é menor e superior a 1.

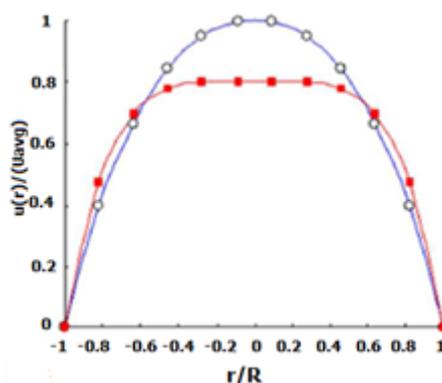


Figura 7: Perfil de velocidade para Hct < 1 e Hct > 1 [Adaptado de Lima et al. (2012)].

2.4 Técnicas Usadas na Separação Sanguínea

Nesta fase do projeto, serão abordadas algumas das técnicas que se usam atualmente para fazer a separação de células.

Inicialmente vão ser abordados aspectos da separação física, alcançada através da utilização de micro-filtros. Em seguida, é referida uma técnica que manipula a dinâmica de fluidos em micro escala e por fim, é referida uma técnica ótica [Gossett et al. (2010)].

2.4.1 Micro-Filtros

Uma forma simples de separação das células é através do **tamanho**. Para efetuar este tipo de separação, usa-se a filtração. Nestes casos os filtros de membrana, são compostos por uma ampla gama de distintos tamanhos de poros. Para determinadas aplicações, incluindo o fracionamento do sangue em GVs, GBs, plaquetas e plasma, esta técnica possui uma reduzida eficiência de separação. A micro-fabricação de vários modelos de filtros é mais compatível com a preparação de amostras sanguíneas, uma vez que o tamanho dos poros pode ser precisamente controlado. Alguns micro-filtros, entre os quais, *Weir*, *Pillar*, *Cross-flow* e *Membrane*, foram validados por *Ji et al* [Ji et al. (2008)] onde três dos quais estão representados na Figura 8.

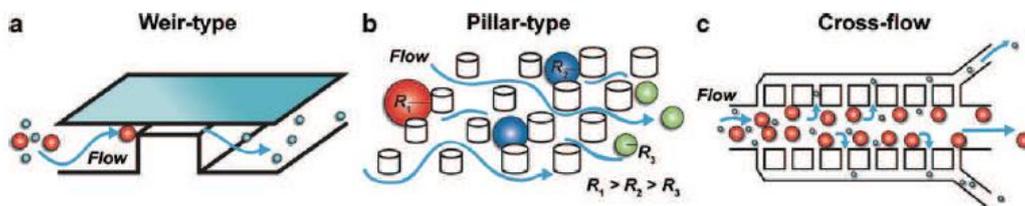


Figura 8: Representação de diferentes filtros [Adaptado de Ji et al. (2008)].

2.4.2 Filtração Hidrodinâmica

A filtração hidrodinâmica é uma técnica semelhante baseada na filtração por **tamanho** e **forma**, e requer uma única amostra para a entrada. O microdispositivo fluídico é composto por um canal direito, que possui vários canais perpendiculares [Takagi et al. (2005)].

2.4.3 Deterministic Lateral Displacement

O *Deterministic Lateral Displacement* (DLD) tem sido aplicado, para se proceder à separação dos GVs, GBs e plaquetas, tendo em conta o **tamanho**. Esta técnica tem uma boa

resolução, tendo-se demonstrado eficaz para a medição das células. Além disso, esta técnica tem sido empregue para expor as células a uma multiplicidade de soluções para realizar a rotulagem e lavagem. O DLD elimina 99,99% dos GVs do sangue com um caudal de 0.35 mL/h [Huangn et al. (2008)].

2.4.4 Biomimética

Como o nome indica, “Bio” significa vida, e “mimesis” significa imitação. É considerada um ramo da ciência, que estuda as estruturas biológicas e as respetivas funções, permitindo a utilização dos conhecimentos da natureza ao nível *in vivo* [Shevkoplyas et al. (2005)].

Relativamente às técnicas de separação de células baseadas na biomimética, pode-se referir que estas se adaptam aos fenómenos hemodinâmicos, que envolvem as propriedades intrínsecas do sangue e das micro-vasculaturas, com a finalidade de se conseguir a divisão desejada dos componentes do sangue. Estes fenómenos incluem a **separação do plasma**, a **migração dos GVs** e o **efeito *Zweifach Fung***, conhecido também por lei da bifurcação [Shevkoplyas et al. (2005) e Gossett et al. (2010)].

Dentro da micro-vasculatura, os GVs têm tendência a se concentrarem junto ao centro do vaso, ao passo que os GBs são associados a uma região rica em plasma junto às paredes [Gossett et al. (2010)]. O efeito *Zweifach Fung*, ou a lei da bifurcação, descreve o comportamento dos GVs quando o micro-capilar se separa em dois canais, onde estas células (GVs) “escolhem”, predominantemente, o maior dos capilares na bifurcação, como se pode visualizar na Figura 9. Várias técnicas têm sido desenvolvidas para tirar proveito desses efeitos. Shevkoplyas et al., desenvolveram um método para o isolamento de células brancas do sangue total por marginação [Shevkoplyas et al. (2005)]. Após algumas etapas, Shevkoplyas et al., aperceberam-se que a maior parte dos GVs entraram e dirigiram-se para a maior saída, ao passo que os GBs se dirigiram para a saída mais estreita, como se pode visualizar pela Figura 9a) [Jäggi et al. (2006)].

Relativamente à separação das células sanguíneas do plasma, Abkarian et al., desenvolveram um microdispositivo constituído por uma constrição e expansão brusca, capaz de separar de uma forma bastante eficiente as células do plasma (ver Figura 10), [Abkarian et al. (2006)]. *Sollier et al.*, ao reverem este método demonstraram que o efeito *Zweifach Fung*

está presente nos canais mais amplos e também naqueles em que as taxas de escoamento são maiores [Sollier et al. (2009)]. Na Figura 9b) pode-se observar ramos sucessivos fora do canal principal, que têm como função remover o plasma, ou seja, foi usada e manipulada a lei da bifurcação para remover as células livres do plasma sanguíneo [Yang et al. (2006)].

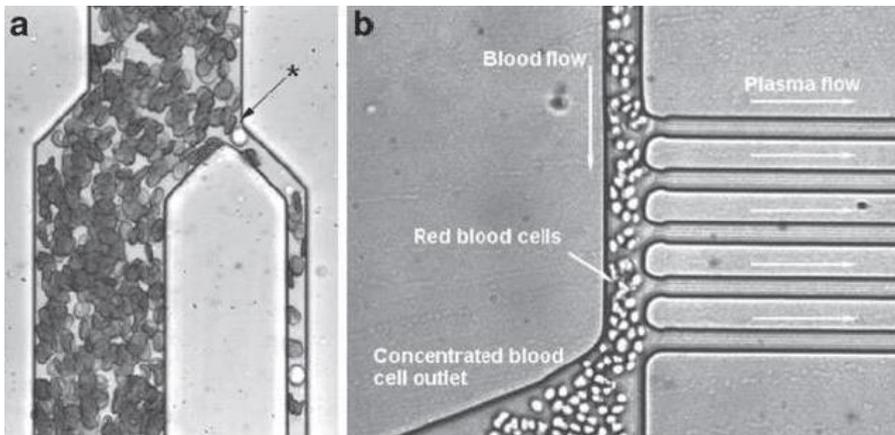


Figura 9: Microdispositivos que imitam as micro-vasculaturas através da biomimética [Gossett et al. (2010)].

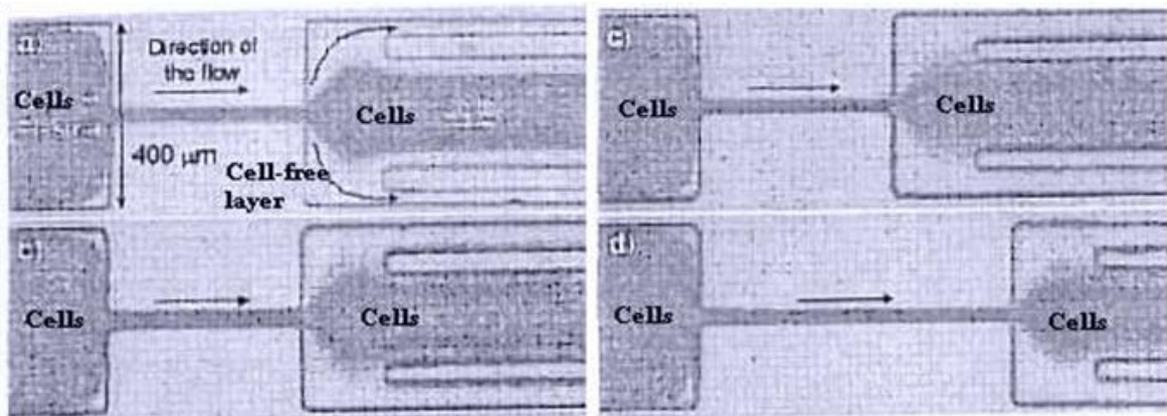


Figura 10: Microdispositivo para separar as células sanguíneas do plasma [Adaptado de Abkarian et al. (2006)].

2.4.5 Ótica

Técnicas óticas passivas, têm vindo a ser desenvolvidas, para uma possível separação do escoamento sanguíneo [MacDonald et al. (2003)].

As células mediante os seus estados biológicos têm **índices de refração** significativamente diferentes, possibilitando a separação das mesmas [Milne et al. (2007)]. Este tipo de técnica têm-se mostrado promissora no que diz respeito à separação de partículas de polímeros, no entanto, a separação de células sanguíneas ainda continua a ser investigada. Na literatura, até ao momento, não existem demonstrações bem-sucedidas de separação de

células usando este tipo de técnica. Este facto ocorre provavelmente devido à baixa eficiência de separação, possivelmente pela falta de conhecimento científico relativamente aos mecanismos responsáveis pela separação ótica [Gossett et al. (2010)].

2.5 **Técnicas de Visualização do Escoamento Sanguíneo na Micro-circulação**

Os instrumentos médicos convencionais não invasivos, usados na medição do escoamento sanguíneo em vasos sanguíneos de maior dimensão, são as técnicas de **ultra-som Doppler** e a **ressonância magnética (MRI)**.

Apesar de estas terem revolucionado o diagnóstico cardiovascular, estas técnicas de diagnóstico *in vivo* têm uma série de limitações. Entre elas, encontra-se a incapacidade de obter informações quantitativas detalhadas ao nível micro, devido essencialmente à pobre resolução espacial [Giddens et al. (1993) e Stanton (1999)]. O escoamento sanguíneo tanto nos micro-vasos como em micro-canais pode ser medido por meio de diversas técnicas, entre as quais, a fotometria e o laser *Doppler* anemómetro [Uijtewaal et al. (1994) e Golster et al. (1999)]. Contudo, as técnicas mais bem-sucedidas são as baseadas na captação de vídeos com o auxílio de câmaras de alta velocidade. Geralmente, estes métodos de registo de imagens de microscopia, usam técnicas de processamento de imagem. Devido à sua elevada resolução espacial e temporal, este método está a alcançar uma ampla utilização, para investigar diversos fenómenos na micro-circulação. No sistema de micro-PIV, usam-se microscópios convencionais, o que proporciona a iluminação não só do escoamento de interesse mas também das células situadas fora da zona de focagem, e assim produzir elevados níveis de ruído de fundo, o que poderá introduzir erros nos perfis de velocidade medidos [Meinhart et al. (1999 a/b, 2000) e Nguyen e Wereley (2002)]. Esta limitação pode ser superada através da utilização de um microscópio confocal de disco rotativo (SDCM), em vez do microscópio convencional [Ichihara et al. (1996), Tanaami et al. (2002) e Inoue e Inoue (2002)]. Segundo um estudo *in vitro* efetuado por Lima et al., um sistema constituído por um microscópio confocal de disco rotativo proporciona a redução de possíveis erros existentes nos perfis de velocidade e faculta o estudo de fenómenos fisiológicos de uma forma mais detalhada em micro-canais [Lima (2007)].

2.6 ***Deformabilidade dos Globúlos Vermelhos***

Os GVs são corpúsculos de reduzida dimensão, o que torna difícil a avaliação correta dos fatores que atuam na sua deformabilidade e o perfeito entendimento da sua geometria [Saad (2002)]. A variabilidade da forma dos GVs, não só é observada ao nível da microcirculação como também em setores do sistema cardiovascular, como resposta às forças executadas pelo escoamento sanguíneo em setores arteriais e/ou venosos. Em termos gerais, quando a forma de disco bicôncavo que apresentam se vai transformando progressivamente numa elipse, o eixo maior fica paralelo à direção da corrente sanguínea [Seeley et al. (1997)].

A deformabilidade dos GVs reflete a facilidade com que estes mudam de forma, dependendo das forças mecânicas aplicadas, essencialmente na sua superfície exterior. Na maioria das vezes a alteração da configuração globular é condicionada pela forma como as forças mecânicas se distribuem na superfície dos GVs [Seeley et al. (1997)]. Sendo a deformabilidade considerada uma propriedade reológica dos GVs, depende de distintos parâmetros, sendo estes apresentados na Tabela 2. Esta deformabilidade, pode ser ou não examinada isoladamente, dependendo da técnica de medição eleita. Face a inúmeras investigações, concluiu-se que a deformabilidade é a medida mais geral de relações complexas, entre a biologia e a mecânica das células vermelhas do sangue, bem como as forças físicas que agem sobre a célula [Musielak (2009)]. Um dos objetivos principais é encontrar a relação empírica entre a força aplicada, e a tensão da célula em termos de deformação. Para que este objetivo possa ser concretizado, a técnica para medir a deformabilidade tem de satisfazer dois critérios: tem de ser um fator quantificável e fisicamente definido, fomentando uma modificação na forma da célula, e o grau de deformação tem de ser medido direta ou indiretamente de uma forma sensível e reprodutível [Musielak (2009)].

Tabela 2: Propriedades reológicas dos GV's em adultos normais [Adaptado de Musielak (2009)].

Parâmetro	Valor típico	Notas
Área de superfície, S	~110-140 [μm]	Dispositivo paralelo de micro-canais
Membrana de corte	6.0 ± 0.9 [μNm^{-1}]	Aspiração por micropipetas
Membrana de flexão	1.6×10^{-19} [Nm]	Aspiração por micropipetas
Módulo de elasticidade	2.4-11.3 [μNm^{-1}]	Raios laser
Módulo de elasticidade para a área de compressibilidade	300-600 [mNm^{-1}]	Membrana celular extremamente resistente a dilatação
Tempo de recuperação de forma após deformação de flexão	0.31 [s]	Aspiração por micropipetas
Viscosidade citoplasmática	6.4 [mPa.s]	Dependente da concentração média de hemoglobina
Viscosidade membranar	0.6-2.7 [μNm^{-1}] s	Aspiração por micropipetas
	0.3-2.8 [μNm^{-1}] s	Raios laser
Volume da célula, V	~ 80-100 [fl]	Contador de células automático

A ampla variedade de técnicas disponíveis espelha a constante dificuldade em aplicar um método que quantifique com exatidão a deformabilidade dos GV's. A deformabilidade é ainda encarada como a característica que faculta ao GV normal (**7-8 μm**), escoar por capilares até 3 μm . O termo de deformabilidade dos GV's é ainda aplicado, para representar a propriedade de adaptação dos GV's ao escoamento durante os 120 dias, que normalmente permanecem na circulação [Reinhart e Sing (1990), Mohandas e Chasis (1993), Saad (2002) e Patavino et al. (2006)]. O fenómeno da deformação dos GV's é dependente de vários fatores, como por exemplo da **geometria celular** (dependendo da forma, volume e da relação superfície/volume dos GV's), da **viscosidade interna**, que depende da concentração de hemoglobina e de propriedades físico-químicas, e de **propriedades viscoelásticas da membrana eritrocitária**¹. Ainda relativamente à viscosidade interna, é importante referir que as células desidratadas com densidade interna mais elevada, têm a capacidade de se deformarem menos [Reinhart e Sing (1990), Mohandas e Chasis (1993), Saad (2002) e Patavino et al. (2006)].

¹ A membrana eritrocitária exerce um papel fundamental na aptidão dos GV's se deformarem, além de manter a sua integridade estrutural [Saad (2002)].

2.6.1 Métodos de estudo da Deformabilidade dos Eritrócitos

Os principais métodos utilizados para estudar a Deformabilidade dos Eritrócitos (DE), são os seguintes: filtração, aspiração por micropipeta, (também designado de sucção por micropipeta), hemólise osmótica, observação microscópica, ectacitometria e força de microscopia atômica [Chien (1981), Patavino et al. (2006)].

A técnica de **filtração** consiste na passagem de uma amostra de sangue, em filtros com poros de distintas dimensões, exercendo uma pressão constante. Quando se estuda o sangue por este método, elementos como proteínas plasmáticas, GBs e plaquetas podem influenciar a sua análise, o que limita o seu uso [Chien (1981) e Patavino et al. (2006)]. Pode ainda ser referido, que os métodos de filtração de sangue total ou em suspensões eritrocitária, através de filtros ou poros (Figura 11), com diâmetro inferior aos globulares (aproximadamente 8 μm) são os mais difundidos. Contudo, ostentam agentes condicionantes a serem tidos em conta, como as condições de filtração, tipo de filtro, meio de suspensão e processo de determinação [Dormandy (1983) e Kieseweter et al. (1991)]. Na Figura 11, pode-se visualizar GVs adjacentes a poros de um filtro “*Nucleopore*”, possuindo esses poros um diâmetro de 5 μm . Em (a) observa-se um GV a deformar-se para atravessar o poro, ao passo que em (b), observam-se GVs sem capacidade de deformação, logo não conseguem atravessar os poros do filtro [Silva e Saldanha (2005)].

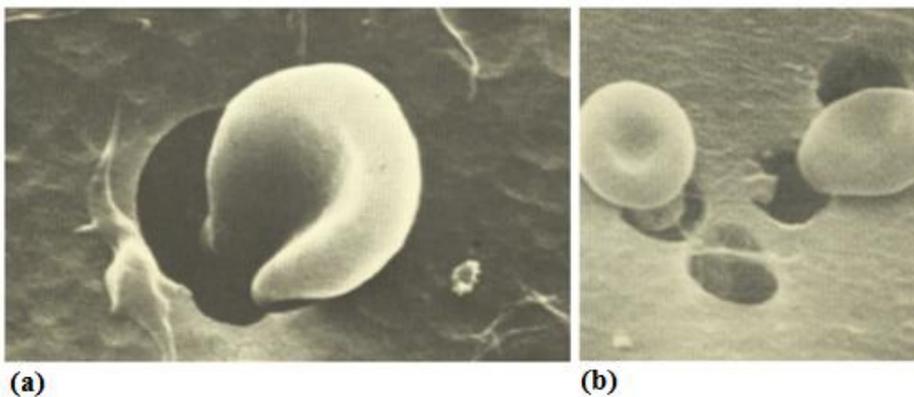


Figura 11: Visualização de GVs adjacentes a poros de um filtro “*Nucleopore*” [Adaptado de Silva e Saldanha, (2005)].

O método “*Single Pore Rigidometer*” consiste na determinação do tempo de filtração que cada GV demora a passar num único poro com diâmetro fixo. Esta técnica que supostamente seria a mais exata, exige equipamento sofisticado e caro, pelo que não passou

da fase de protótipo [Silva e Saldanha (2005)]. Na Figura 12, pode-se observar o equipamento “*Single Pore Rigidometer*”, usado na medição da deformabilidade de GVs [Kieseweter et al. (1991)].

A principal vantagem desta técnica é a sua simplicidade, ao passo que, tem como inconveniente a interferência de vários fatores, como as propriedades dos filtros.



Figura 12: Equipamento “*Single Pore Rigidometer*” [Adaptado de Kieseweter et al. (1991)].

A **Aspiração por Micropipeta** baseia-se na medição da pressão (estabelecida por vácuo) exigida para aspirar cada GV ou parte da sua membrana, através de uma micropipeta de vidro [Leblond (1973), Brooks e Evans (1987)]. Fundamenta-se ainda na aplicação de uma pressão negativa sobre a membrana eritrocitária, fazendo com que a célula penetre no capilar de vidro. A deformabilidade pode ser visualizada por micro-cinematografia, possibilitando assim um estudo pormenorizado do fenómeno. É uma técnica morosa e permite apenas o estudo de células individualizadas [Mohandas e Chasis (1993)].

A **Hemólise Osmótica** é um dos métodos clássicos usados na hematologia. Este emprega soluções hipotónicas, sendo os resultados da hemólise expressos em função da osmolalidade do meio. Este processo dispõe de um equipamento informatizado que avalia o módulo de elasticidade da membrana [Silva e Saldanha (2005)].

No **Método de Visualização Microscópica** dos GVs num viscosímetro, os GVs suspensos num meio de grande viscosidade (por exemplo *Dextrano*), são visualizados ao microscópio sob as divergentes forças de corte induzidas no viscosímetro. Nestas condições, os GVs discóides convertem-se em elípticos, com o seu maior eixo, paralelo ao sentido do

escoamento. Esta técnica possibilita a observação direta das alterações da célula [Silveira et al. (1997)].

A **Ectacitometria** foi relatada por Bessis e Mohandas, em 1974, e é uma técnica que faculta a análise dos distintos agentes que influenciam a deformabilidade eritrocitária, sendo exequível estimar a relação área de superfície/volume, a geometria celular, a densidade celular e a membrana citoplasmática. Baseia-se no uso de um viscosímetro de escoamento laminar, no qual as transformações da forma dos GVs são monitorizadas continuamente por um feixe de raio laser e processados por um micro computador, que determina o índice de deformabilidade (ID). Esta técnica possibilita, o estudo das células com distintas condições de tonicidade, quando associadas a um gradiente de osmolalidade [Bessi e Mohandas (1974), Streekstra et al. (1993), Johnson (1994), Streekstra et al. (1994), Shin et al. (2005) e Patavino et al. (2006)].

O ectacitómetro é considerado um instrumento versátil e sofisticado, com a primazia de utilizar apenas uma reduzida porção de sangue e um coeficiente de variação próximo de 1%, o que eleva a sua sensibilidade. Neste instrumento a tensão de corte² é fixa, ou seja, não existe variação do recipiente onde a amostra é estudada, assim sendo, as alterações observadas dependem de alterações próprias dos GVs. Estes, quando se encontram em repouso, concebem um padrão de difração circular no ectacitómetro, sucedendo a modificação elíptica e a orientação paralela ao fluxo, quando submetidos à tensão [Bessis (1974) e Johnson (1994)].

O estudo da deformabilidade dos GVs, através da técnica de ectacitometria tem vindo a ser considerada como bastante promissora, face às técnicas já existentes, representando um dos passos fundamentais no diagnóstico das patologias por defeito de membrana [Johnson (1994), Streeksha et al. (1994) e Patavino (2006)]. Na Figura 13, pode-se visualizar o equipamento usado na determinação automática da deformabilidade eritrocitária por difração de laser.

² A tensão de corte na circulação normal é definida como a força de resistência tangencial, produzida pelo movimento do sangue na superfície vascular endotelial. A sua magnitude é diretamente proporcional ao escoamento e à viscosidade do sangue, e inversamente proporcional ao cubo do seu raio.

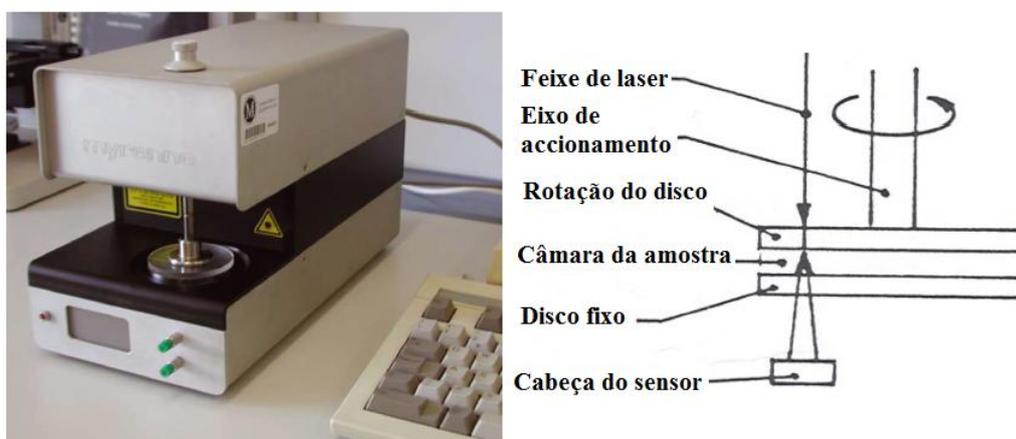


Figura 13: Equipamento “Rheodyn SSD (Myrenne, Roetgen, Germany) usado na determinação automática da DE por difração de laser [Adaptado de Silva e Saldanha (2005)].

O método de **Força de Microscopia Atômica (AFM)** é empregue na avaliação quantitativa de micro deformação, numa parte específica do biomaterial.

Os objetos em análise, neste caso os GVs, são colocados numa lâmina de vidro, que por sua vez, é colocada sobre uma zona do microscópio de luz invertida. A sonda do AFM atua perto ou longe da amostra, mediante um posicionador piezoelétrico de cerâmica que se deforma em resposta da tensão aplicada [Parot et al. (2007) e Radmacher (2007)].

Terceiro Capítulo

3 Micro-Fabricação

A indústria eletrônica passou por uma revolução significativa, como resultado do advento da miniaturização de componentes eletrônicos, como por exemplo o *chip* de silício [Regnier (1999)]. Muitos sistemas empregam micro estruturas integradas, fabricadas em vidro ou outros substratos, para produzir dispositivos [Tom MacCreedy (2000)]. A fabricação de dispositivos de microfluídica deve-se em muito à indústria eletrônica. Os μ TAS (*micro total analysis systems*), LOC's (*Lab on a chip*), *micro-chips* ou microdispositivos usados em microfluídica, podem ser fabricados através de tecnologias convencionais. Nas tecnologias convencionais são empregues os processos de fotolitografia, ao passo que dentro das tecnologias alternativas podem ser encontradas técnicas de micro-fabricação por moldação, ablação a laser e por um processo de impressão direta [Tom MacCreedy, (2000)]. Face às tecnologias convencionais, existe a necessidade do uso de uma fonte de energia, para efetuar a permutação da imagem dos micro-canais para o substrato usado. Normalmente, essa permutação é inicialmente feita para a superfície de um polímero sensível à radiação usada, denominado de fotorresiste (polímero líquido, fotossensível à luz UV) [Yong e Pépin (2001)].

A disponibilidade da fabricação e o equipamento necessário é talvez o fator chave na escolha de material do substrato, para a fabricação de *chips*. A escolha da técnica de fabricação e a escolha dos materiais a usar depende, em muito dos tamanhos pretendidos e da aplicação em questão (ver Figura 14).

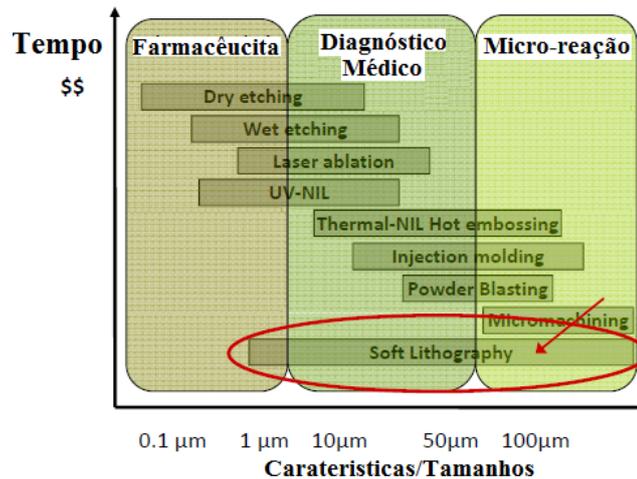


Figura 14: Escolha dos materiais relativamente à aplicação e ao tamanho pretendido [Adaptado de Yole Development (2011)].

Outros fatores importantes na escolha do material incluem, a compatibilidade química e as características da superfície interna (ver Figura 15). Com o crescente número de métodos de deposição disponíveis, a diversidade do material face ao substrato tem aumentado, incluindo agora, polímeros e plásticos [Tom MacCreedy, (2000) e Yole Development, (2011)].

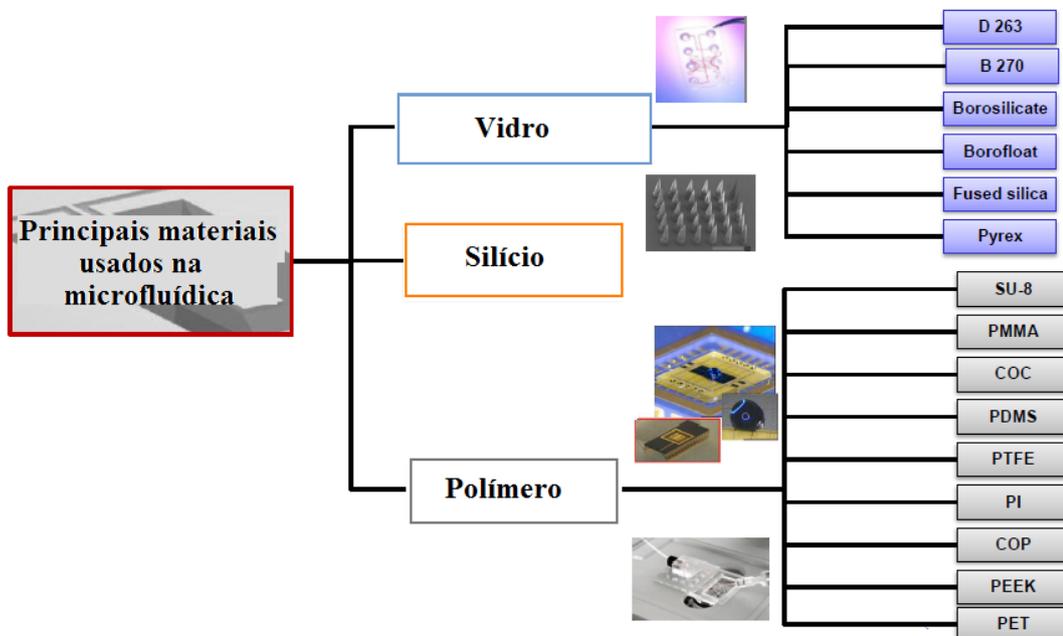


Figura 15: Principais materiais usados na microfluídica [Adaptado de Yole (2011)].

Os moldes deste projeto vão ser fabricados pela técnica de Fotolitografia e os micro-canais através da Litografia suave.

O diagrama apresentado na Figura 16 mostra a sequência de passos necessários para a fabricação dos canais.

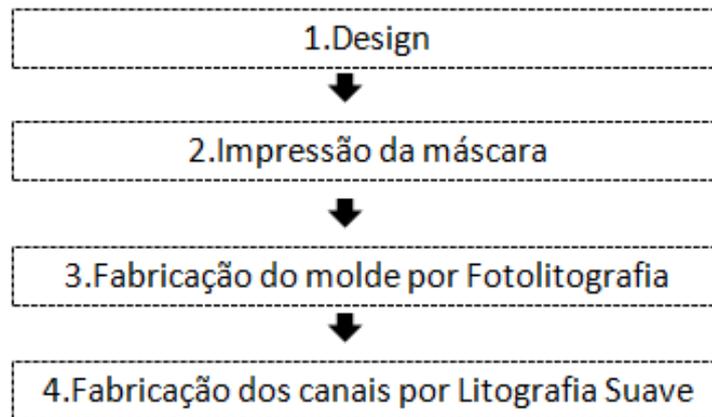


Figura 16: Fabricação dos canais.

Visto ser a Fotolitografia com radiação ultravioleta a empregar para a realização deste projeto, será aprofundadamente abordada no subcapítulo 3.1.

3.1 **Fabricação do molde por fotolitografia**

O processo de **fotolitografia** tem como intuito obter moldes em fotorresiste, sobre um substrato. Este processo advém da tecnologia planar (constitui a base dos processos de fabricação dos dispositivos e circuitos integrados) [Swart (2002)].

Para que o processo de fotolitografia se realize, é necessário seguir uma série de etapas. Na primeira etapa, deposita-se uma fina camada de fotorresiste sobre o substrato por centrifugação, com o auxílio de um *spin coater*. Seguidamente, o fotorresiste é curado a uma temperatura apropriada (em estufa ou num disco de aquecimento, no projeto em questão foi usado o disco de aquecimento), para que se realize a evaporação do solvente e a solidificação do fotorresiste. Posteriormente, a camada de fotorresiste é exposta à luz UV, através de uma máscara, usando um equipamento que permita alinhar o substrato, máscara e luz UV. A máscara é composta por partes claras e opacas que definem o padrão, que posteriormente será passado para o filme do fotorresiste. Após a exposição, é efetuada a revelação química do fotorresiste. O revelador tem como função, dissolver as partes expostas ou não expostas,

dependendo do tipo de fotorresiste (positivo ou negativo) empregue no processo [Swart (2002)]. O diagrama apresentado na Figura 17 mostra a sequência de passos do processo de fotolitografia, usado neste projeto.

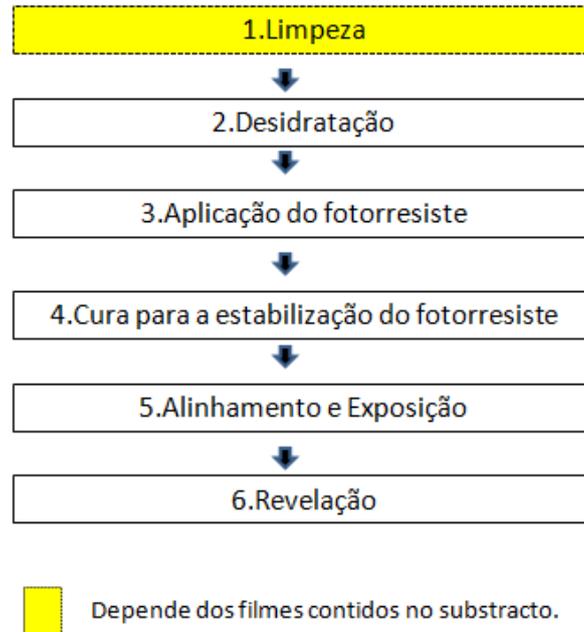


Figura 17:Fases da Fotolitografia.

De seguida, são apresentadas e descritas as etapas padrão usadas no processo de fotolitografia, no decorrer do presente projeto.

3.1.1 Limpeza

O objetivo da limpeza é reduzir ao máximo os contaminantes que possivelmente se tenham depositado na lâmina durante o seu processamento, manipulação e transporte. Dependendo do processo de fabrico, esta etapa pode ou não ser realizada, já que as substâncias empregues, nesta etapa, vão depender dos filmes presentes na lâmina [Balloni (1999) Junior (2004)]. As impurezas a serem eliminadas são essencialmente partículas de pó e materiais orgânicos, tendo esta etapa uma significativa interferência sobre a adesão do filme de fotorresiste ao substrato (estando os problemas de aderência relacionados principalmente com os materiais orgânicos) e sobre a quantidade de imperfeições no filme de fotorresiste depositado (estando este problema maioritariamente associado às partículas encontradas sobre

a superfície da lâmina), o que terá um impacto significativo na qualidade final dos microdispositivos [Balloni (1999) e Junior (2004)].

3.1.2 Desidratação

A etapa de desidratação tem como finalidade reduzir de forma máxima a humidade existente sobre a superfície do substrato. A desidratação é realizada através da evaporação, pelo aquecimento do substrato num disco de aquecimento [Mishra (2002) e Junior (2004)]. Para um adequado controlo do processo de desidratação do substrato, deve-se dar especial atenção a variáveis como a humidade ambiente, a temperatura do disco de aquecimento, a temperatura ambiente, o tempo de desidratação, entre outras [Mishra (2002) e Junior (2004)].

3.1.3 Aplicação do fotorresiste

Esta etapa tem como finalidade depositar um filme de fotorresiste uniforme e de espessura controlada sobre o substrato. Neste processo o fotorresiste é disperso sobre o substrato usando um *spin coater*, através do mecanismo ou força de centrifugação, ou seja, depositando o fotorresiste no centro ou em toda a superfície da lâmina com esta em repouso, aplicando de seguida o mecanismo ou força de centrifugação [Mishra (2002) e Junior (2004)].

A Figura 18 exemplifica o processo referido anteriormente, onde inicialmente é colocada uma fração de fotorresiste sobre o substrato, com um doseador, sendo de seguida acionado o mecanismo de centrifugação.

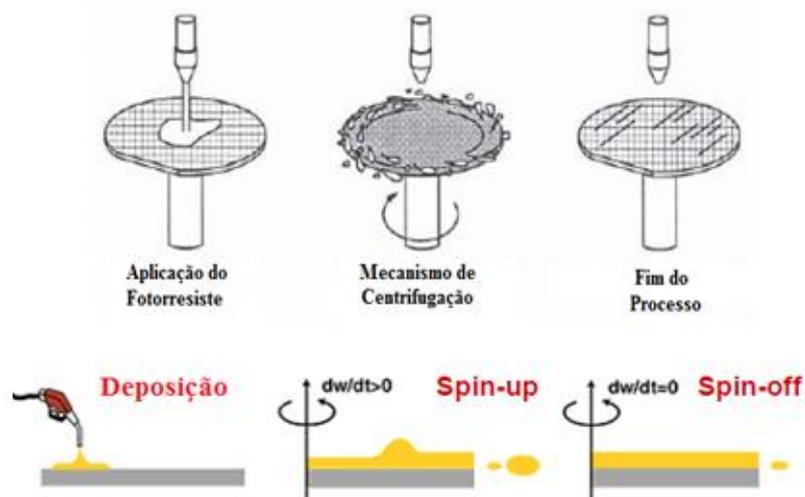


Figura 18: Processo de aplicação do fotorresiste [Adaptado de Mishra (2002) e Tamaiuolo (2008)].

Esta etapa tem grande influência sobre a adesão do filme de fotorresiste ao substrato e sobre a espessura do filme de fotorresiste, salientando que as variáveis de maior interesse nesta etapa são, a humidade do ar, a temperatura ambiente, a aceleração e a desaceleração do mecanismo de centrifugação, a velocidade e tempo de rotação e o controlo do fluxo de ar sobre o substrato, [Mishra (2002) e Junior (2004)].

3.1.4 Cura para a estabilização do fotorresiste

Nesta fase é usada um sistema de alinhamento, para se proceder ao alinhamento e exposição do filme, através de uma máscara. Nesta parte do procedimento, é executado o controlo do volume de solvente existente no filme, aumentando a aderência e aliviando as tensões mecânicas causadas pelo movimento centrífugo. Desta forma é concretizado o objetivo desta fase, que é aumentar a estabilidade e uniformidade do filme, [Lin e Chen (2001) e Junior (2004)]. Existe uma série de equipamentos que podem ser usados para a execução desta fase, sendo que os mais usados são a estufa e o disco de aquecimento. Quando esta se realiza na estufa, o aquecimento acontece da superfície para o interior do filme, ao passo que, quando esta se realiza no disco de aquecimento (caso em estudo), este aquece a lâmina, e a própria lâmina aquece o filme [Junior (2004)]. O uso do disco de aquecimento proporciona uma maior adesão do filme ao substrato, fator de extrema importância quando se proceder à revelação. Deve-se ter em conta as disparidades entre as condutividades térmicas e as espessuras dos materiais abrangidos, na seleção do tempo de processo de prebake [Junior (2004)].

3.1.5 Alinhamento e Exposição do fotorresiste

O alinhamento é considerado crucial, nomeadamente quando se pretende fabricar moldes com várias *layers* ou camadas, já que este é determinante na determinação das posições corretas na lâmina. A exatidão deste alinhamento depende de fatores como, o sistema mecânico de posicionamento da mesa, marcas que definem o alinhamento e o próprio sistema usado para o reconhecimento das marcas [Junior (2004)].

Depois de feito o alinhamento, o filme vai ser exposto à luz UV através da máscara. As regiões do filme que forem expostas vão sofrer modificações químicas. Logo, após a exposição à luz ultravioleta (UV), as secções do filme que não ostentam proteção pela

máscara, demonstrarão um acréscimo de solubilidade na solução reveladora, isto graças à alteração do inibidor de solubilidade [Junior (2004)]. Os equipamentos usados nesta fase de exposição são equipamentos empregues para efetuar a transferência ou réplica dos padrões da máscara para o filme do fotorresiste.

3.1.6 Revelação

A última etapa do processo de fotolitografia denomina-se de revelação. Esta tem como finalidade eliminar o filme de fotorresiste das áreas excluídas durante o processo de exposição e preservação do filme exposto à iluminação UV [Junior (2004)].

3.2 Fabricação de micro-canais por Litografia suave

O processo de Litografia suave consiste na fabricação de micro-canais planares em polidimetilsiloxano (PDMS) após a obtenção dos moldes em fotorresiste, por intermédio do processo de fotolitografia. Na Figura 19, é ilustrado o processo de litografia suave usado para a fabricação de micro-canais em PDMS, usando os moldes gerados na fotolitografia como explicado na seção 3.1. Na última fase deste processo, o líquido precursor (PDMS) é misturado com o seu agente de cura, sendo posteriormente espalhado sobre o molde, que possui o *design* pretendido, (é importante frisar que o PDMS é normalmente curado a uma temperatura de 80°C durante aproximadamente 2 horas) [Nianzhen et al. (2003)]. No final, a réplica pode ser retirada do molde, referindo ainda que este molde pode ser utilizado para fazer um grande número de réplicas [Nianzhen et al. (2003)], como se pode visualizar na Figura 19b).

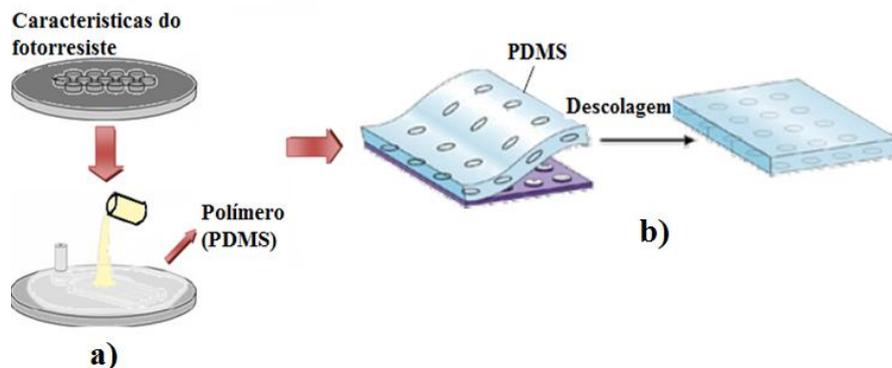


Figura 19: Processo global até à fabricação do modelo em PDMS e posterior descolagem do molde [Adaptado de Nianzhen et al. (2003) e Tamaiuolo (2008)].

3.2.1 Polímeros usados na Litografia suave

Em 1824, *Berzelius* descobriu o átomo de silício, seguido da descoberta da síntese dos primeiros compostos orgânicos de silício por *Friedel e Craft* em 1863 [Dias (2004)]. Em 1901, *Kipping* descreveu compostos que possuíam como fórmula química R_2SiO , que por semelhança a cetonas designou de silicones, assimilando seguidamente estruturas poliméricas, que equivalem ao *polidimetisiloxano* (PDMS). Em 1940, quando *Hyde Dow Corning* evidenciou que estas substâncias possuíam uma elevada estabilidade térmica e uma grande resistência elétrica, estas substâncias tornaram-se comerciais [Dias (2004)].

Os silicones são denominados de polímeros sintéticos de fórmula química R_2SiO , onde átomos de silício se encontram ligados a átomos de oxigénio, formando deste modo cadeias de siloxano. Nestas cadeias de siloxano, os átomos de silício, estão habitualmente ligados a dois diferentes grupos, onde a ligação mais comum é a dos grupos metil, formando neste caso os polidimetilsiloxanos [Arruda, (2004)]. Na Figura 20, pode-se visualizar a estrutura do PDMS.

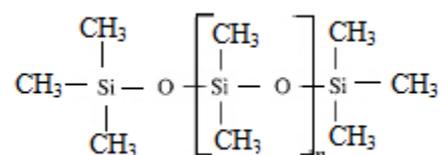


Figura 20: Estrutura do polidimetilsiloxano, onde n representa o número de unidades monoméricas, [Adaptado de Somosundaran et al. (2006)].

O PDMS é considerado quimicamente estável, o que significa que não irá reagir com muitos outros polímeros. A permeabilidade do PDMS a gases e ao vapor de água, deve-se à geometria da molécula, que além de apresentar um maior comprimento de ligação Si-O do que C-O, apresenta um ângulo de ligação Si-O de 130° , enquanto o C-O possui um ângulo de ligação de 111° , tornando a molécula mais plana, facultando assim a permeabilidade a gases e vapor de água [Arruda (2004)].

3.2.2 Vantagens e Inconvenientes do PDMS

Como todos os polímeros, o PDMS também possui vantagens e inconvenientes, sendo estes referidos seguidamente.

Uma das vantagens do PDMS é a reduzida energia livre de superfície. Outro fator importante é o facto do PDMS se deformar mecanicamente, com esta característica pode-se conseguir alterar as formas pela aplicação de força. É também considerado um elastómero suave, o que o torna flexível tendo a vantagem de não quebrar [Bokhorst (2010)]. Pode-se ainda referir que este polímero, ajusta-se em superfícies curvas ou mesmo em 3D de tamanhos à escala micron [Banks (2002)]. Este polímero é impermeável a líquidos e permeável a gases. Por esta razão se por casualidade entrarem bolhas de ar nos micro-canais, estas podem ser forçadas a sair através das paredes [Arruda (2004)]. O facto de este possuir uma boa transparência ótica, torna-se uma vantagem em visualizações de escoamento. Apresenta ainda boas propriedades de adesão a materiais rígidos, o que é útil quando os micro-canais necessitam de ser selados com placas de vidro, sendo termicamente estável até 186°C, o que torna possível a cura térmica [Bokhorst (2010)].

Este polímero é bastante duradouro, uma vez que depois de desenvolvido o seu molde pode ser usado diversas vezes (cerca de 50 vezes) sem que ocorra qualquer deterioração suscetível [Wang et al. (1997)]. As propriedades de superfície do PDMS podem ser alteradas por funcionalização de moléculas, tratamento com plasma ou alterando a taxa de ligações cruzadas. Por todas estas razões, pode-se referir que o PDMS é um polímero de grande versatilidade, para ser empregue como biomaterial [Tejal (2000)]. Contudo, o PDMS também possui inconvenientes como o facto de este polímero passar por um processo de encolhimento até 1%, após a cura. Pode-se ainda referir que com elevados caudais, a pressão será alta e isso pode resultar na expansão e deformação dos canais. Para finalizar, o facto de o PDMS ser hidrofóbico, pode provocar bolhas aprisionadas nos cantos dos micro-canais [Bokhorst (2010)].

3.3 ***BioMEMS, Uma Nova Geração de Micro-Canais***

Durante os últimos anos, vários investigadores obtiveram resultados discordantes entre os ensaios experimentais obtidos *in vivo* e os ensaios obtidos *in vitro*, com a utilização de capilares de vidro. Uma forma bastante promissora de superar as limitações dos capilares de vidro, é através da utilização de sistemas micro eletromecânicos (MEMS) para a fabricação de microdispositivos com características mais próximas dos sistemas *in vivo*.

3.3.1 BioMEMS

Os sistemas eletromecânicos (MEMS), são usados na fabricação de micro- dispositivos para subsequentes estudos *in vitro* do escoamento sanguíneo, num ambiente mais próximo daquele existente nas condições *in vivo*, através de dispositivos BioMEMS ou simplesmente *bio chips*.

O processo de litografia suave possibilita fabricar micro-canais com complexas geometrias, semelhantes às arteríolas do sangue humano e às redes capilares. A capacidade de se replicar geometrias complexas do sistema micro-cardiovascular, com elevada precisão, fizeram da litografia suave um método muito benéfico para o estudo das células [Abkarian et al. (2006)]. No entanto, a litografia suave tem como principal inconveniente, o facto da secção transversal dos micro-canais ser retangular e não circular, sendo a circular, a típica nos vasos sanguíneos [Xia e Whitesides (1998)]. Em canais retangulares, a área de contato das células confinadas com as paredes dos micro-canais é reduzida, e o perfil das células difere para um canal onde a secção existente é circular, [Pries et al. (1994) and Suzuki et al. (1996)].

Como curiosidade, pode-se referir que já foram produzidos projetos para micro-canais com secção transversal circular. Num deles, os canais foram fabricados por fundição do PDMS, em torno de modelos como o vidro [Perry et al. (2007)], hastes de aço inoxidável [Stadnik et al. (2005), Dahlin et al. (2005) e Jia et al. (2008)], fios e nylon [Verma et al. (2006)]. Na Figura 21, pode-se observar um método muito útil que inclui a fabricação de canais de PDMS com uma secção transversal **retangular**, seguido por uma transformação, que os torna **circulares** [Linsey et al. 2010)].

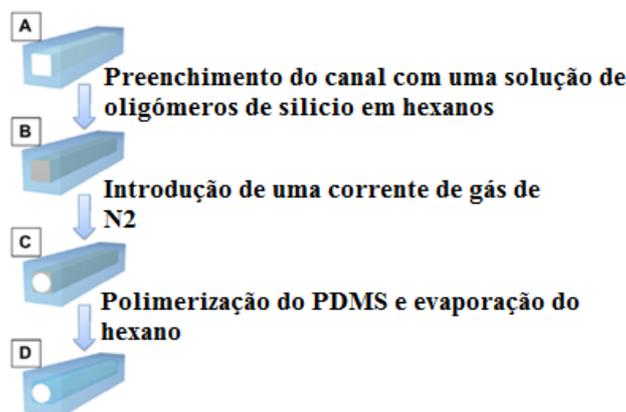


Figura 21: Desenho esquemático da fabricação de micro-canais com secções transversais circulares [Adaptado de Linsey et al. 2010)].

Quarto Capítulo

4 Fabricação e Caracterização dos Micro-Canais

Neste capítulo serão expostos e explicados quais os equipamentos usados na modelação geométrica, fabricação e caracterização dos micro-canais, bem como o funcionamento destes mesmos. A sequência apresentada na Figura 22 mostra o fluxograma das etapas desde a modelação geométrica até à caracterização dos micro-canais.

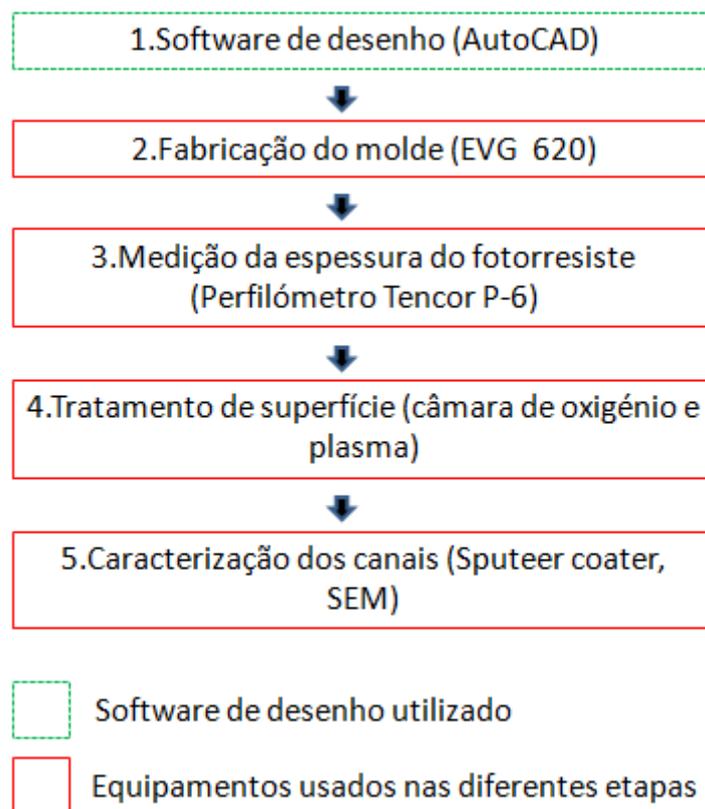


Figura 22: Etapas desde a modelação geométrica até à caracterização dos micro-canais realizadas no CEIT.

4.1 Métodos e Materiais

Neste capítulo será referido, todo o tipo de material e equipamentos utilizados no centro de investigação *CEIT*, desde a modelação geométrica até à caracterização dos micro-canais.

4.1.1 Confeção da Máscara Litográfica

O passo inicial, no processo de desenvolvimento do microdispositivo biomédico para a separação e deformação de eritrócitos, é a modelação geométrica para um posterior fabrico das máscaras litográficas. As geometrias dos micro-canais foram desenhadas através do *software AutoCAD (Computer Aided Design)*, onde os padrões serão posteriormente transmitidos para a lâmina de silício. O *AutoCAD*, é um *software standard* com desenho assistido por computador (CAD). Este, abrange os programas com funções aptas de conceber e /ou modificar desenhos vetoriais [Marques et al. (2004)].

Na Figura 23, podem ser visualizadas as primeiras máscaras desenvolvidas numa primeira fase deste projeto.

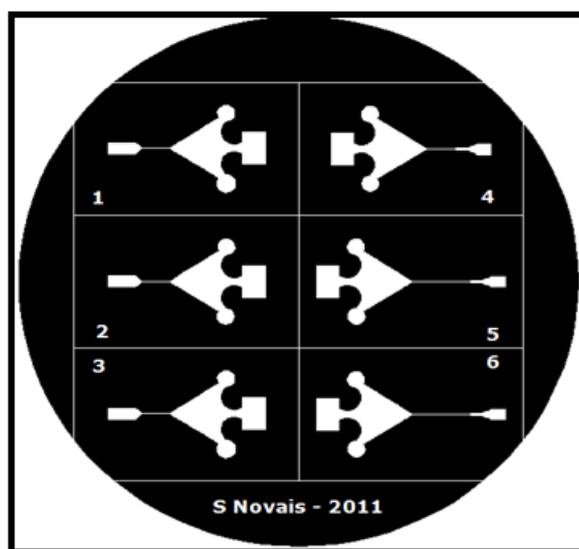


Figura 23: Geometrias iniciais para estudar a separação dos GVs.

Estas geometrias têm como principais diferenças estruturais o comprimento e largura dos canais principais e formato das entradas dos canais, como se pode visualizar na Figura 24. Exemplificando a **geometria 1** e a **geometria 3**, são iguais e têm 5000 μm de comprimento do micro-canal principal e 300 μm de largura. Nos mesmos pontos em questão (comprimento do micro-canal principal e largura do micro canal), a **geometria 2**, possui um comprimento de

5000 μm e uma largura de 500 μm . A **geometria 4**, tem as mesmas dimensões que a geometria 2, variando apenas o formato da entrada. A **geometria 5 e 6** são iguais, possuindo um comprimento de 10000 μm e uma largura do micro-canal de 500 μm .



Figura 24:Diferenças estruturais das geometrias.

4.1.2 Processo de Fotolitografia (fabricação do molde)

Em sistema de microfluidica, a redução de tamanho e volume possibilita definir e manipular o ambiente em questão. Para fabricar este sistema foi usado o processo de fotolitografia para se proceder à fabricação do molde. Este processo foi realizado na sala limpa do centro de investigação (CEIT), tendo-se usado a *insoladora / alineadora*, **EVG 620**³, equipamento referido de seguida. De uma forma geral, este equipamento designado de *insoladora/ alineadora* EVG, modelo 620, é usada no alinhamento e na projeção de luz ultravioleta em *wafers* até 150x150 mm. Possui uma precisão de alinhamento de 1 micron e uma resolução de 1 micron em vácuo. Na Figura 25, é exequível a observação de duas imagens relativas a este equipamento, que se encontram na sala limpa do CEIT, de classe **sala 100**. A imagem do lado esquerdo da Figura 25 representa o equipamento no seu todo, e a imagem do lado direito da figura, apenas representa o local apropriado para a colocação das *wafers*. Aqui, estas serão alinhadas sendo posteriormente realizada a transferência ou replicação dos padrões da máscara, para o filme do fotorresiste. Face a esta transferência, as áreas pretendidas serão definidas.

³ O EVG[®] 620 tem como fabricante a EVGroup.

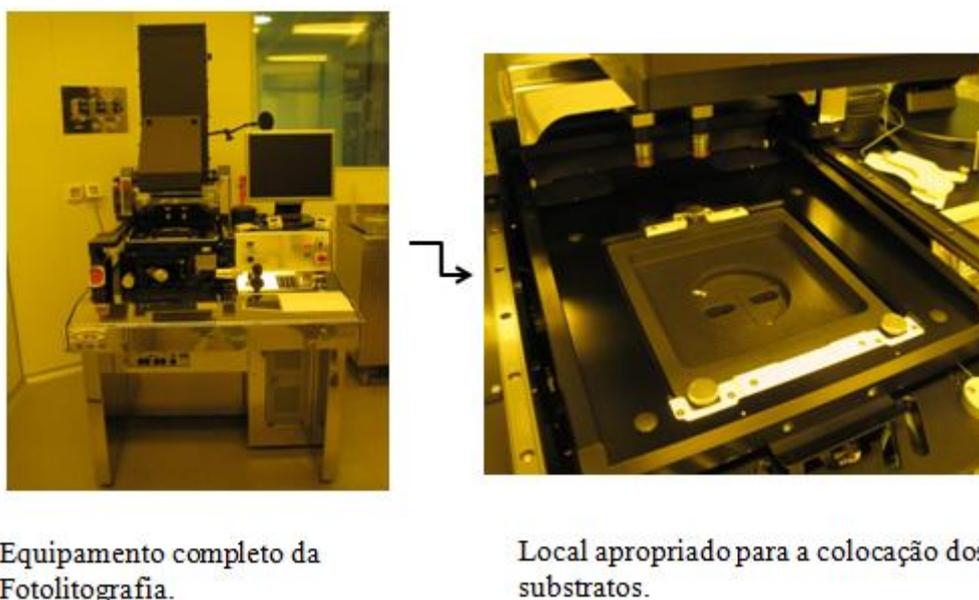


Figura 25: Representação do equipamento de fabricação do molde -EVG® 620.

4.1.3 Medição da espessura do fotorresiste depositado na wafer

Nesta fase e após a fabricação do molde através do processo de fotolitografia, foi necessário assegurar-se, que o fotorresiste depositado sobre a *wafer* atingiu a espessura desejada, sendo possível posteriormente fazer uma análise correta do pretendido. Para tal, usou-se o equipamento Perfilómetro Tencor P-6⁴. Este equipamento encontrava-se na sala limpa, classe 10 000 B, no CEIT. Em termos gerais, o perfilómetro mecânico P-6 faz varrimentos de comprimento máximo de aproximadamente 60 mm, e uma espessura máxima de 4 cm. Sendo ajustável numa força entre 0,1-50 mg e em mais de 40 parâmetros de superfície de forma automática. Permite ainda uma análise macroscópica topográfica, e um estudo microscópico aprofundado das superfícies (camadas de depósito, resinas) tanto em 2D como em 3D.

Um perfilómetro é usado, para estudar e analisar rugosidades e topografias de superfícies óticas e fibras, polímeros, semicondutores, entre outras. No caso em questão, usou-se para medir profundidades, dimensões de estruturas e espessuras de filmes finos. O princípio físico de funcionamento de um perfilómetro baseia-se numa ponteira conetada diretamente ao núcleo de um Transformador Diferencial Variável Linear (LVDT) [Ribeiro,

⁴ Este equipamento de versão 7.31 tem como fabricante o KLA-Tencor.

(2008)]. A medição é realizada a partir do movimento horizontal da ponteira, sobre a superfície do substrato. As alterações e rugosidades da superfície fazem com que a ponteira seja deslocada verticalmente [Ribeiro, (2008)]. É através do LVDT que o deslocamento na vertical é monitorizado, sendo o sinal elétrico na saída amplificado, digitalizado, processado e posteriormente mostrado num monitor de vídeo. Para se efetuar análises de rugosidade, a ponta é movida num comprimento, para que seja permitido expressar-se o desvio médio do perfil da amostra [Ribeiro, (2008)]. Este perfil é uma distribuição de valores da altura dos picos e vales, onde é criado uma curva de distribuição de amplitudes reconhecidas no perfil, [Ribeiro, (2008)]. Na Figura 26, pode-se visualizar o equipamento referido e um exemplo de um perfil obtido por este equipamento.

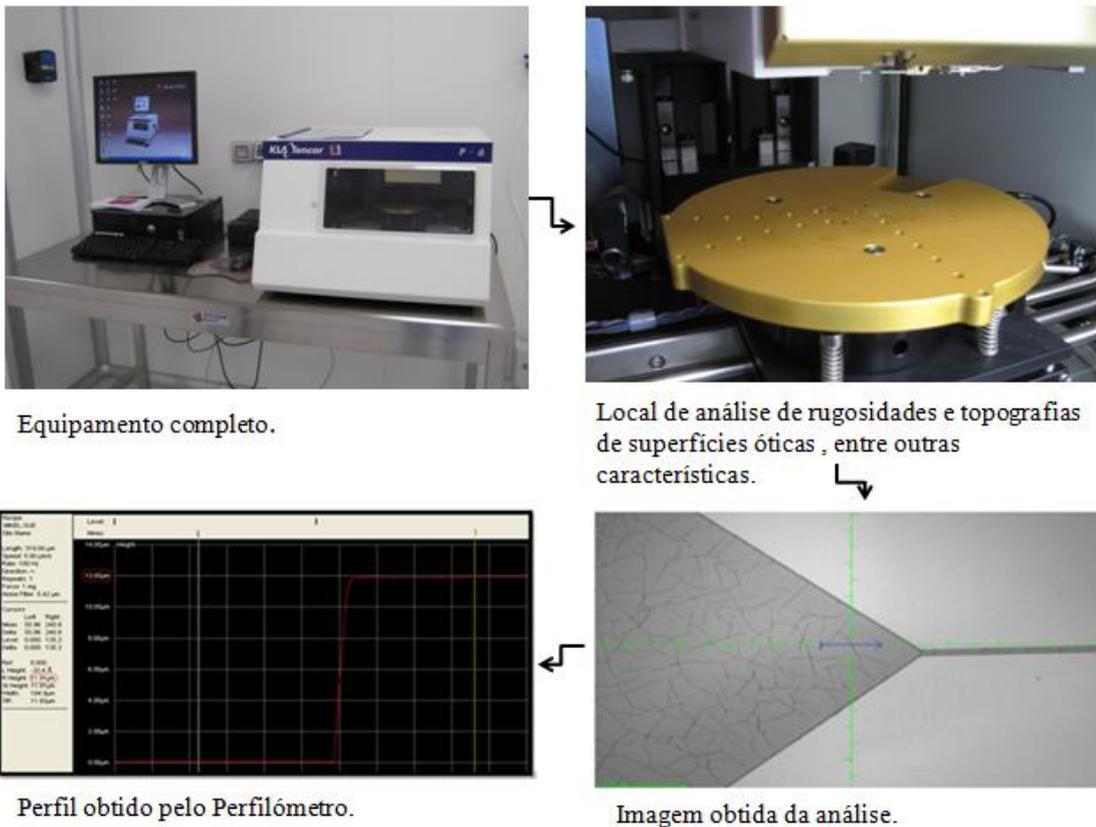


Figura 26: Representação do equipamento mecânico Perfilômetro P-6 e exemplo de um perfil obtido por este equipamento.

4.1.4 Fabricação dos moldes em PDMS (litografia suave)

Nesta fase, procede-se ao fabrico dos moldes em PDMS, para posteriormente se efetuar o tratamento de superfície dos substratos e moldes em PDMS. De uma forma sucinta, o esquema representado pela Figura 27, explica as fases da fabricação dos moldes em PDMS.

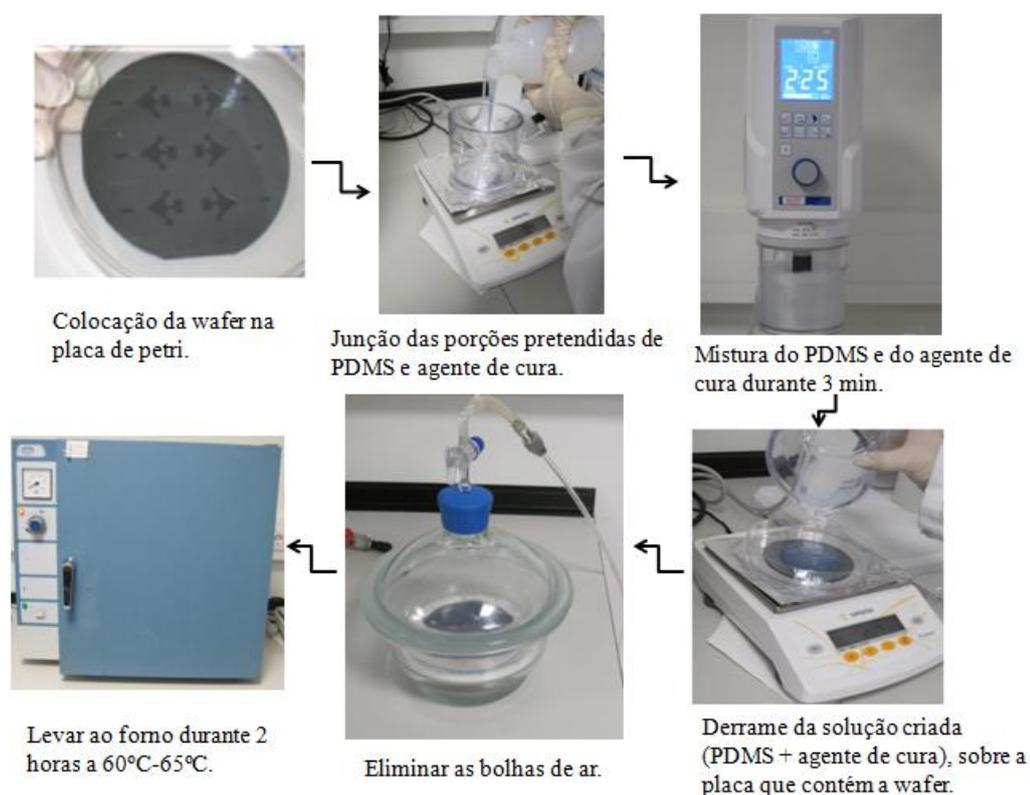


Figura 27: Fases da fabricação dos moldes em PDMS.

4.1.5 Tratamento de superfície

Nesta fase foi necessário fazer o tratamento de superfície, onde neste caso, são levados os *chips* (de PDMS) à câmara de plasma, antes de estes serem selados ao substrato final. Para tal, recorreu-se à câmara de oxigénio e plasma, que se encontra na sala limpa, classe 10 000 B do CEIT.

O equipamento de tratamento de superfície denomina-se Plasma-Surface- Technology⁵ (**câmara de oxigénio e plasma**).

⁵ O “Plasma-Surface-Technology” tem como fabricante o Diener electronic.

O tratamento de superfície por oxigénio e plasma tem como finalidade, limpeza e adesão permanente [McDonald et al. (2000) and Li et al. (2003)]. Inicialmente, é importante referir que, o PDMS pode replicar com precisão e com elevada fidelidade, características sub-mícron, podendo formar uma adesão reversível com superfícies lisas (daí se poder usar micro estruturas de superfície em PDMS, para se formar sistemas de micro-fluídica) e quando oxidadas por uma simples exposição ao oxigénio e plasma, ele pode ficar irreversivelmente ligado a si mesmo, ou ao vidro, silicone, poliestireno, entre outros, desde que estas superfícies também tenham sido expostas ao plasma, [McDonald et al. (2000) and Li et al. (2003)].

Contudo, é importante mencionar que o PDMS é hidrofóbico, o que pode constituir alguns desafios em aplicações de micro-fluídica, devido às elevadas pressões existentes nos micro-canais. No entanto, graças ao tratamento de oxigénio e plasma realizado, a superfície de PDMS foi tornada hidrofílica podendo recuperar a sua hidrofobicidade em poucos minutos quando em contacto com o ar [Yuan (2009)].

Na Figura 28, pode ser observado os principais passos para realizar este tipo de tratamento. Em termos gerais, inicialmente colocou-se o equipamento com os parâmetros indicados pelo fabricante, (como valores de pressões, tipo de gás a usar, entre outros), e posteriormente levou-se os substratos de vidro e os *chips* de PDMS à câmara de plasma durante 30 minutos. Finalmente, procedeu-se à selagem destes *chips* ao substrato, efetuando uma adesão irreversível.

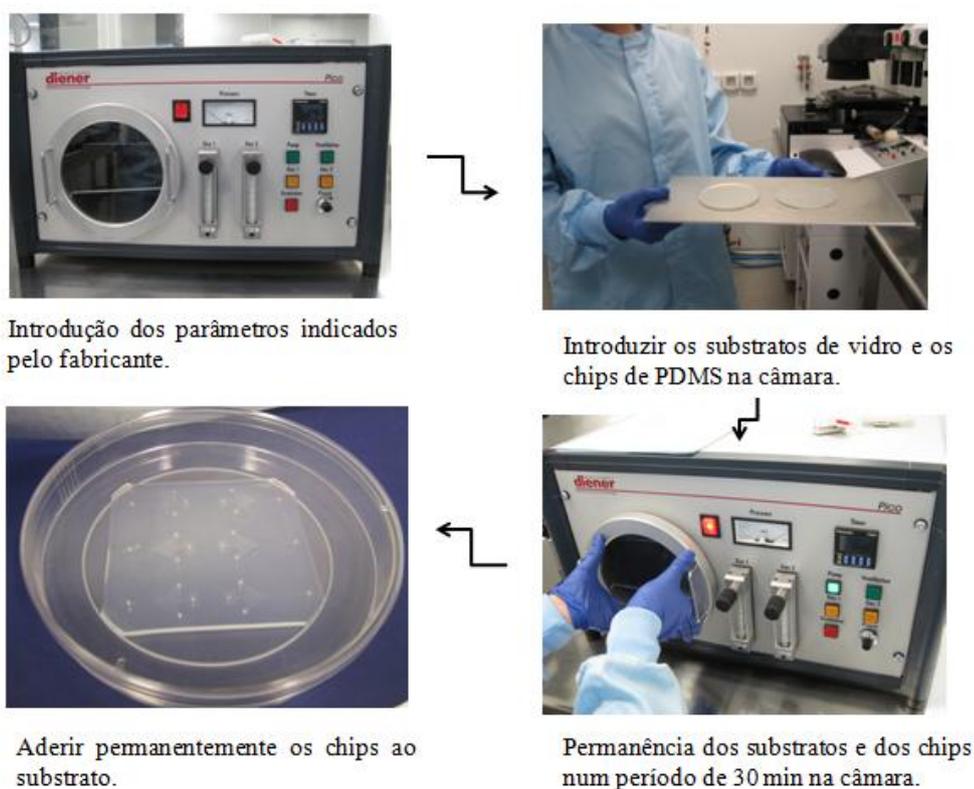


Figura 28: Demonstração dos principais passos a seguir na câmara de oxigénio/plasma.

4.1.6 Caracterização dos canais

Numa próxima fase e relativamente à caracterização dos canais, foi necessário proceder-se à realização de alguns passos, de forma a se poder continuar com a análise/estudo em questão. Para tal, no caso em estudo, foi necessário verificar a precisão dos padrões das máscaras, efetuadas no *software AutoCAD* que, posteriormente através do processo de fotolitografia foram transferidas ou replicadas para o filme de fotorresiste. Posto isto, foi necessário averiguar se todos os processos /etapas não alteraram em nada as medidas iniciais colocadas no *AutoCAD*, bem como observar a definição/ precisão dos canais desenhados. Para tal, recorreu-se ao Microscópio Eletrónico de Varrimento (MEV), mas antes teve de se usar a técnica de *sputtering*, para tornar **condutora** a amostra que posteriormente se vai utilizar no MEV.

Para se efetuar a caracterização dos micro-canais recorreu-se ao Sputter Coater⁶. Face a este equipamento é importante referir que, a deposição de filmes finos é considerada, um dos conjuntos de técnicas de maior importância. Normalmente, esta deposição de filmes pode ser realizada de duas maneiras, ou através de técnicas de deposição física ou por outro lado, através de deposição química. A técnica de pulverização catódica (*sputtering*, técnica usada neste projeto) pertence à classe das técnicas de deposição física de filmes finos. Neste tipo de técnica, o material a depositar denomina-se por alvo (*target*). É através do *sputter coater*, que se pode proceder à técnica de *Sputtering* [Correia e Carmo (2010)]. Esta técnica (*sputtering*) permite a deposição de materiais, sem uma adulteração significativa da composição inicial do material a depositar (alvo). Mediante o bombardeamento do alvo com um feixe de iões, os átomos ou as moléculas do alvo são exibidas da sua superfície, e depositadas sobre o substrato. É necessário ter em conta que antes de se realizar a deposição de filmes finos através deste tipo de técnica (*sputtering*), a pressão no interior da câmara de vácuo deve no mínimo estar abaixo de 10^{-4} Pa [Lorenzo e David (2009), Martins (2010) e Correia e Carmo (2010)]. Seguidamente, o material a depositar (alvo) é bombardeado por um fluxo de iões oriundo de um plasma, gerado a partir de um gás inerte (normalmente é usado o árgon). Nesta fase os iões formados no plasma são acelerados em direção ao material a ser depositado por um campo elétrico [Lorenzo e David (2009), Martins (2010) e Correia e Carmo (2010)].

Na Figura 29, pode-se visualizar o equipamento de deposição catódica (*Sputter coater*).



Figura 29: Equipamento de deposição catódica (*Sputter Coater*).

⁶ Este equipamento tem como fabricante a Emitech.

Após se ter tornado a amostra condutora, recorreu-se ao microscópio eletrônico de varrimento (MEV). Pode-se referir que o primeiro microscópio eletrônico de varrimento (MEV⁷) surgiu em 1932, desenvolvido por *Max Knoll* e *Ernest Renka Rusca*, na Alemanha. O método de microscopia eletrônica de varrimento (MEV ou SEM⁸) faculta a observação e a caracterização de materiais orgânicos e inorgânicos, numa escala micrométrica [Rezende (2007)]. As imagens que se obtêm através desta técnica são formadas a partir da interação de um feixe de elétrons focado sobre a amostra, e que varre a sua superfície ponto a ponto. As interações que ocorrem entre os elétrons do feixe primário e a amostra podem dar origem a elétrons secundários, elétrons retroespalhados, elétrons *Auger*, fótons de distintas energias, entre outros [Rezende (2007)]. Estes elétrons são obtidos em volumes de emissão específicos no interior da amostra, e demonstram relevantes características da mesma, como por exemplo, a composição elementar, o potencial elétrico, entre outras propriedades [Rezende (2007)]. Na imagem eletrônica de varrimento, os tons de cinza representam o mapeamento e a contagem de elétrons secundários, (SE⁹) e retroespalhados (BSE¹⁰) emitidos pelo material analisado, [Duarte et al. (2003)]. Na Figura 30, pode ser visualizado um esquema geral do microscópio eletrônico de varrimento.

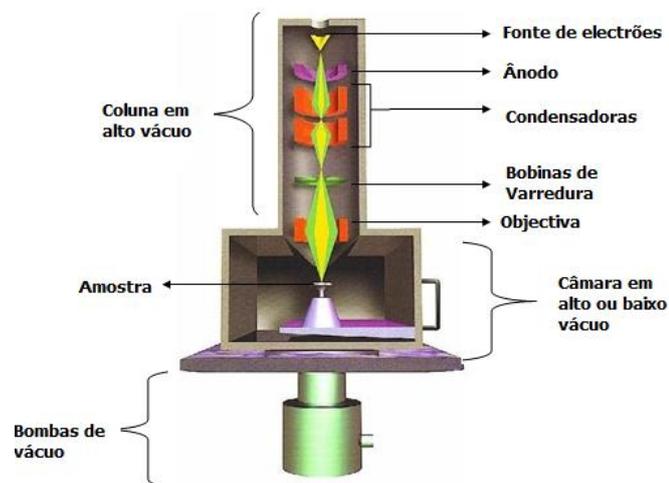


Figura 30:Esquema geral do MEV/SEM [Goldstein et al (1992)].

⁷ A sigla MEV será usada tanto para designar a técnica (microscopia) como o equipamento (microscópio).

⁸ SEM, do inglês *scanning electron microscopy* (ou *microscope*). Ambas as siglas (MEV ou SEM) são igualmente usadas.

⁹ SE, do inglês *secondary electron*.

¹⁰ BSE, do inglês *backscattered electron*.

A utilização deste tipo de microscopia traz uma vasta gama de **vantagens**, entre elas a sua elevada resolução, que pode chegar a ser da ordem de 2 a 5 nm, ao passo que o microscópio ótico convencional atinge apenas uma resolução de 0.5 μm [Goldstein et al. (1992)]. Além do mais, as imagens fornecidas através desta técnica possuem aparência tridimensional, consequência da elevada profundidade de campo que pode ser obtida, e dos efeitos de contraste (claro-escuro) originados pelos elétrons secundários e retroespalhados [Goldstein et al. (1992) e Rezende (2007)]. Esta técnica possui uma profundidade de campo na ordem dos 10 μm para aumentos de cerca de 10.000 X, chegando a 1 cm para aumentos de 20 X [Castro (2002)]. O facto de esta técnica permitir obter imagens com uma gama de aumentos muito variável, faz dela um instrumento vantajoso de aplicação [Rezende (2007)].

De referir ainda que a preparação das amostras é acessível, visto não precisarem de possuir transparência eletrónica. As amostras eletricamente isoladoras são revestidas por películas muito finas de materiais condutores, como é o caso da grafite, o ouro ou então uma liga ouro-paládio [Rezende (2007)]. Este revestimento amplia a produção de elétrons secundários, o escoamento de cargas elétricas e a dissipação de energia térmica, concebidos pela incidência do feixe de elétrons [Rezende (2007)]. Para finalizar, no MEV/SEM a amostra pode ser inclinada e em rotação sob o feixe eletrónico em todas as orientações [Castro (2002)].

4.2 **Fabricação**

Neste subcapítulo vai-se fazer referência a todo o processo de otimização do protocolo de fabricação do molde das geometrias em silício, até se ter atingido os requisitos mínimos para se proceder a essa mesma fabricação. Uma série de obstáculos foram surgindo, mas no final foi possível obter alguns resultados minimamente aceitáveis para se realizarem os escoamentos.

Antes de iniciar este subcapítulo, é importante referir que para se proceder à fabricação do molde, foi necessário usar um tipo de resina, designado também de fotorresiste negativo SU-8. A SU-8 tem como característica ser biocompatível, frequentemente utilizada em BioMEMS [Rivera (2009)]. No projeto em questão, efetuaram-se testes com dois tipos de SU-8, usou-se a SU-8 5 e a SU-8 2015. A SU-8 é um fotorresiste do **tipo negativo** tendo como características, as apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3:Características do fotorresiste negativo [Adaptado de Rivera (2009)].

Parâmetros	Fotorresiste negativo
Adesão ao Si	Excelente
Base do Revelador	Orgânico
Custo Relativo	Menor
Quimicamente Inerte	Excelente

Para a realização de todo o respetivo procedimento ao método de fotolitografia, foi necessário recorrer a várias salas, denominadas de limpas, onde só com acompanhamento profissional e equipamento personalizado e altamente esterilizado se poderia entrar.

4.2.1 Material e Equipamentos (Sala Limpa, classe 100¹¹)

Ao longo deste protocolo, usou-se ácido sulfúrico, água destilada, câmara de fluxo, cristais, fato próprio da Sala Limpa, folha de alumínio, gobelés, um disco de aquecimento aberto e dois discos de aquecimento isolados, luvas, *insoladora* (equipamento da fotolitografia), micropipetas, papel absorvente próprio (não levanta partículas), peróxido de hidrogénio, pinças, pistola de nitrogénio (N₂), placa de petri, proveta, resina (SU-8 5 e numa fase posterior a SU-8 2015), revelador de SU, *spin coater*, tesoura, *waffer's* (substrato de silício) de 4 polegadas (4”).

4.2.2 Procedimento Experimental com a SU-8 5

Após várias tentativas de melhorar o protocolo, pois foram surgindo vários obstáculos na fabricação do molde, acabou por se usar o procedimento experimental referido seguidamente. Mesmo assim não se obtiveram os resultados pretendidos, como posteriormente se poderá visualizar nos ensaios experimentais.

4.3 Ensaios experimentais e discussão dos resultados

Neste subcapítulo, vão ser expostos os ensaios experimentais, ou seja, os testes iniciais necessários para se poder passar à fase de testes do escoamento.

¹¹ Designa-se “Classe 100”, uma vez que nesta sala, só existem 100 partículas por m².

Inicialmente, foi necessário efetuar a fabricação do molde nos substratos de silício, (fase realizada na **sala branca, classe 100** dos laboratórios do CEIT). Tal como já fora referido, nesta parte inicial ocorreram bastantes problemas, daí se ter realizado esta fase mais que uma vez. Com o fotorresiste SU-8 5, pretendia-se obter uma espessura mínima de fotorresiste de **15 µm**, para se poder prosseguir numa fase posterior (testes do escoamento). Foi com os parâmetros apresentados na Tabela 4, que foram realizados os primeiros testes.

Tabela 4: Parâmetros experimentais do processo de fotolitografia com o fotorresiste SU-8 5 (**15 µm** no total).

Processo		Detalhes			
1	Limpeza	Piranha (H ₂ SO ₄ +H ₂ O ₂) 5 minutos	Desionizada H ₂ O (1) 1 min e 30 segundos	Desionizada H ₂ O (2) 1 min e 30 segundos	Desionizada H ₂ O (3) 1 min e 30 segundos.
2	Desidratação	Temp. (°C): 200°C		Tempo: 20min	
Pausa de 5 minutos à temperatura ambiente					
3	Coating	Resina: SU-8 5		Velocidade: 500rpm— 5 segundos 1000rpm— 30 segundos	
4	Prebake	Passo 1: 65°C— 2min		Passo 2: 95°C— 5min	
Pausa de 5 minutos à temperatura ambiente					
5	Exposição	Ciclos: 3		Energia: 64 [mJ] (Total:192 mJ)	
Pausa de 10 minutos à temperatura ambiente					
6	Postbake	Passo 1: 65°C— 1min		Passo 2: 95°C— 2min	
Pausa de 10 minutos à temperatura ambiente					
7	Revelação	Solução: PGMEA (Solução reveladora)		Tempo: 3min Agitar com IPA (isopropanol).	

Para um melhor entendimento da Tabela 4, será feita uma abordagem explícita do que realmente se fez em cada etapa.

Na **1ª etapa**, adicionou-se 30 ml de Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) a 30 ml de Peróxido de Hidrogénio (H_2O_2) num gobelé, solução denominada de Piranha.

Seguidamente, colocou-se a *wafer* cuidadosamente com o auxílio de uma pinça no interior do gobelé, aproximadamente 5 minutos, de forma a eliminar resíduos não desejados. Após os 5 minutos, (novamente com a ajuda de uma pinça) passou-se a *wafer* que se encontrava dentro da solução piranha, para um gobelé que apenas possuía água, durante cerca de 1 minuto e 30 segundos e realizou-se novamente este passo, para outros gobelés que novamente apenas continham água. Terminando este passo, retirou-se a *wafer* da água, e com a pistola de pressão de nitrogénio (N_2) secou-se.

Na **2ª etapa**, ligou-se o disco de aquecimento a $200^\circ C$ e colocou-se a *wafer* durante 20 minutos, seguindo uma pausa de aproximadamente 5 minutos à temperatura ambiente.

Na **3ª etapa**, colocou-se a *wafer* no *spin coater* durante 5 segundos a uma velocidade de 500 rpm e depois durante 30 segundos a 1000 rpm.

Na **4ª etapa**, sincronizou-se um dos equipamentos existentes na sala 100, para que se aquecesse um dos discos de aquecimento isolados a $65^\circ C$, durante 2 minutos e o outro a $95^\circ C$ durante 5 minutos. Após se proceder à pausa de 5 minutos à temperatura ambiente, colocou-se a *wafer* no interior do *spin coater* e depositou-se cerca de 5 ml de resina SU-8-5.

Na **5ª etapa**, ocorreu a exposição, onde inicialmente se colocou o desenho das máscaras impressas no “acetato”, sobre o cristal indicado e introduziu-se este acetato juntamente com o cristal no equipamento de fotolitografia (*insoladora*). De seguida, colocou-se também a *wafer* na insoladora durante um período de 3,5 a 4 minutos, onde foram realizados 3 ciclos com uma energia de 64 mJ (num total de 192 mJ).

Na **6ª etapa**, sincronizou-se novamente o equipamento usado na etapa 4 e repetiu-se o passo em que a *wafer* vai inicialmente ao 1º disco de aquecimento a $65^\circ C$ durante 1 minuto, seguida do 2º disco de aquecimento a $95^\circ C$ durante 2 minutos.

Por fim, na **7ª etapa**, depositou-se uma pequena porção da solução reveladora de SU-5 para um gobelé e outra porção de isopropanol noutra gobelé, tendo este último como objetivo, a limpeza final. Colocou-se a *wafer* no gobelé que contém revelador, durante aproximadamente 3 minutos e a mesma *wafer* no gobelé com isopropanol, durante uns segundos. Com a pistola de N_2 , secou-se a *wafer* e colou-se esta mesma no *spin coater* durante aproximadamente 30 segundos.

Na Figura 31, pode ser visualizado o resultado final das geometrias, replicadas numa *wafers* de silício oxidado de 4 polegadas.

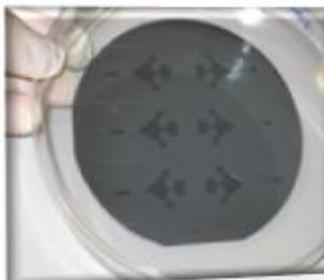


Figura 31: Resultado final das geometrias na primeira fase de testes.

Ao realizar esta fase com estes parâmetros, não existiam indicadores de qualquer problema. Daí se ter passado para uma fase posterior (**a medição de espessura do fotorresiste**). Para efetuar esta medição, foi necessário recorrer ao Perfilómetro Tencor P-6, presente na sala limpa, classe 10 000 B¹² do CEIT. Com a ajuda deste perfilómetro foi possível aferir a existência de uma espessura muito pequena do fotorresiste SU-8 5. Com este fotorresiste, conseguiu-se obter no máximo uma espessura de aproximadamente **12 µm**, quando no mínimo deveria ter **15 µm**, para que numa fase posterior se pudessem colocar duas camadas de fotorresiste, de forma a perfazer os 30 µm necessários para efetuar a caracterização/estudo dos micro-canais. Ainda através deste equipamento, verificou-se que as imagens conseguidas dos micro-canais apareciam um pouco “repartidas”, como se pode ver na Figura 32, parte superior. Este facto pode ter ocorrido pela má colocação de algum parâmetro durante o processo de fotolitografia (daí a tentativa de otimização do protocolo). Na Figura 32, pode-se visualizar os resultados obtidos relativamente à qualidade das imagens (parte superior da figura) e à espessura do fotorresiste (parte inferior da figura).

¹² A classe 10 000 B, tanto como a 10 000 A da sala limpa, são assim denominadas devido à existência de apenas 10 000 partículas por m² na mesma.

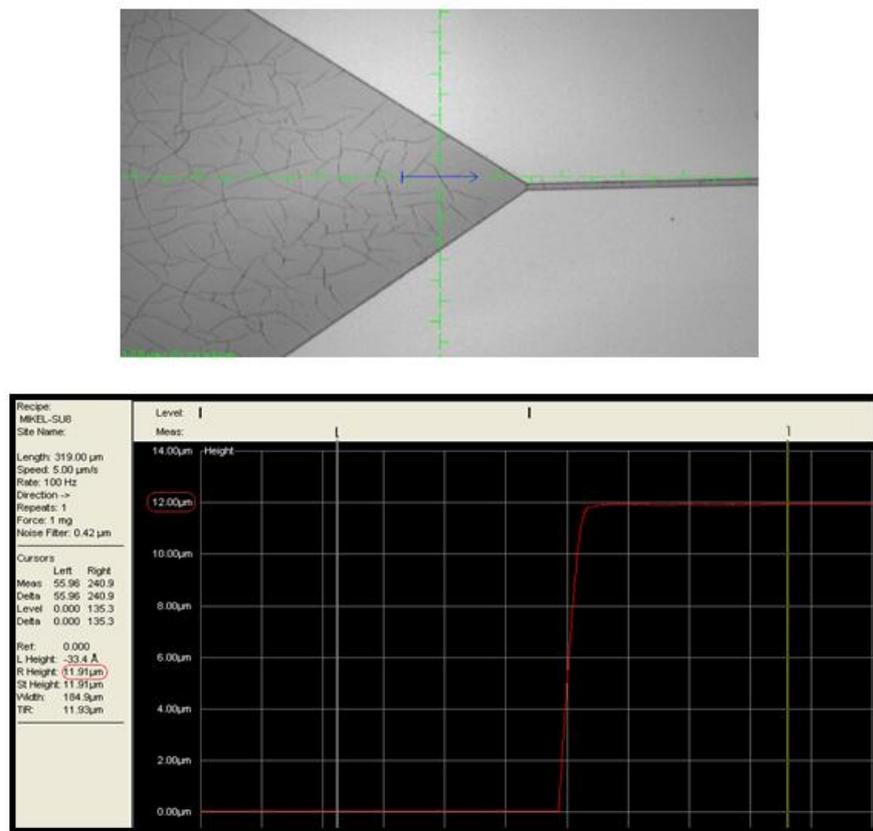


Figura 32: Perfil representativo da espessura em diferentes locais da geometria e em diversas geometrias.

Após retirar o valor da espessura em vários pontos da *wafers*, foi possível aferir, que esta não era uniforme em toda a sua área, fator que influencia possíveis resultados. Visto não se ter conseguido obter a espessura desejada, os parâmetros do protocolo de fotolitografia foram alterados uma série de vezes na tentativa de se conseguir os resultados esperados, o que não se veio a verificar.

Numa tentativa de melhorar estes resultados, pensou-se em repetir algumas das fases do protocolo de fotolitografia de forma a aumentar a espessura, colocando duas camadas de resina, em vez de uma, como se tinha feito até agora. Para tal, usaram-se os parâmetros apresentados na Tabela 5. Com este protocolo, pretendia-se obter uma espessura de aproximadamente **25 μm** .

QUARTO CAPÍTULO. Fabricação e Caracterização dos Micro-Canais

Tabela 5: Parâmetros experimentais do processo de fotolitografia com o fotorresiste SU-8 5, duas camadas (25 μm no total).

Processo	Detalhes				
1	Limpeza	Piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$) 5 minutos	Desionizada H_2O (1) 1 min e 30 segundos	Desionizada H_2O (2) 1 min e 30 segundos	Desionizada H_2O (3) 1 min e 30 segundos
2	Desidratação	Temp. ($^{\circ}\text{C}$): 200 $^{\circ}\text{C}$		Tempo: 20min	
Pausa de 10 minutos à temperatura ambiente					
3	Coating (1)	Resina: SU-8 5		Velocidade: 500rpm— 10min 1000rpm— 30min	
4	Prebake (1)	Passo 1: 65 $^{\circ}\text{C}$ — 2min		Passo 2: 95 $^{\circ}\text{C}$ — 4min	
Pausa de 5 minutos à temperatura ambiente					
5	Coating (2)	Resina: SU-8 5		Velocidade: 500rpm— 10min 1000rpm— 30min	
6	Prebake (2)	Passo 1: 65 $^{\circ}\text{C}$ — 2 min e 30 segundos		Passo 2: 95 $^{\circ}\text{C}$ — 6min	
Pausa de 5 minutos à temperatura ambiente					
7	Exposição	Ciclos: 3		Energia: 73 mJ (Total:219 mJ)	
Pausa de 5 minutos à temperatura ambiente					
8	Postbake	Passo 1: 65 $^{\circ}\text{C}$ — 1min		Passo 2: 95 $^{\circ}\text{C}$ — 3min	
Pausa de 5 minutos à temperatura ambiente					
9	Revelação	Solução: PGMEA (Solução reveladora)		Time: 4min Agitar com IPA (isopropanol).	

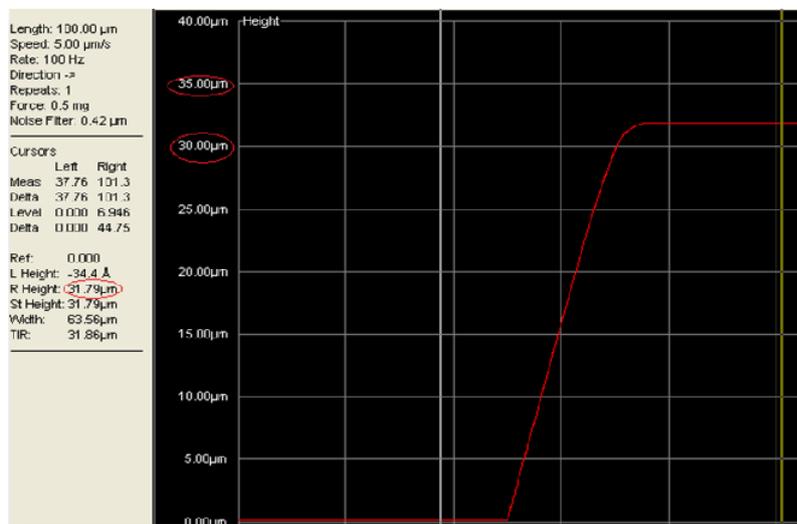
Nesta fase do projeto, procedeu-se à realização das mesmas etapas que as experiências anteriores (Tabela 4), com a exceção da alteração de certos parâmetros na fase de *Prebake*, *Postbake* e Revelação. Procedeu-se a uma nova realização das fases de *coating* e *prebak*, e na

fase da aplicação de fotorresiste efetuou-se a deposição de duas camadas de resina SU-8 5 (para que finalmente fosse exequível perfazer uma camada de fotorresiste de aproximadamente 25 μm).

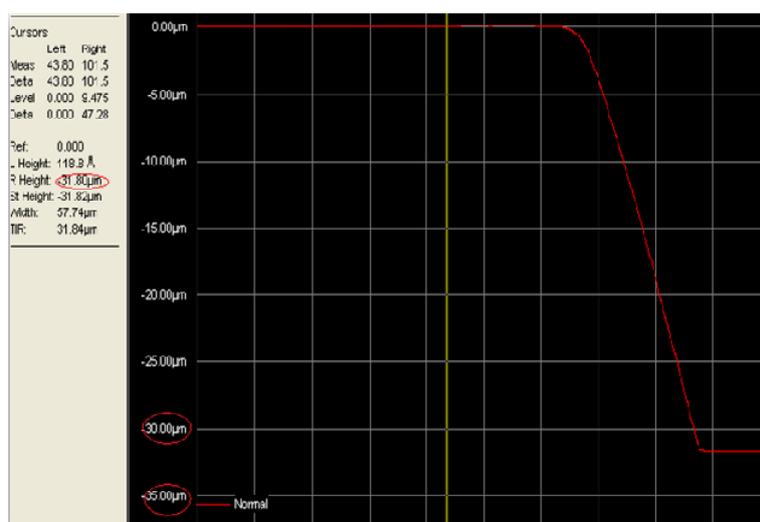
Passando à sala limpa, classe 10 000 B (sala onde se encontra o perfilómetro) quando se mediu a espessura, observou-se que o facto de se ter efetuado a deposição de duas camadas de SU-8 5, realmente proporcionou um aumento de espessura, apesar de não ser a teoricamente esperada. No entanto, dentro dos resultados esperados este protocolo pode ser considerado positivo.

Com duas camadas de resina, sendo teoricamente cada uma das camadas de aproximadamente 12 μm esperava-se uma espessura que se incluísse numa gama de 25-27 μm , aproximadamente. Contudo, obteve-se distintas espessuras, entre os 27 μm e os 40 μm . Um fator positivo deste protocolo, é o facto de que, ao verificarmos a espessura de uma única geometria em divergentes locais da mesma, afere-se que em toda ela, a espessura é muito semelhante, sendo assim, é possível prosseguir com os testes posteriores.

Na Figura 33, pode-se observar mais uma vez os resultados obtidos no que diz respeito à espessura com o novo protocolo.



a) Início da geometria



b) Fim da geometria

Figura 33: Perfis representativos das diferentes geometrias.

Visto terem sido estes os melhores resultados, prosseguiu-se para uma próxima fase (fazer a replicação do molde, agora em PDMS). Para realizar esta fase, usou-se sempre o mesmo procedimento. Foram necessários distintos **materiais** como: agente de cura, balança, bata, bisturi, bomba de seringa, equipamento de vácuo, espátula, estufa, etanol, gobelé, luvas, *Mixer* (equipamento que mistura o PDMS), PDMS, pinça, pistola de ar comprimido, placas de petri, pontas de agulha e *wafers*. Para se preparar o PDMS, tem de se seguir uma série de etapas, estando estas referidas seguidamente.

Na **1ª etapa**, pegou-se na *wafer* já com os padrões das geometrias replicados e verificou-se se esta não possuía depósitos de poeira (caso possuísse, usava-se a pistola de ar comprimido de forma a limpar a wafer).

Numa **2ª etapa**, com o auxílio da balança, pesou-se o vidro isoladamente e colocou-se a tara a zero. Usou-se uma porção de 20:1 de PDMS e agente de cura (por exemplo, 100g de PDMS e 10g de agente de cura). Depois de adicionadas as duas soluções, com o auxílio de uma espátula, misturou-se o melhor possível.

Na **3ª etapa**, programou-se o *Mixer* (equipamento de mistura de PDMS e agente de cura) a uma velocidade de 300rpm (visto ser a velocidade máxima para o silicone), e um tempo de 3,5 minutos (podendo este tempo variar).

Numa **4ª etapa**, colocou-se a placa de petri, com a respetiva *wafer* na balança e depositou-se a quantidade pretendida da mistura de PDMS e agente de cura. Se existirem

bolhas de ar, deve-se levar a placa de petri com a *wafer* já com ambas as soluções ao sistema de vácuo com o intuito de eliminar por completo as bolhas de ar.

Finalmente, na **5ª etapa** e após a supressão de bolhas de ar (caso existissem), colocou-se a placa de petri na estufa, durante aproximadamente 2 horas, com uma temperatura compreendida entre o 60-65°C (ou também se poderia deixar à temperatura ambiente durante um prazo de 24 horas).

Após esta etapa, deve-se retirar o PDMS da *wafer* (ver Figura 34). Antes de passar à fase de testes de escoamento, deve-se cortar determinados pontos de diferentes geometrias e observar esses pontos ao microscópio ótico de varrimento, e verificar se as dimensões que se colocaram inicialmente no *AutoCAD*, não sofreram alterações, devido a qualquer processo intermédio.

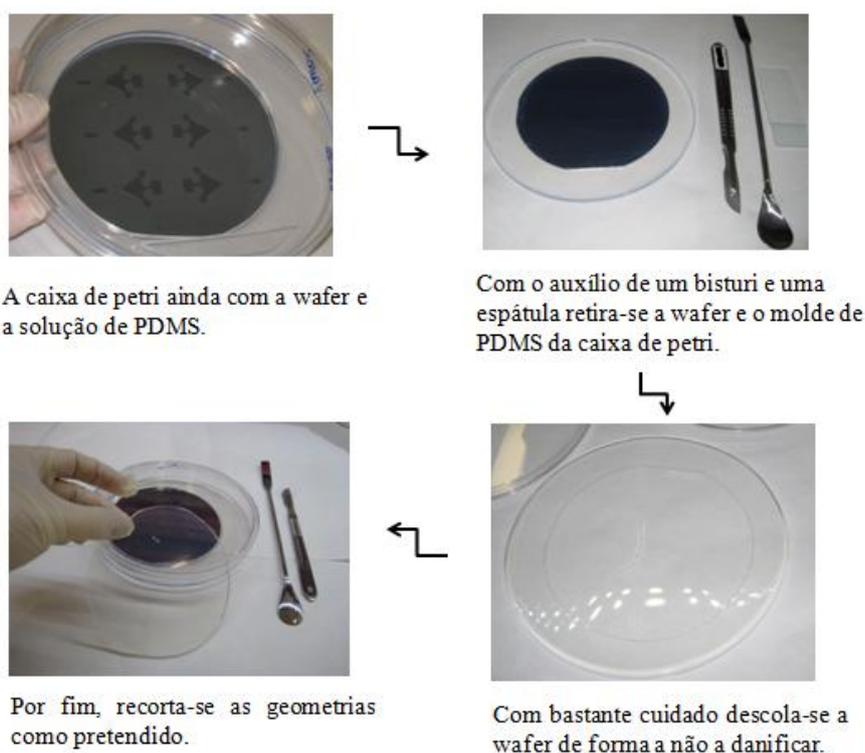


Figura 34: Molde em PDMS.

Numa próxima fase, (após retirar o PDMS), efetuou-se parte da caracterização dos micro-canais, isto é, levaram-se pequenas porções de cada geometria para analisar no microscópio eletrónico de varrimento de forma a verificar se as dimensões destas

correspondiam ao real. Na Figura 35, pode-se visualizar um esquema exemplificativo do processo de preparação da amostra para levar ao MEV.



Figura 35: Processo de preparação da amostra.

Após o corte das geometrias de PDMS nos locais pretendidos, estes são colocados numa lâmina de vidro. De seguida, colocam-se as porções de PDMS em *Stubs* e introduzem-se estes no suporte apropriado do *sputter coater*. Depois, este mesmo suporte vai ao equipamento, no qual vai ocorrer a técnica de *sputtering*.

Tal como já fora referido, a técnica de *sputtering*, vai permitir a deposição de materiais sem alterar significativamente a composição inicial do material a depositar. Mais importante ainda, esta técnica vai tornar a amostra condutora, facultando deste modo a visualização dos canais no MEV. Só assim, foi possível averiguar se os canais estavam ou não rompidos, e se estes possuíam as mesmas dimensões que as inicialmente colocadas no *AutoCAD*. Na Figura 36, podem ser visualizados os resultados obtidos no microscópio eletrónico de varrimento, após a aplicação da técnica de *sputtering*.

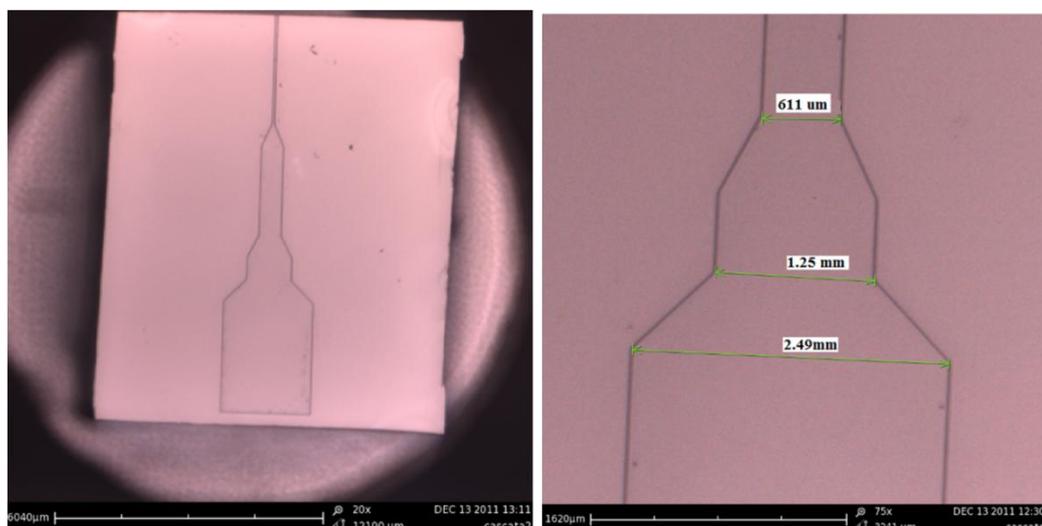


Figura 36: Visualização dos canais ao MEV.

No lado esquerdo da Figura 36, pode ser observada a amostra com o suporte que é levado ao *Sputter*, numa observação no MEV, e do lado direito da Figura 36, pode-se visualizar as dimensões que o micro-canal possui na realidade. Assim, através desta análise, foi possível aferir que o canal se encontrava em perfeitas condições, apesar das dimensões terem variado ligeiramente das propostas inicialmente. Esta variação pode ter ocorrido durante o processo de fabricação, na fotolitografia.

Seguidamente, levou-se alguns moldes de PDMS à câmara de oxigénio e plasma para aderir irreversivelmente o PDMS ao substrato de vidro, efetuando de seguida os testes de escoamento sanguíneo. Na Figura 37, observa-se o estado final após a adesão e na Figura 38, podem ser observados alguns dos resultados obtidos a partir do escoamento sanguíneo.



Figura 37: Moldes de PDMS fixados ao substrato de vidro.

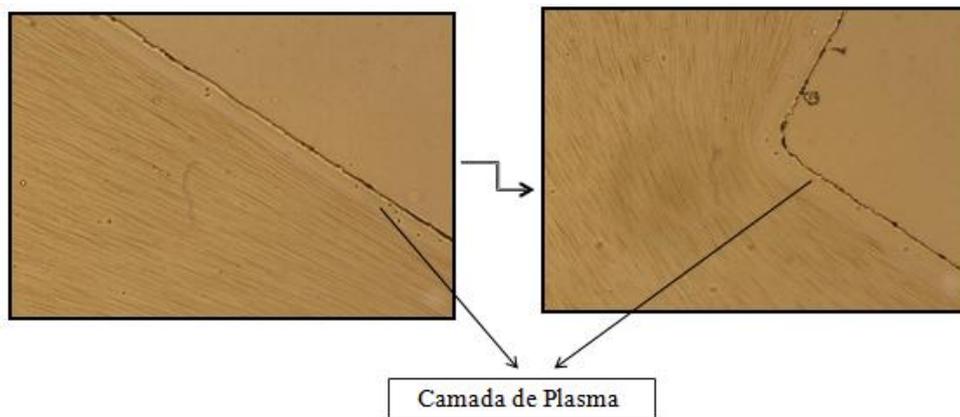


Figura 38: Resultados do escoamento obtidos.

Através da Figura 38, é possível aferir que com esta geometria existe a formação da camada de plasma. Contudo, os resultados não foram os pretendidos, tendo sido exequível concluir que as geometrias criadas não foram as apropriadas para obter a finalidade pretendida. Com o auxílio da Figura 39, será feita uma pequena explicação do porquê das geometrias criadas não serem as apropriadas, e o porquê de se ter criado novas geometrias.

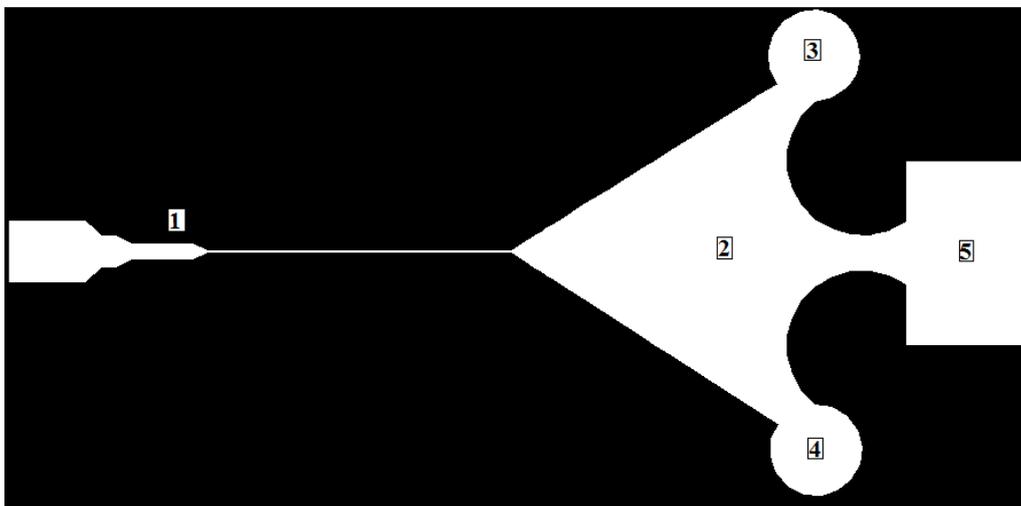


Figura 39: Representação exemplo das geometrias criadas na primeira parte deste projeto.

A geometria apresentada na Figura 39 representa o conjunto de geometrias criadas na parte inicial deste projeto, uma vez que o padrão é em muito semelhante com as restantes, variando apenas a forma das entradas e a largura do micro-canai que liga a entrada às saídas. Contudo, não são estas pequenas diferenças que implicam a não funcionalidade destas geometrias para o objetivo pretendido. Em termos gerais, a existência de constrições na **zona**

1 provoca a formação de uma camada de plasma junto das paredes. Contudo, existem ainda vários inconvenientes nas zonas 2, 3 e 4. A existência na zona 2 de uma grande região de estagnação e pelo facto das saídas 3 e 4 serem demasiadamente grandes, o fluido vai-se deslocar praticamente todo por essas saídas, não ocorrendo assim a separação parcial pretendida (plasma e GV's).

Face a estes resultados, foram criadas novas geometrias e realizadas novamente todas as fases anteriormente expostas. Para estas novas geometrias foi utilizado um fotorresiste diferente.

Durante o processo de fotolitografia, usou-se o novo tipo de fotorresiste **SU-8 2015**, ao passo que para os testes anteriores tinha-se usado a SU-8 5. O uso da SU-8 2015 proporciona uma secagem mais rápida, tem excelentes características de imagem, possuindo elevadas transmissões óticas [MicroChem]. Uma vez que nos testes experimentais anteriores, já foram explicados todos os passos, nesta fase do projeto serão só apresentados e discutidos os resultados. Na Figura 40 são expostas as novas geometrias e na Tabela 6, são apresentados os novos parâmetros usados na fotolitografia para a conceção das novas geometrias.

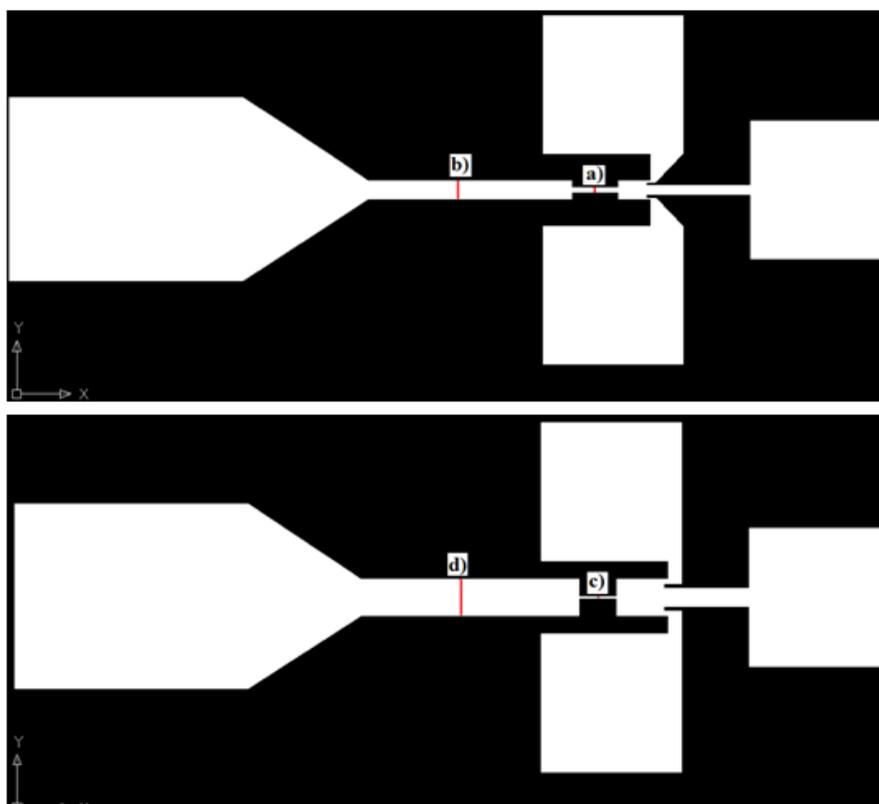


Figura 40: Novas geometrias para testar o escoamento.

QUARTO CAPÍTULO. Fabricação e Caracterização dos Micro-Canais

Os micro-canais representados pelas letras **a)**, **b)**, **c)** e **d)** possuem alturas de 50 μm , 200 μm , 20 μm e 400 μm , respectivamente.

Tabela 6: Parâmetros usados nas novas geometrias, com a SU-8 2015.

Processo		Detalhes			
1	Limpeza	Piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$) 5 minutos	Desionizada H_2O (1) 1 min e 30 segundos	Desionizada H_2O (2) 1 min e 30 segundos	Desionizada H_2O (3) 1 min e 30 segundos
2	Desidratação	Temp. ($^{\circ}\text{C}$): 200 $^{\circ}\text{C}$		Tempo: 20min	
Pausa de 5 minutos à temperatura ambiente					
3	Coating	Resina: SU-8 2015		Velocidade: 500rpm— 20 segundos 1500rpm— 30 segundos	
4	Prebake	Passo 1: 65 $^{\circ}\text{C}$ — 1min		Passo 2: 95 $^{\circ}\text{C}$ — 4min	
Pausa de 5 minutos à temperatura ambiente					
5	Exposição	Ciclos: 3		Energia: 50 mJ (Total:150 mJ)	
Pausa de 10 minutos à temperatura ambiente					
6	Postbake	Passo 1: 65 $^{\circ}\text{C}$ — 30 segundos		Passo 2: 95 $^{\circ}\text{C}$ — 5min	
Pausa de 5 minutos à temperatura ambiente					
7	Revelação	Solução: PGMEA (Solução reveladora)		Tempo: 4min Agitar com IPA (isopropanol).	

Após este processo, mais uma vez, foi necessário medir a espessura da wafer com o auxílio do *Perfilômetro Tencor P-6*. Com a nova resina, espera-se obter uma espessura entre os **27 μm** e os **30 μm** . Na Figura 41, podem ser observadas algumas das imagens dos novos micro-canais retiradas através do Perfilômetro.

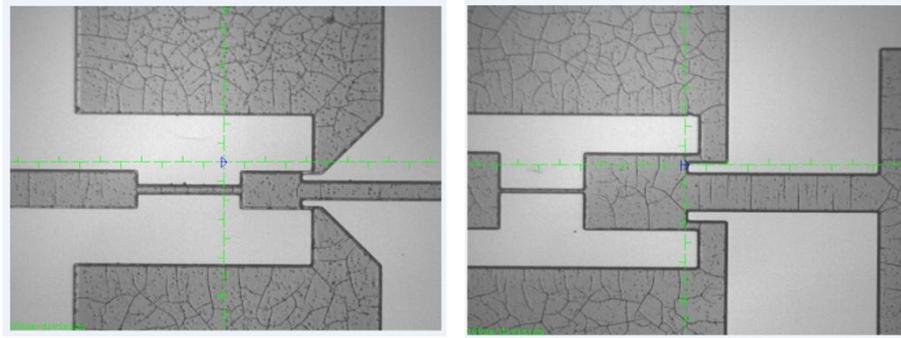


Figura 41: Novos micro-canais quando observados no Perfilômetro.

Através da análise destas imagens, pode-se aferir que os micro-canais aparentam possuir uma boa definição e não se romperam. Contudo, no interior das geometrias aparecem uma série de “quebras”, que podem levar a pensar que a geometria está danificada, o que não se verifica, pois estas quebras em nada influenciam os resultados. Na Figura 42, pode-se visualizar o perfil correspondente à espessura do fotorresiste.

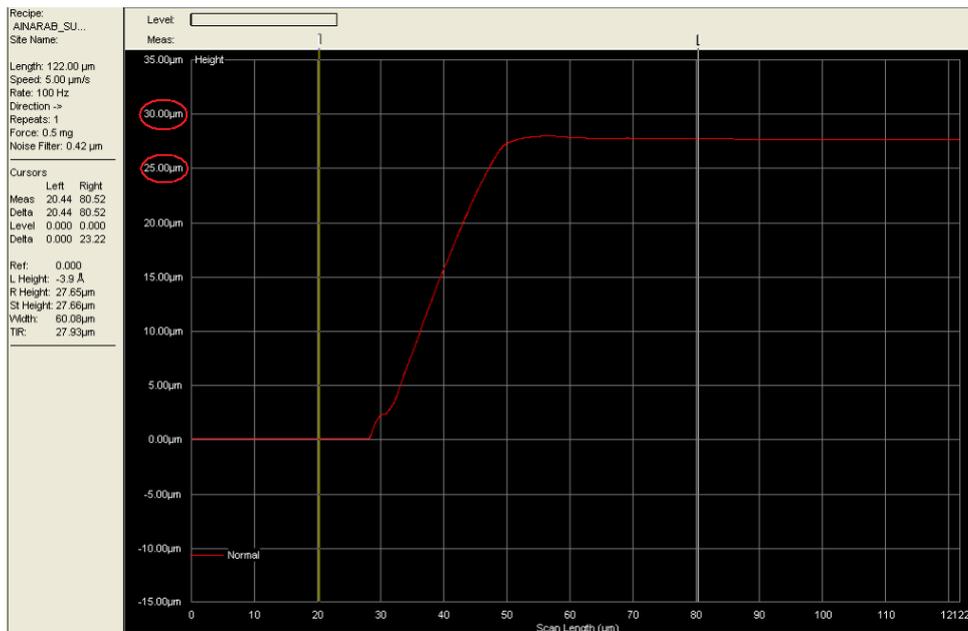


Figura 42: Perfil correspondente à medição da espessura no Perfilômetro.

Tendo em consideração o perfil em questão, foi possível aferir que se obteve a espessura dentro dos parâmetros pretendidos, encontrando-se a *wafers* com uma espessura de 27.66 µm e possuindo uma uniformidade com os requisitos mínimos.

Feitos os moldes em PDMS das geometrias, estes novamente foram levados ao *suptter*, para serem analisados no MEV. Na Figura 43, podem ser visualizados os resultados obtidos no MEV.

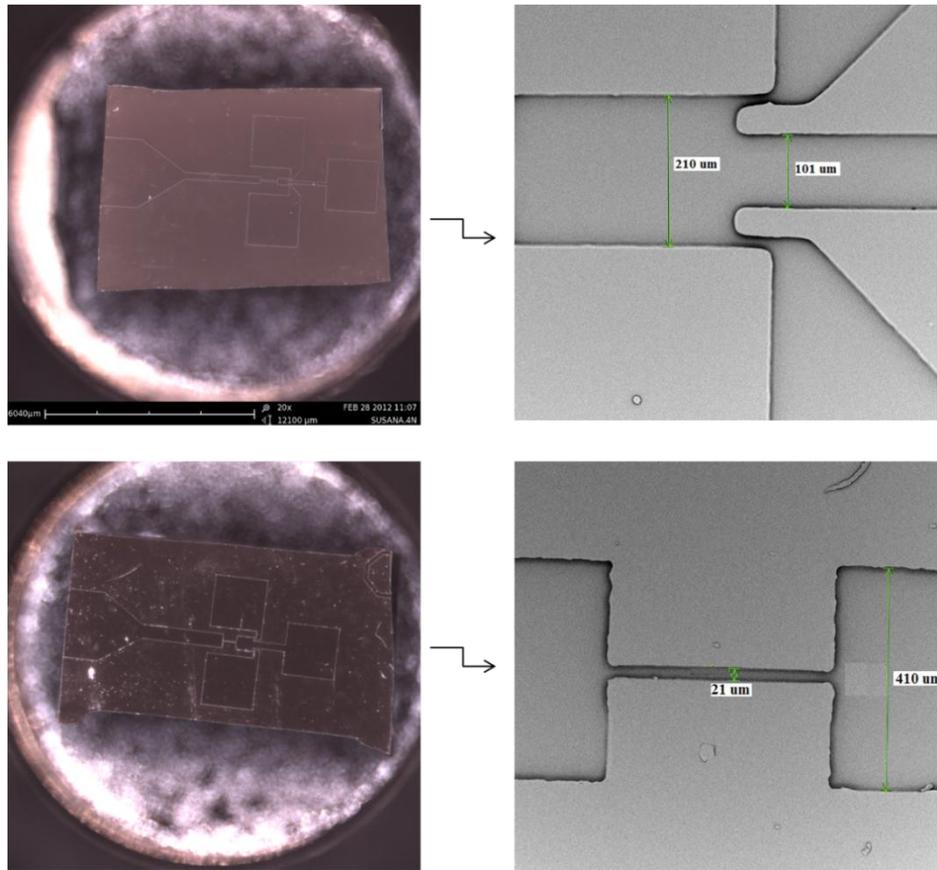


Figura 43: Resultados obtidos no Microscópio Eletrónico de Varredura.

Através dos resultados obtidos no MEV, pode-se afirmar que os micro-canais possuem uma boa definição, não se tendo rompido (tal como se tinha concluído a partir do perfilómetro). No entanto ocorreu uma pequena alteração das dimensões iniciais face às finais visualizadas através do MEV. Mais uma vez, estas alterações possivelmente ocorreram devidos aos processos intermédios realizados nesta fase. Face a estes resultados, foi possível fazer um estudo do escoamento sanguíneo, tendo sido esta fase realizada em Portugal, no Instituto Politécnico de Bragança, (ver capítulo 5).

4.4 Conclusão

A investigação consumada para a realização desta fase inicial do trabalho (CEIT), permitiu adquirir novos conhecimentos face a novos assuntos. Pode-se referir ainda que, o manuseamento e a familiaridade com novos equipamentos como a EVG 620 (processo de fotolitografia) o Perfilómetro Tencor P-6 (medição de espessuras de fotorresistes), o Plasma *Surface-Technology* (tratamento de superfícies), o *Sputter Coater* e o Microscópio Eletrónico de Varrimento (caracterização de canais) permitiu a aquisição de novas competências, tanto a nível pessoal como profissional, o que é uma mais-valia futuramente.

Relativamente aos primeiros parâmetros usados durante o processo de fotolitografia, inicialmente com o fotorresiste SU-8 5, foi possível concluir que não se obteve a espessura do fotorresiste pretendida (15 μm) e ainda se obteve uma não uniformidade deste fotorresiste pela superfície total da *wafer*. Face aos resultados obtidos, mediante os segundos parâmetros usados no processo de fotolitografia (ainda com a SU-8 5), onde se efetuou a deposição de duas camadas de resina aferiu-se que, devido a estas duas camadas, a *wafer* ficou com uma grande quantidade de impurezas, tendo sido assim necessário repetir a etapa de revelação mais uma vez, passando a mesma *wafer* duas vezes pela solução de isopropanol. Foi exequível aferir ainda que, quando a *wafer* foi levada ao perfilómetro verificou-se que a espessura do fotorresiste realmente tinha aumentado face aos primeiros parâmetros, ainda que se tivessem obtido valores diferentes do teoricamente esperados. Apesar de serem esperadas espessuras dentro da gama de 25 μm a 27 μm , obtiveram-se espessuras que variam entre os 27 μm e os 40 μm .

Contudo, apesar de se ter verificado uma não uniformidade de espessura, aferiu-se que, em distintos pontos da mesma geometria, a espessura do fotorresiste era em muito semelhante, o que permitiu a possibilidade de se proceder aos testes de escoamento. No entanto, antes de prosseguir para os testes de escoamento, foi necessário fazer a visualização das geometrias no microscópio eletrónico de varrimento, com o objetivo de se verificar se as dimensões inicialmente colocadas no *AutoCAD* eram as mesmas face a todos os procedimentos intermédios. Verificou-se uma ligeira diferença das dimensões iniciais para as finais, no entanto nada significativo, sendo assim possível prosseguir para os testes seguintes.

Após a realização dos testes de escoamento, conclui-se que as geometrias inicialmente criadas, não eram as indicadas para os objetivos pretendidos, pois apesar de através destas

geometrias se conseguir a formação da camada de plasma, não era possível efetuar a separação parcial, devido às baixas profundidades dos micro-canais e à existência de uma região de estagnação de elevadas proporções a jusante da zona de separação. Assim, optou-se pela criação de novas geometrias.

Nas novas geometrias foi usado um novo tipo de fotorresiste, SU-8 2015. O uso da SU-8 2015 proporciona uma secagem mais rápida que a SU-8 5, tem excelentes características de imagem face ao fotorresiste anteriormente aplicado, e possui elevadas transmissões óticas. Relativamente aos resultados obtidos já com as novas geometrias, é de referir que só foi testado um tipo de parâmetros, face à limitação do tempo disponível, daí não se ter otimizado o protocolo com este novo fotorresiste.

Face aos parâmetros utilizados, conclui-se que se obteve uma espessura dentro da gama do esperado, uma vez que se esperava obter uma espessura de fotorresiste de 27 μm a 30 μm e obteve-se uma espessura de 27.66 μm e uma relativa uniformidade da *wafer*. Pode-se ainda mencionar que tal como quando se usou a resina SU-8 5, as dimensões das geometrias sofreram uma ligeira alteração, no entanto em nada impediram de se prosseguir para os testes de escoamento, como aconteceu, já em Portugal, no Instituto Politécnico de Bragança.

4.5 **Trabalhos Futuros**

Face ao trabalho desenvolvido no CEIT, seria muito interessante e importante otimizar o protocolo do processo de fotolitografia, com o fotorresiste SU-8 2015, de forma a fabricar moldes com uma melhor qualidade.

Quinto Capítulo

5 Ensaios Experimentais Executados no IPB- Parte 1: a separação com células saudáveis

O escoamento do sangue na micro-circulação promove vários fenômenos fisiológicos bastante interessantes que podem ser usados para desenvolver dispositivos micro-fluídicos para a separação do sangue e posterior análise clínica [Lima et al. (2011)].

A camada de plasma (CP), também designado de *cell free layer* (CFL), é um fenômeno fisiológico que acontece no sangue quando este flui em micro-vasos. Este fenômeno acontece tanto *in vivo* como *in vitro* [Caro et al. (1978), Faivre et al. (2006), Fujiwara et al. (2009) e Lima et al. (2012)]. A CP tem sido amplamente estudada *in vivo* e *in vitro*. Contudo, embora a formação desta camada *in vivo* seja de grande interesse já há muitos anos, pouca informação sobre esta é disponibilizada, devido às limitações das técnicas de medição e à complexidade da rede vascular.

Segundo Sangho Kim [Sangho et al. (2009)] e seus colaboradores, a CP depende do diâmetro do vaso, do caudal usado e das propriedades reológicas do sangue, incluindo o hematócrito, a agregação de GVs e a deformabilidade. Ainda segundo estes investigadores, a largura da camada de plasma, geralmente **diminui** com o **aumento do hematócrito** [Sangho et al. (2009)]. Este fenômeno (CP) ocorre devido à tendência dos GVs se submeterem à migração axial, devido ao perfil de velocidades parabólico, que resulta em elevadas tensões de corte em torno da parede, forçando os GVs a se deslocarem na direção central do canal [Lima et al. (2011) e Meireles et al. (2011)].

A maioria dos estudos relativos a este fenômeno tem como objetivo a extração completa das células do plasma, ao passo que no estudo em questão apenas se pretende a extração

parcial. O dispositivo biomédico desenvolvido visa obter uma CP com uma concentração de GVs suficiente para medir e avaliar a deformabilidade dos GVs.

5.1 ***Materiais e Métodos***

Os fluidos de trabalho usados neste estudo foram o Soro fisiológico (NaCl) e o *Dextrano* 40 (Dx 40), contendo cerca de 5%, 10% e 15% (isto é, foram feitos testes com hematócritos, Hct=5, 10 e 15) por volume de glóbulos vermelhos.

O sangue foi recolhido a partir de um ovino saudável tendo sido adicionado heparina a fim de impedir a sua coagulação. As células foram separadas do sangue por centrifugação (2000 rpm durante 15 minutos). Os GVs foram lavados duas vezes com uma solução de NaCl e foram colocados em suspensão com Dx 40 para perfazer a concentração de GVs pretendida. As amostras de sangue foram armazenadas hermeticamente a 5°C, tendo sido realizadas as experiências a uma temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). Os micro-canais testados neste estudo, foram fabricados usando a técnica de litografia suave e consistem em canais retos de 200 µm de largura com regiões de contração de 50 µm, e 400 µm de largura com 20 µm de contração.

No IPB, procedeu-se de forma distinta para produzir os moldes em PDMS. Inicialmente, adicionou-se PDMS ao agente de cura numa porção de 20:1 (para se espalhar sobre a *wafer*) e à parte efetuou-se outra adição de PDMS e agente de cura mas agora numa razão de 10:1 (para espalhar sobre as lâminas ou lamelas). Feitas estas adições, vazou-se a porção da solução de 20:1 na *wafer*, e com um sistema de vácuo retiraram-se as bolhas de ar formadas. Retiradas as bolhas, levou-se a placa de petri com a *wafer* já com o PDMS à estufa durante 20 minutos, para curar. Enquanto se esperou esses 20 minutos, pegou-se numa lâmina de vidro, vazou-se uma pequena quantidade da porção de 10:1 e levou-se ao *spin coater*. Este equipamento, está programado para efetuar 3000 rpm a 60 segundos e 4000 rpm e 60 segundos com o intuito de espalhar uniformemente o PDMS e o agente de cura. Com esta fase concluída, levou-se a lâmina à estufa durante 20 minutos, para que decorra um tratamento térmico. Passados os 20 minutos de cura (*wafer* + PDMS), retirou-se a placa de petri e descolou-se o PDMS, cortando o *chip* que se pretende. Descolado e cortado o PDMS, procedeu-se à realização dos furos nas entradas e saídas dos micro-canais, para posteriormente se efetuarem os testes de escoamento.

Passados mais 20 minutos, a lâmina foi retirada da estufa e aderida ao molde em PDMS e levada novamente à estufa, agora durante um período de 24 horas. De referir que, quando se efetua o tratamento térmico, tem-se como finalidade, tentar efetuar uma adesão irreversível do molde em PDMS à lâmina, para possibilitar o teste de escoamentos com pressões mais elevadas.

5.2 Testes Experimentais

Na Figura 44 a), pode ser observado o sistema de microscopia usado na Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Bragança, no decorrer dos estudos do escoamento. O sistema de microscopia é composto por: (1) um microscópio invertido (IX71, Olympus, Portugal) combinado com uma câmara de alta velocidade (3), (*i*-SPEED LT). Ainda na Figura 44 a), pode-se observar a bomba de seringa (2) (Harvard Apparatus PHD ULTRA™) usada para bombear os fluidos de trabalho em sistemas de microfluídica. Foram ainda utilizadas seringas de 5 ml (TERUMO® SYRING).

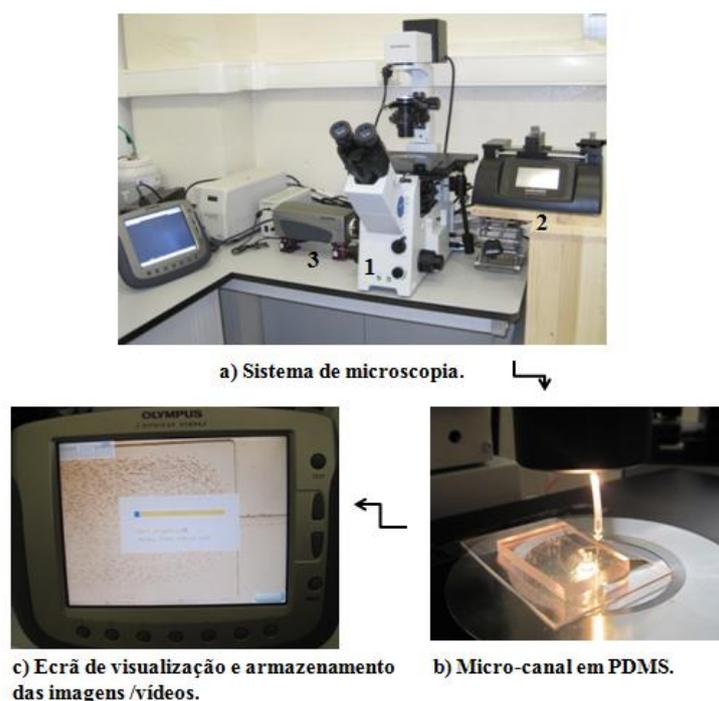


Figura 44: Sistema de microscopia utilizado na ESTIG, IPB.

Para efetuar os estudos do escoamento sanguíneo foram realizados testes com um Hct de 5%, 10% e 15%, com caudais de 2, 5 e 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Na Figura 44 b), pode ser visualizado o

micro-canal (replicado através da fotolitografia) em PDMS. Já na Figura 44c) pode-se observar a câmara de alta velocidade (Olympus, *i-SPEED* CDU) utilizada para visualizar e gravar imagens/vídeos (de 60 fps até 2000 fps) para posterior tratamento.

5.3 **Análise de Imagem/Vídeo**

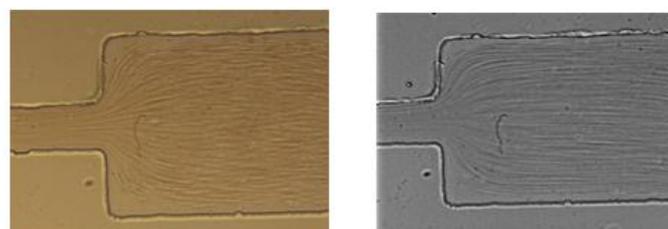
Um vídeo é considerado uma sequência de imagens, sendo cada uma denominada de *frame*, expostas numa frequência demasiado rápida, impedindo assim que o olho humano se aperceba da cadência de imagens. Tendo em consideração que duas imagens consecutivas do mesmo vídeo são muito semelhantes, é possível a aplicação de metodologias de localização de objetos com base em técnicas de Processamento de Imagem [Sousa (2005)].

No presente trabalho, todas as imagens foram capturadas no plano central dos micro-canais com uma objetiva de 20x mais o *zoom* de 1.6x, com uma velocidade de 600 *frames* / segundo. As imagens gravadas foram transferidas para o computador e, em seguida, o tratamento de imagem foi feito no *software* de imagem *Image J (Image Processing and Analysis in Java*, desenvolvido pelo *National Institutes of Health*). Este *software* permite editar, analisar, processar, exibir e guardar imagens de 8, 16 e 32 bits. Faculta ainda, a leitura de uma série de formatos de imagem, como TIFF, PNG, JPEG, BMP, DICOM, entre outros [Ferreira e Rasband (2011)].

Primeiramente, os vídeos capturados foram convertidos para uma sequência de imagens estáticas, tendo sido necessário inicialmente, converter a imagem em tons de cinza. De seguida recorreu-se ao comando *Set Scale* para calibrar, atribuindo a cada *pixel* um valor em microns, inserindo o valor de referência de 20 μm e 50 μm (mediante a geometria utilizada). Posteriormente, dentro do menu *Process* usou-se o comando *Filters (Unsharp Mask* de *Radius= 10*), para realçar a imagem. No menu *MtrackJ*, usa-se o comando *Add tracks* que através da sequência de imagens permitiu obter a trajetória da camada de plasma, assim sendo, os valores pretendidos extraídos mediante o comando *Measure Tracks*.

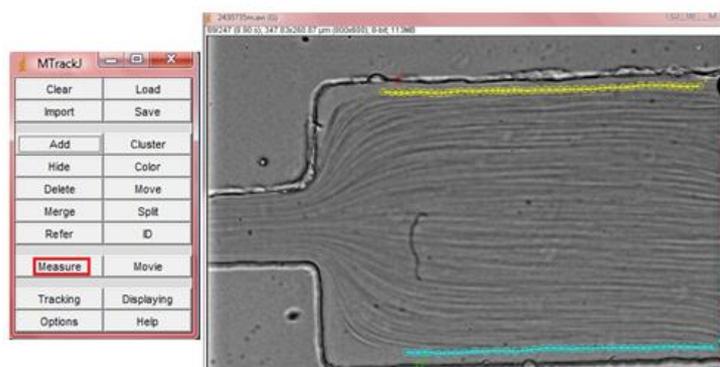
O método empregue é suficiente e relativamente eficiente para os dados que se pretendem analisar. Contudo, é bastante moroso para o utilizador, pois os GVs são de pequena dimensão e por vezes possuem velocidades muito reduzidas, o que torna ainda mais exigente ao utilizador marcar a posição de imagem a imagem, de forma a conseguir seguir a “linha” da camada de plasma. De referir, é que este método é suscetível a erros por parte do

utilizador. Na Figura 45, é possível observar uma sequência exemplo do tratamento de imagem realizado no presente trabalho.



a) Imagem original.

b) Imagem filtrada.



c) Imagem com a trajetória da CP.

Figura 45: Tratamento de imagem efetuado no presente trabalho.

Onde, **a)** representa a imagem original, **b)** a imagem filtrada com um *unsharp mask* (*radius* 10) e **c)** a imagem já com o seguimento da trajetória da camada de plasma através do comando *MtrackJ*. Ainda na Figura 45 c) é possível observar uma tabela, onde através do comando *Measure*, se retiram os valores pretendidos da parede do micro-canal e dos pontos que formam a camada de plasma.

5.4 Resultados

Neste subcapítulo, serão expostos os resultados obtidos quando comparados os diferentes hematócritos e os diferentes caudais para a geometria 1 e a 2. Na Figura 46, são apresentadas as geometrias usadas.

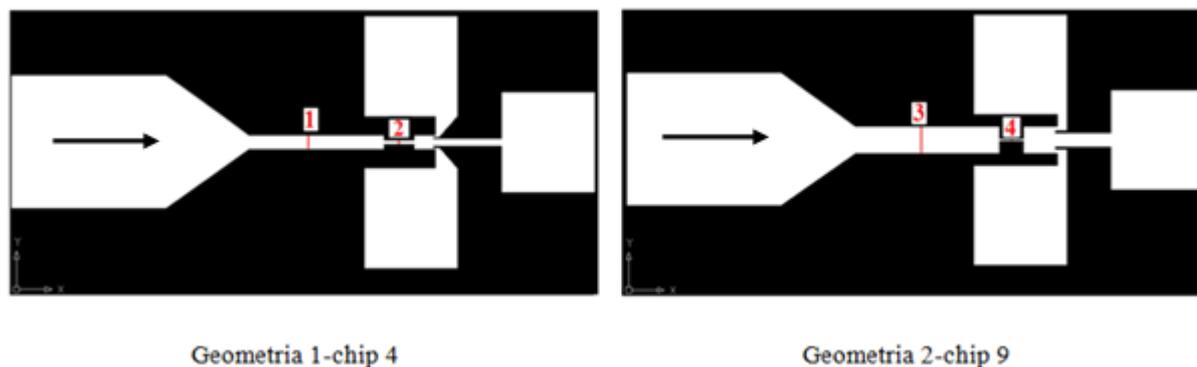


Figura 46: Geometrias usadas na apresentação dos resultados.

Na **geometria 1**, o número 1 representa um micro-canal de largura 200 μm e o número 2 representa um micro-canal de largura 50 μm , ao passo que na **geometria 2**, o micro-canal 3, possui uma largura de 400 μm e o micro-canal 4, uma largura de 20 μm .

A razão de expansão (r_e) pode ser definida por:

$$r_e = \frac{W_1}{W_2} \quad (2)$$

onde W_1 , corresponde à largura maior e o W_2 , corresponde à largura menor. Assim, a **geometria 1** tem uma razão de expansão de 4 e a **geometria 2** tem uma razão de expansão de 20.

5.4.1 Resultados obtidos na geometria 1

Nesta fase do trabalho, são expostos os resultados da camada de plasma (CP) face à geometria 1, antes e depois da constrição, ou seja, como foram utilizados 3 distintos hematócritos (5%, 10% e 15%) e 3 diferentes caudais (2 $\mu\text{l}/\text{min}$, 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ e 10 $\mu\text{l}/\text{min}$). Os resultados expostos são os dos hematócritos em função dos diferentes caudais.

Na Figura 47, podem-se observar em particular as zonas exatas onde foram feitas as medições da CP (tanto para a geometria 1 como para 2, pois o que vai distinguir uma geometria da outra, é apenas a largura e comprimento de alguns canais), ao passo que na Figura 48, 49 e 50 podem ser visualizados os resultados obtidos da CM para o Hct 5%, 10% e 15% respetivamente, relativamente aos 3 distintos caudais.

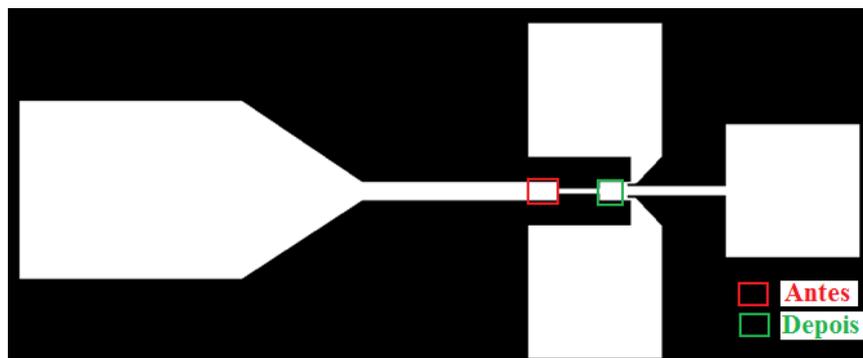


Figura 47: Geometria 1 com visualização das diferentes áreas de medição da CP (antes e depois).

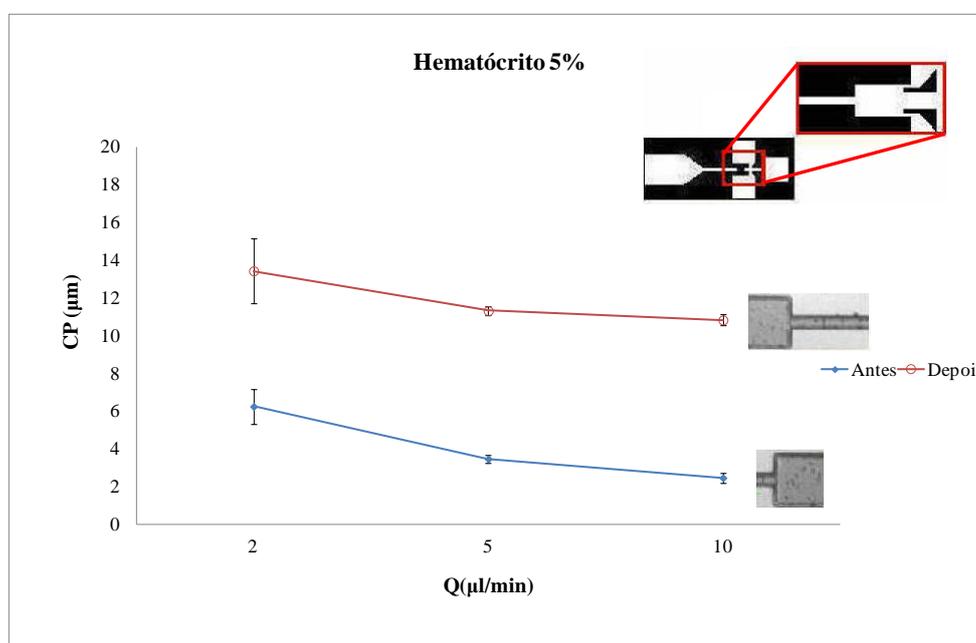


Figura 48: Estudo da espessura da CP do Hct 5% em função dos diferentes caudais.

Através da Figura 48, é possível fazer a análise da CP de um Hct de 5%, em função dos caudais, 2, 5 e 10 µl/min. Os resultados sugerem que a CP diminui ligeiramente com o aumento do caudal. Adicionalmente, comparando a CP antes e depois da constrição, os resultados sugerem que a CP após a constrição é cerca de **2.9 vezes**¹³ maior que a CP antes.

Relativamente aos erros expostos na representação gráfica da Figura 48, pode-se aferir que para o caudal 2, existe um erro bastante superior quando comparado com os erros dos

¹³ Média dos caudais depois da constrição, dividida pela média dos caudais antes de constrição.

outros caudais. Estes erros mais elevados podem ter sido gerados devido à existência de micro-bolhas durante o escoamento e a erros por parte do utilizador durante o processamento de imagem.

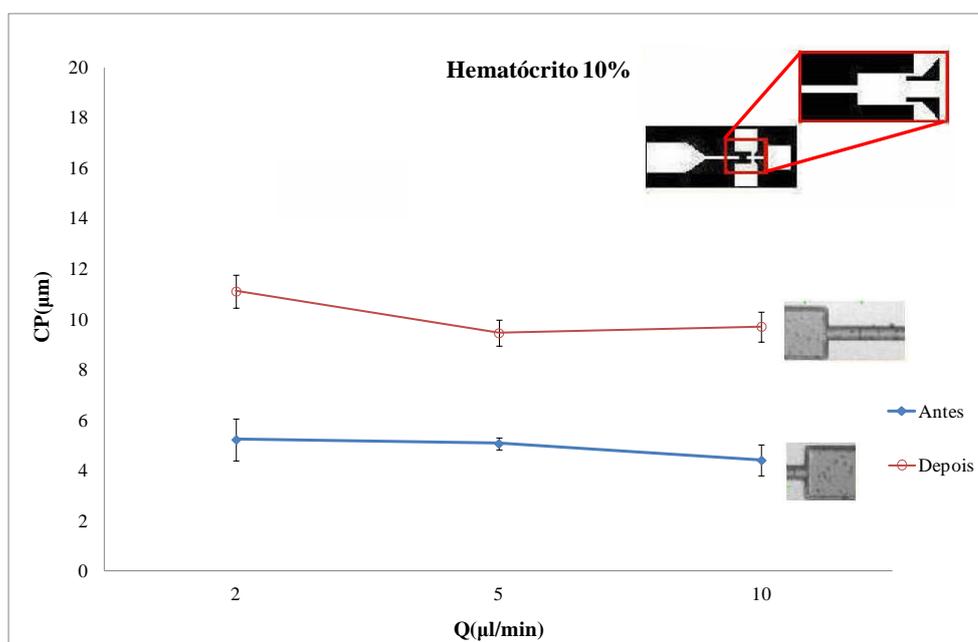


Figura 49: Estudo da espessura da CP do Hct 10% em função dos diferentes caudais.

Feito um estudo semelhante ao efetuado na Figura 49, mais uma vez se pode concluir que o caudal não tem grande influência na camada de plasma e é facilmente observável que a camada de plasma aumenta consideravelmente depois da constrição. Em termos gerais, a camada de plasma depois da constrição é cerca de **2.1 vezes** superior à camada de plasma antes da constrição.

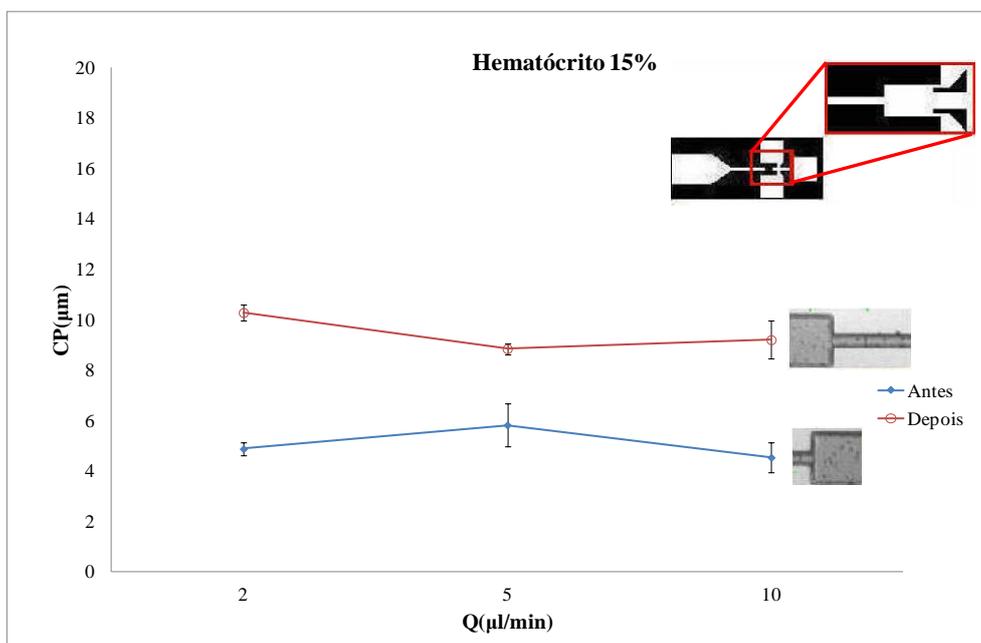


Figura 50: Análise da espessura da CP do Hct 15% em função dos caudais.

Relativamente à Figura 50, pode ser feita o mesmo tipo de análise que foi feita para as figuras anteriores (48 e 49). Mais uma vez é visível que o efeito da CP depois da constrição é bastante superior, tendo esta sofrido um aumento de cerca de **1.9 vezes** relativamente à CP antes da constrição.

5.4.2 Resultados obtidos na geometria 2

Neste subcapítulo, será feita a mesma análise de dados, só que desta vez para a geometria 2. Através das Figuras 51, 52 e 53, pode-se analisar quantitativamente a espessura da CP, quando comparados os Hct 5%, 10% e 15%, com os caudais 2 μl/min, 5 μl/min e 10 μl/min.

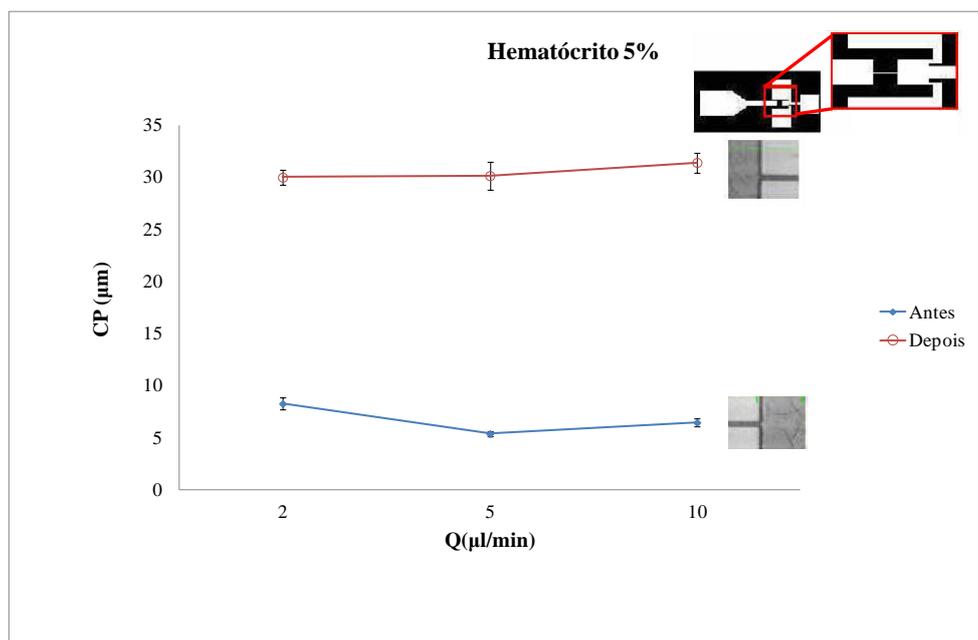


Figura 51: Estudo da camada de plasma para o Hct de 5%.

Tal como no subcapítulo 5.4.1, também aqui se efetuou o estudo da camada de plasma antes e depois da constrição na geometria 2, para diferentes caudais. Em termos gerais, mais uma vez se pode concluir que o caudal não tem grande influência na espessura da CP (ver Figura 51).

Fazendo o mesmo tipo de análise que nas figuras anteriores, pode-se aferir que depois da constrição a CP aumentou aproximadamente **4.6 vezes**.

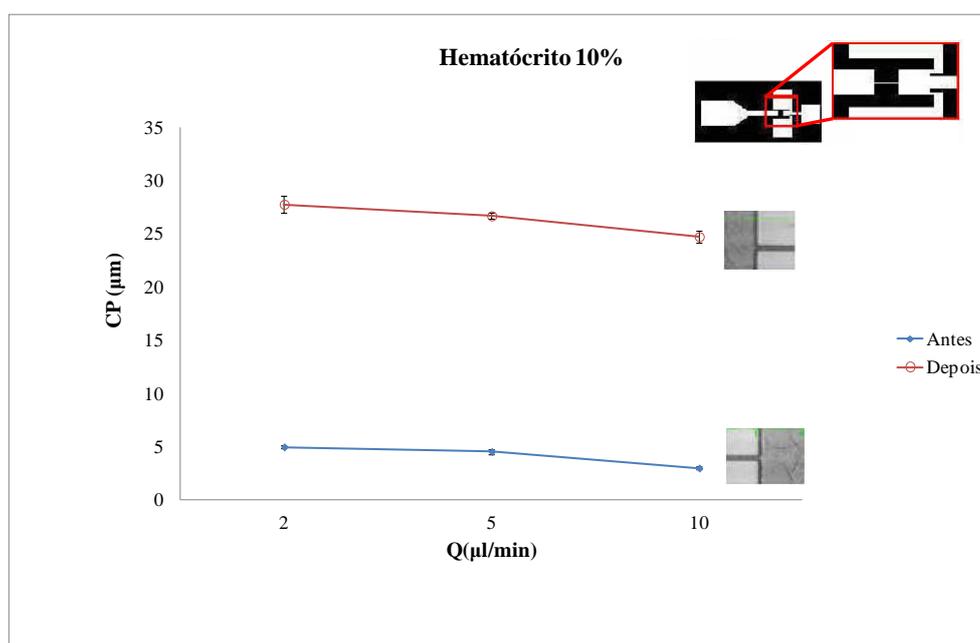


Figura 52: Observação da camada de plasma quando usado um Hct de 10%.

Além das considerações feitas nas figuras anteriores no que diz respeito à influência do caudal na CP, pode-se ainda referir que relativamente à Figura 52, mais uma vez é visível o aumento da espessura da CP depois da constrição, tendo esta sofrido um aumento médio de cerca de **5.9 vezes**.

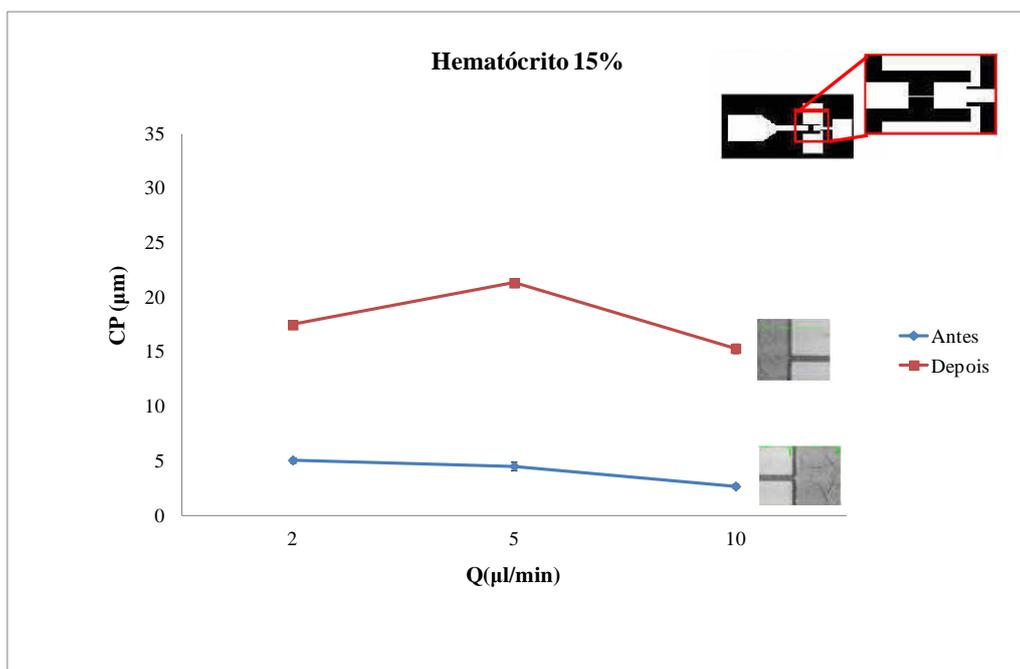


Figura 53: Estudo da camada de plasma quando usado um Hct de 15%.

Relativamente à Figura 53, e utilizando o Hct de 15%, a CP depois da constrição sofreu um aumento médio de cerca de **4.4 vezes**.

5.5 *Discussão dos Resultados*

Nesta secção são apresentados e discutidos os resultados da visualização do escoamento, avaliando o efeito da constrição na variação da espessura da CP.

5.5.1 **Comparação da Camada de Plasma e da diferença das constrições para diferentes Hct's para as geometrias 1 e 2.**

As Figuras 54 e 55 correspondem à análise da variação da CP, antes e depois da constrição para todos os escoamentos testados na geometria 1. Na Figura 54, estão representados os resultados da CP antes e depois da constrição para todos os Hct e caudais utilizados neste trabalho. Na Figura 55, são comparados todos os Hct no que diz respeito à diferença ($\Delta cp = cpD - cpA$) entre a camada de plasma antes (cpA) e depois da constrição (cpD).

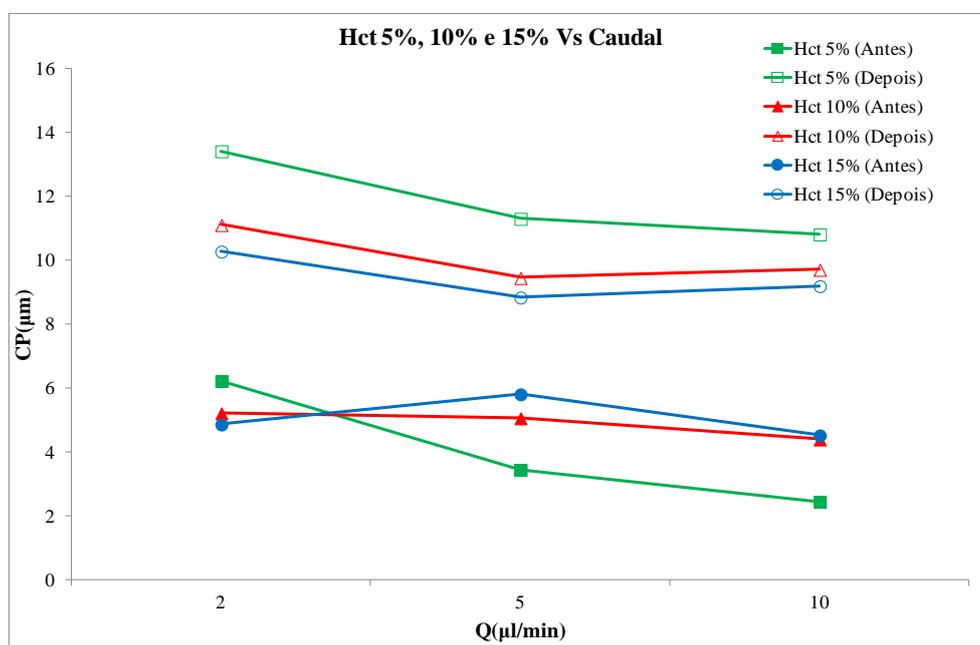


Figura 54: Análise da camada de plasma, antes e depois da constrição para todos os Hct em estudo.

Analisando a Figura 54, pode-se concluir que para todos os Hct estudados, a constrição proporciona um aumento da espessura da CP. Por outro lado, os resultados obtidos da CP a jusante da constrição sugerem que o aumento do Hct promove uma ligeira diminuição da CP.

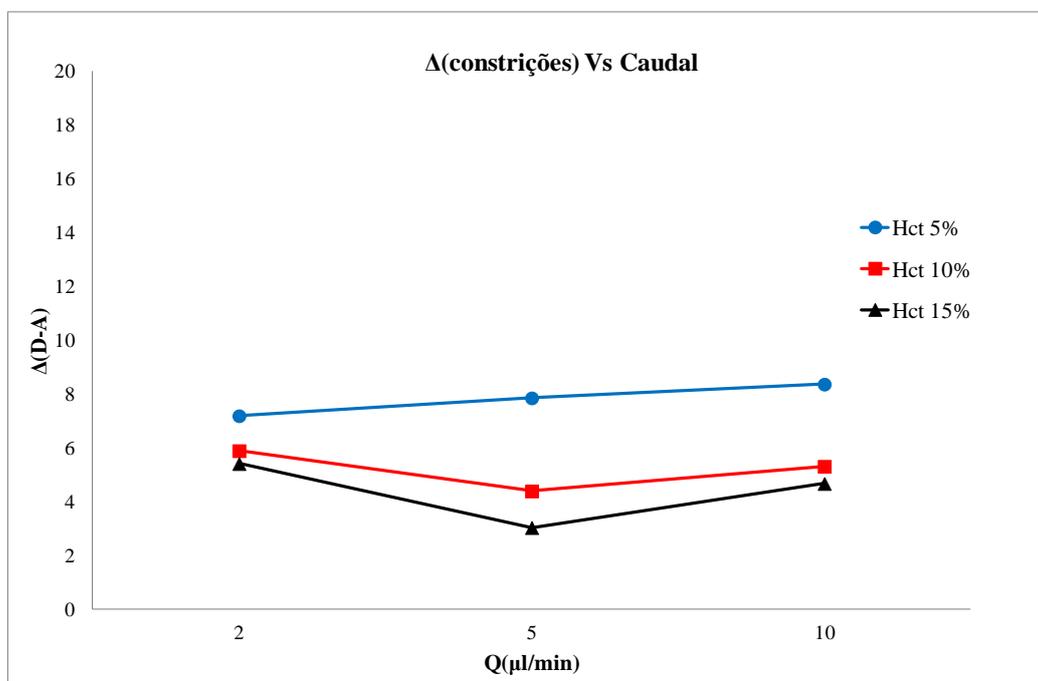


Figura 55: Diferença das constrições para todos os Hct quando comparadas com os distintos caudais ($\Delta cp = cpD - cpA$) entra a camada de plasma antes (cpA) e depois da constrição (cpD).

Na Figura 55, são apresentados os resultados da diferença da CP antes e depois da constrição para todos os Hct estudados, ou seja, $\Delta cp = cpD - cpA$. Os resultados sugerem que à medida que se aumenta o Hct, a CP tem a tendência a reduzir, o que corrobora os resultados da Figura 54. Quantitativamente e analisando por exemplo o caudal 2, afere-se que para um Hct 5%, tem um $\Delta cp = 7.2$, para um Hct 10%, tem um $\Delta cp = 5.9$ e por fim para um Hct de 15%, tem-se um $\Delta cp = 5.4$.

As Figuras 56 e 57 são referentes à **geometria 2**. Na Figura 56 foi efetuado o estudo da camada de plasma antes e depois da constrição para todos os hematócritos. Já na Figura 57, é feita uma análise para todos os hematócritos no que diz respeito à diferença ($\Delta cp = cpD - cpA$) da camada de plasma antes e depois da constrição.

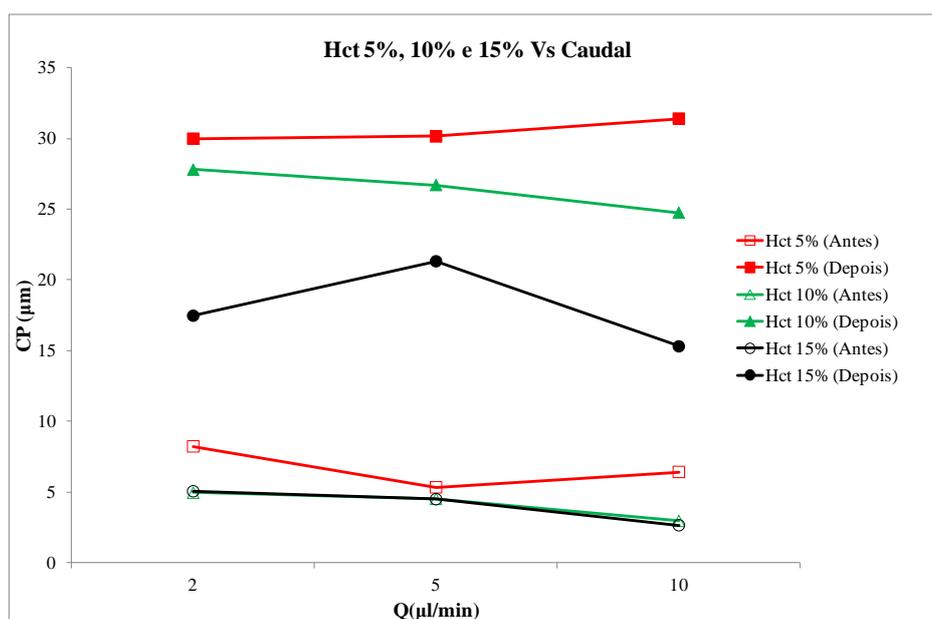


Figura 56: Análise da CP, antes e depois da constrição para os Hct 5%, 10% e 15%.

Através da Figura 56, pode-se concluir o mesmo que se concluiu para a Figura 54. Contudo, é importante referir que a linha que define o Hct 15% (a jusante) deveria ter um comportamento mais linear, mas tal não acontece, podendo este resultado ter sido condicionado por possíveis erros no decorrer do presente estudo de escoamento ou no tratamento das imagens, por parte do utilizador.

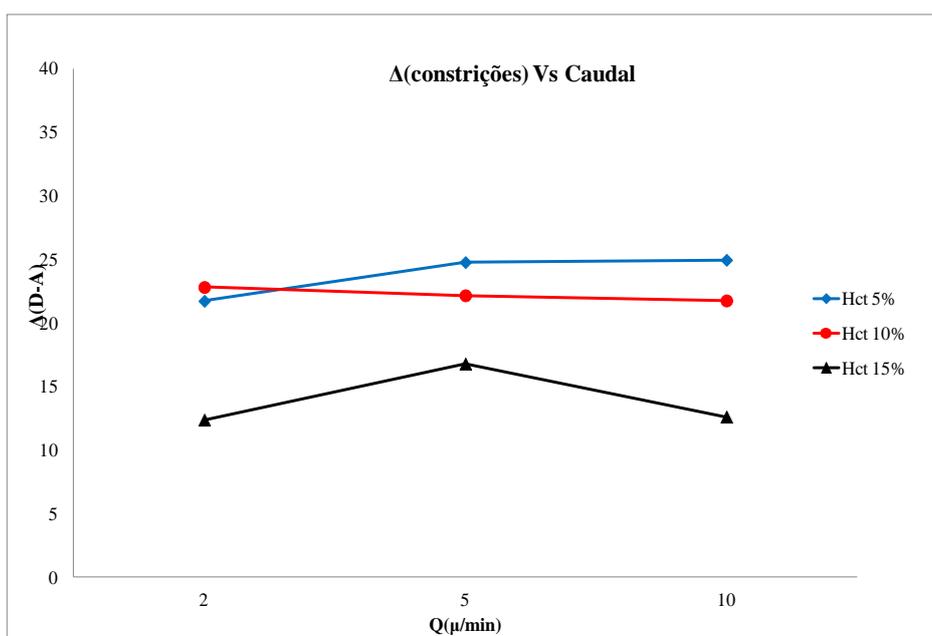


Figura 57: Diferença das constrições para todos os Hct quando comparadas com caudal de 2, 5 e 10 µl/min.

Mais uma vez, tal como na Figura 55, pode-se concluir que um aumento de Hct implica uma redução na diferença das constrições da CP (ver Figura 57). Novamente tomando como exemplo o caudal 2, a conclusão efetuada anteriormente é reforçada, uma vez que se verifica que para um Hct de 5% tem-se um Δ_{cp} de **22.8**, depois com um Hct 10%, há uma redução da Δ_{cp} para os **21.7**. Por último, para o Hct de 15 %, encontra-se o menor da Δ_{cp} de **12.4**.

5.5.2 Comparação da geometria 1 e 2 relativamente à diferença entre constrições

Nesta fase do trabalho, será feita uma comparação das duas geometrias criadas, de forma a aferir com qual delas se obtém uma maior CP face aos distintos hematócritos. É importante lembrar que a geometria 1 tem uma constrição de **50 μm** , enquanto a geometria 2 possui uma constrição de **20 μm** . Um dos objetivos desta análise é averiguar qual o efeito da constrição na camada de plasma.

A Figura 58, 59 e 60 são referentes ao Hct 5%, 10% e 15% respetivamente, para a geometria 1 (50 μm) e para a geometria 2 (20 μm).

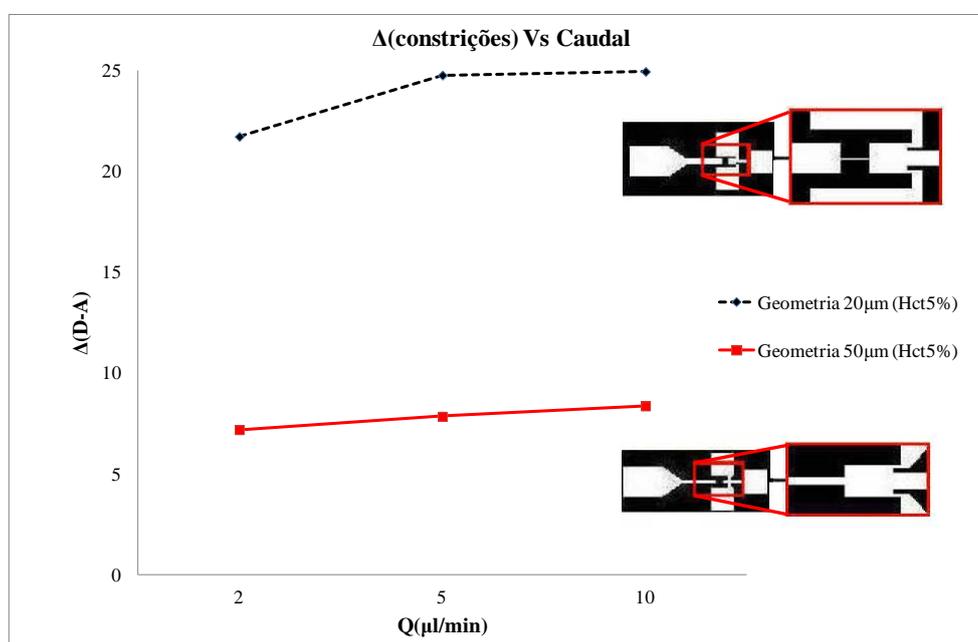


Figura 58: Comparação das duas geometrias face à diferença das constrições, para o Hct 5%.

Comparando os resultados das duas geometrias, estes demonstram que a **geometria 2** (20 μm) possui uma maior Δ_{cp} , o que leva a concluir que é nessa geometria que existe a

formação de uma maior camada de plasma a jusante da constrição. Pode ainda ser mencionado que a **geometria 2** (20 μm) possui um valor médio de 23.9 da Δ_{cp} , ao passo que a **geometria 1** (50 μm) possui um valor médio de 7.8 da Δ_{cp} , ou seja, a **geometria 2** possui uma diferença de constrições **3.1 vezes** maior que a **geometria 1**. Neste caso, (Hct=5%) existe uma ligeira tendência da Δ_{cp} aumentar com o aumento do caudal.

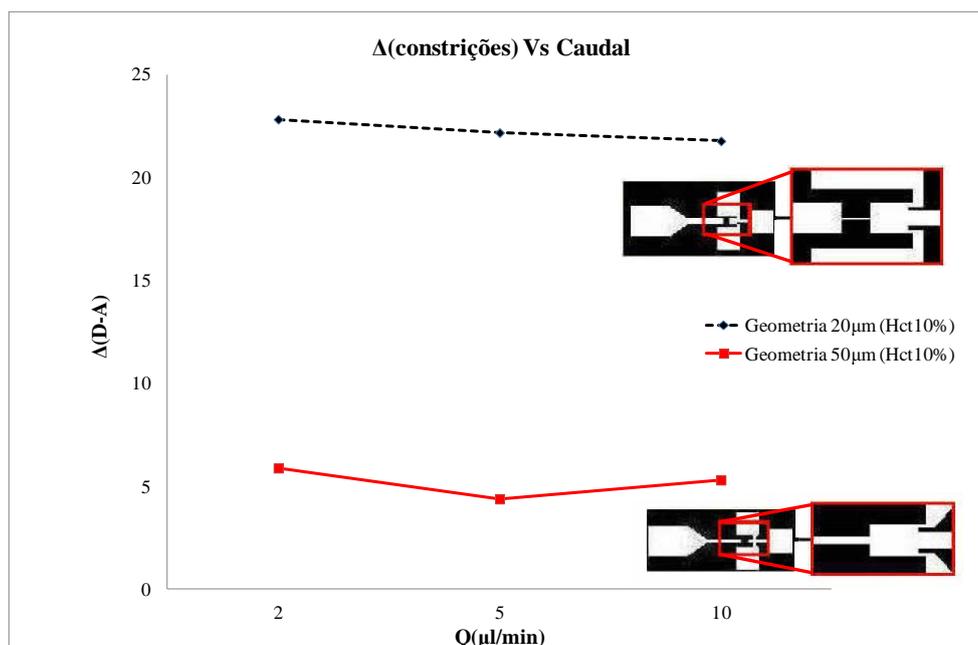


Figura 59: Comparação das duas geometrias face à diferença das constrições para o Hct 10%.

O mesmo acontece com os resultados apresentados na Figura 59, sendo notório que a **geometria 2** (20 μm) possui uma maior camada de plasma a jusante da constrição. A **geometria 2** apresenta um valor médio de 22.3 para a Δ_{cp} , enquanto a **geometria 1**, apresenta um valor médio de 5.2 o que leva a concluir que a **geometria 2**, possui uma Δ_{cp} de **4.3 vezes** superior à **geometria 1**.

De salientar que neste caso, ou seja para um Hct=10%, contrariamente ao caso anterior (Hct=5%), existe uma ligeira tendência do Δ_{cp} diminuir com o aumento do caudal.

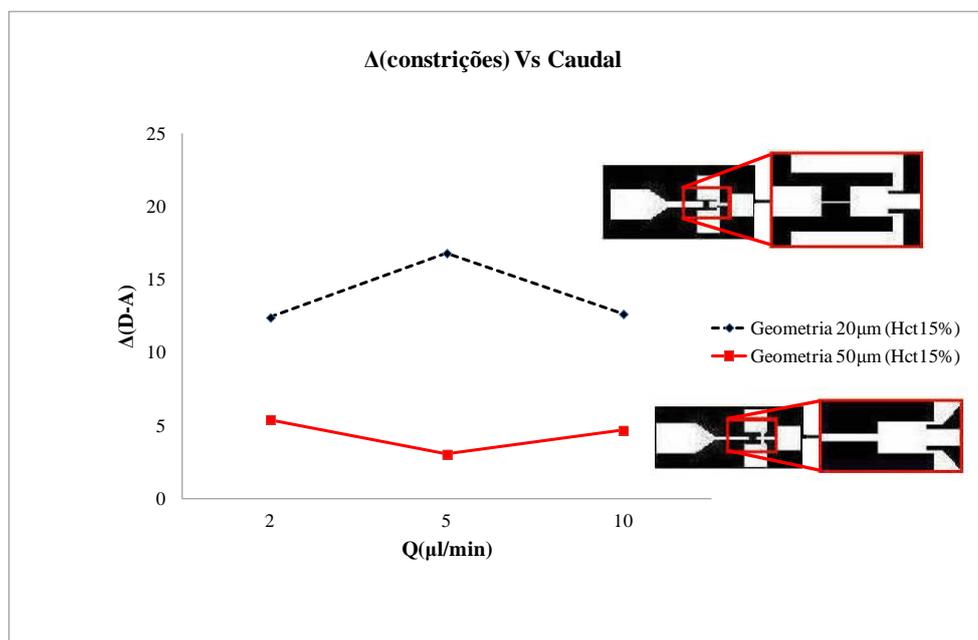


Figura 60: Comparação das duas geometrias face à diferença das constricções para o Hct 15%.

Por fim, face a este tipo de análise, mais uma vez é a geometria 2 (20 μm) a que possui uma maior Δ_{cp} relativamente à CP. Assim, conclui-se que é aquela que maior CP possui a jusante da constricção (ver Figura 60). Relativamente aos valores da Δ_{cp} , a **geometria 2** possui um valor médio de 13.95 e a **geometria 1** possui um valor médio de 4.4. Face a estes valores afere-se que a **geometria 2** tem uma Δ_{cp} **3.2 vezes** superior à **geometria 1**. Neste caso (Hct = 15%) e em particular, os resultados obtidos na geometria 1 sugerem uma ligeira tendência do Δ_{cp} em diminuir com o aumento do caudal, corroborando assim, os resultados obtidos com um Hct de 10%. Em termos gerais, estes resultados sugerem que o Hct influencia a “dimensão” da camada de plasma formada a jusante da constricção.

Sexto Capítulo

6 Ensaio Experimentais Executados no IPB- Parte 2: a separação com células sujeitas a um tratamento térmico

Esta fase do trabalho teve como finalidade o estudo da camada de plasma com a utilização de GVs saudáveis e GVs sujeitos a um tratamento térmico de forma a aumentar a rigidez das células sanguíneas.

Segundo Sangho e seus colaboradores (Sangho Kim et al. 2009), uma ligeira diminuição da espessura da camada de plasma, ocorre na presença de uma diminuição da deformabilidade dos GVs em ensaios experimentais *in vivo* e *in vitro*, ou seja, **a rigidez celular** provocará uma **diminuição** da CP [Sangho et al. (2009)].

É importante referir que, para o estudo desta fase apenas foi usada a **geometria 1**, uma vez que, teoricamente foi aquela que melhores resultados obteve, não esquecendo a elevada quantidade de dificuldades que surgiram na geometria 2, devido a sua pequena constrição (20 μm). A título de curiosidade pode ser referido que a grande facilidade de entupimento no canal de 20 μm foi o grande obstáculo dessa geometria.

Inicialmente, foi necessário ter a certeza que os GVs se deformavam. Para proceder à realização desta etapa, recorreu-se a sangue humano (GVs de tamanho superior aos GVs de ovino), uma vez que o processo da deformação de GVs se tornaria de mais fácil visualização.

6.1 **Materiais e Métodos**

Nesta fase foram necessários materiais como, balança, centrifugadora, *Dextrano 40*, Hct 5%, micropipetas, pipetas, sangue, soro fisiológico e tubos de centrífuga.

Todo o procedimento de lavagem do sangue foi efetuado, tendo-se realizado as lavagens do sangue com soro fisiológico com o auxílio da centrifugadora (onde foram realizadas duas lavagens do sangue com soro, uma primeira vez durante 15 minutos a 2000 rpm, seguido de uma segunda etapa com as mesmas características). Completa a fase de lavagem sanguínea, passou-se à fase de testes num micro-canal.

Aqui usou-se um micro-canal hiperbólico com características adequadas para se visualizar deformações. Na Figura 61, pode-se observar a geometria usada para comprovar a deformação dos GVs.

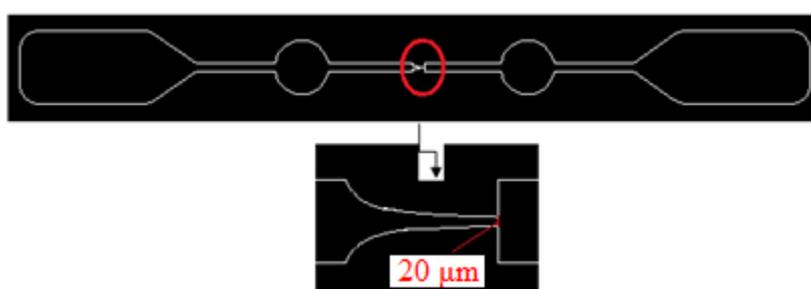


Figura 61: Geometria usada na deformação de GVs.

Antes de se passar à visualização das células, colocou-se uma amostra de sangue em banho-maria, a 45°C e durante 40 minutos. Seguidamente procederam-se aos testes da visualização da deformação.

Nas Figuras 62 e 63, é possível visualizar as regiões onde se analisou a deformabilidade dos GVs. Foram estudadas quatro regiões distintas, sendo estas definidas por região 1, 2, 3 e 4.

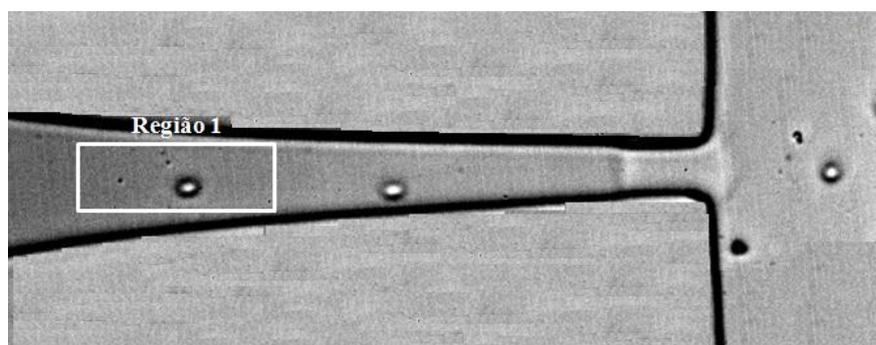


Figura 62: Região 1 do micro-canal onde se estudou o índice de deformação com tratamento.

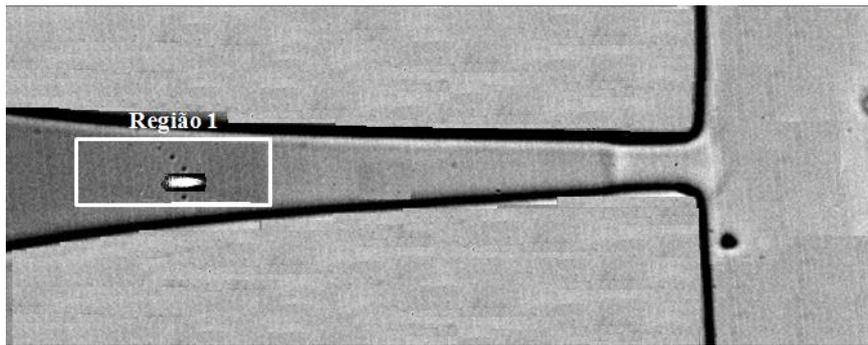


Figura 63:Região 1 do micro-canal onde se estudou o índice de deformação sem tratamento.

Quando comparadas as Figuras 62 e 63, onde se pode visualizar o estudo feito sobre a deformação, é mais que evidente que para a região 1 sem tratamento, o GV sofre uma maior deformação.

Nas Figuras 64 e 65 estão representadas as regiões 2, 3 e 4 do micro-canal em estudo.

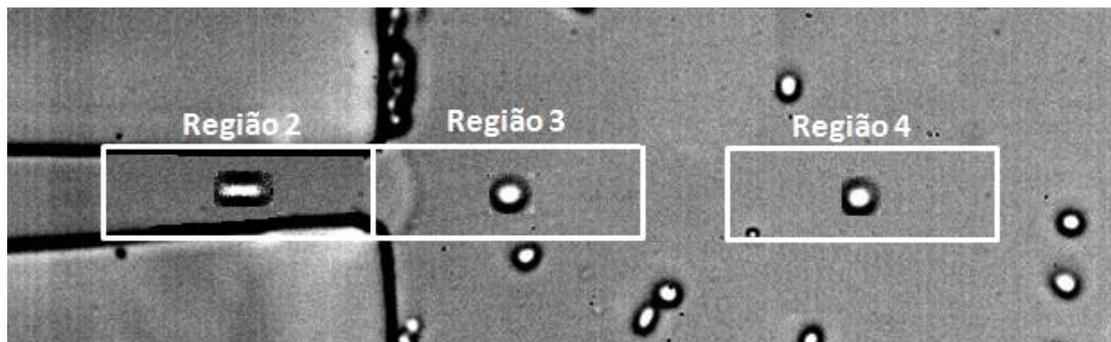


Figura 64:Regiões (2, 3 e 4) do micro-canal de análise do índice de deformação com tratamento.

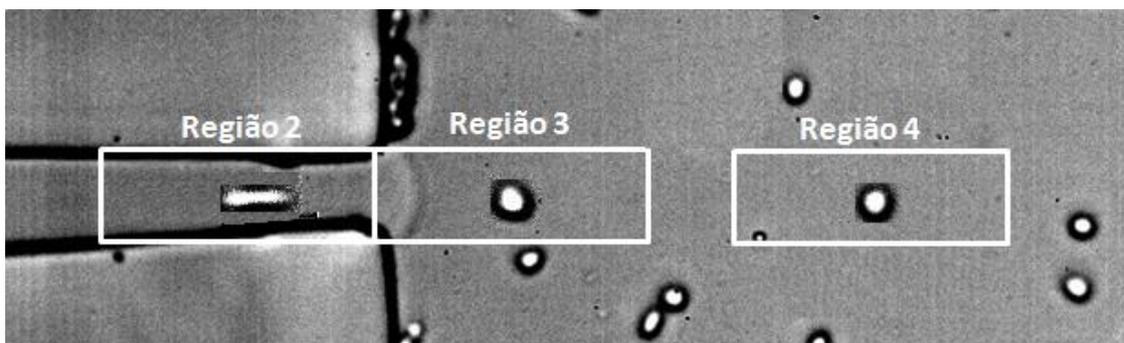


Figura 65: Regiões (2, 3 e 4) do micro-canal de análise do índice de deformação sem tratamento.

Ao se proceder à análise das regiões 2, 3 e 4 das Figuras 64 e 65, mais uma vez se pode concluir que, quando não se efetua tratamento existe uma maior deformação por parte dos

GVs. Contudo, nas regiões 3 e 4 sem tratamento não é muito visível a existência de mais deformação. No entanto, quando se procede aos cálculos do índice de deformação, consegue-se provar que realmente em todas as regiões de estudo quando não se efetua o tratamento térmico, o índice de deformação é superior quando comparadas às regiões onde ocorreu tratamento (ver Tabela 7).

Com o auxílio de uma bomba de seringa, um microscópio invertido e uma câmara de alta velocidade foi possível medir o índice de deformação dos GVs em várias regiões do micro-canal hiperbólico. Na tabela 7 e na Figura 67 são apresentados os resultados do índice de deformação dos GVs em distintas regiões com e sem tratamento, e a representação gráfica destes resultados.

A deformação dos GVs foi caracterizada pelo índice de deformação (ID), como se mostra na Figura 66, em que o X e Y se referem aos maiores (primário) e menores comprimentos (secundária) do eixo da elipse, sendo esta elipse equiparada à célula. Como se pode aferir pela Figura 66, quando o ID se aproxima de zero, pode-se concluir que não existe deformação, e que quando se afasta de zero, começa a aumentar o grau de deformação.

$$ID = \frac{X-Y}{X+Y} \begin{cases} ID = 0 \text{ } \circ \\ ID = 0.5 \text{ } \text{---} \end{cases}$$

Figura 66:Fórmula de cálculo do índice de deformação.

De uma forma sucinta, os vídeos capturados foram convertidos para uma sequência de imagens estáticas. De seguida, a fim de reduzir o ruído nas imagens, uma imagem de fundo foi criada e subtraída de todas as imagens originais. Este processo resultou em imagens que possuem apenas os glóbulos vermelhos visíveis. Para melhorar a sua qualidade, a filtragem de imagem foi feita usando *ImageJ*.

Tabela 7:Índice de Deformação nas distintas regiões.

	Índice de Deformação			
	Região1	Região2	Região3	Região4
Com Tratamento	0.32	0.42	0.14	0.08
Sem Tratamento	0.49	0.51	0.22	0.15

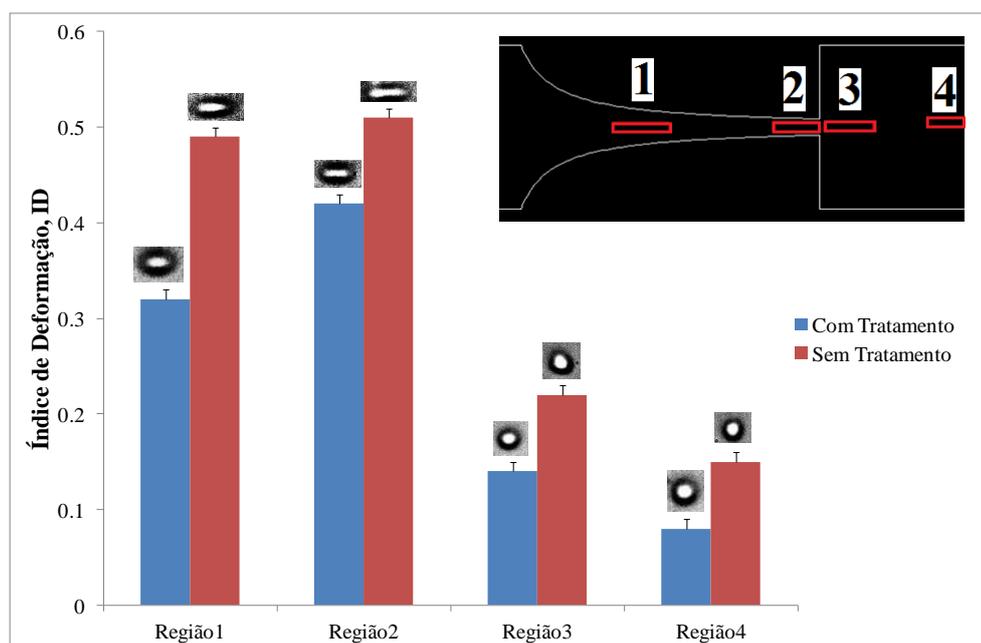


Figura 67: Índice de deformação nas diferentes regiões.

Através da Tabela 7 e da Figura 67 (onde os números 1, 2, 3 e 4 são referentes às distintas regiões), é possível aferir que o índice de deformação é superior em todas as regiões quando não se efetua tratamento térmico. É ainda exequível concluir que é na região 1 e 2 que se verifica um maior índice de deformação, sendo atingido o pico máximo de deformação na região 2 sem tratamento (ID = 0.51).

6.2 Métodos de Indução da Rigidez Celular

Terminada a fase anterior (testes de deformação), era necessário como já fora referido anteriormente induzir rigidez celular, de forma a ser exequível fazer o estudo relativo à camada de plasma aquando da rigidez. Para tal, foi necessário criar diferentes protocolos, tendo por finalidade a indução da rigidez.

Na Tabela 8, são apresentados os protocolos que foram criados na tentativa de induzir a rigidez celular, tendo em conta que apenas foi usado um Hct de 5% com uma temperatura ambiente de 22.2 °C.

SEXTO CAPÍTULO. Ensaios Experimentais Executados no IPB: Parte 2

Tabela 8:Parâmetros dos protocolos criados.

Células Saudáveis	Dx 40+ 3 horas (5°C) → Testar
Protocolo 1	Soro+ 40min (45°C) + centrifugação+ Dx 40+3horas (5°C) → Testar
Protocolo 2	Dx 40 +3 horas (5°C) +40 min (45°C)→Testar
Protocolo 3	Dx 40 +40 min (45°C)→Teste
Protocolo 4	Dx 40 +40 min (45°C) + 2-3 horas (5°C)→Testar
Protocolo 5	Soro → Testar
Protocolo 6	Soro + 40 min→ Testar

Face a todos os estes protocolos, foi conseguido com sucesso induzir a rigidez celular através de 3 deles (protocolo 1, 2 e 3), por conseguinte apenas serão apresentados os resultados para estes 3 protocolos.

6.3 Resultados

Na Tabela 9 apresentam-se os resultados numéricos obtidos através destes protocolos para a CP, e nas Figuras 68 e 69 são expostos os resultados obtidos quando se compara a CP antes e depois da constrição para os caudais 5 e 10 µl/min e quando se compara a diferença da CP antes e depois da constrição relativamente aos protocolos em que se obteve sucesso. Na Figura 70, pode-se visualizar a representação gráfica, quando se estuda a diferença de constrições (antes e depois) para todos os protocolos em função dos distintos caudais.

Tabela 9:Valores obtidos a partir dos protocolos criados.

Células Saudáveis					Protocolo 1				
Caudal	5	Erro	10	Erro	Caudal	5	Erro	10	Erro
Antes	3.4551	0.2059	2.4529	0.2527	Antes	2.9658	0.2279	2.4355	0.1921
Depois	11.3104	0.2282	10.8212	0.2911	Depois	8.88	0.3875	7.544	0.3896
Δ(D-A)	7.8553		8.3683		Δ(D-A)	5.9142		5.1085	
W2/W1	3.273538		4.411594		W2/W1	2.994133		3.097516	
Protocolo 2					Protocolo 3				
Caudal	5	Erro	10	Erro	Caudal	5	Erro	10	Erro
Antes	2.03883	0.1689	2.0887	0.1748	Antes	2.6424	0.2343	1.7204	0.1391
Depois	8.4009	0.3643	8.2473	0.3868	Depois	8.2481	0.3701	8.7028	0.6387
Δ(D-A)	6.36207		6.1586		Δ(D-A)	5.6057		6.9824	
W2/W1	4.120451		3.948533		W2/W1	3.121443		5.058591	

Observando a Tabela 9 e comparando os resultados obtidos das células saudáveis face aos três restantes protocolos, é possível concluir que os protocolos criados realmente induziram rigidez nas células saudáveis, isto porque ao comparar-se os resultados obtidos da camada de plasma antes e depois da constrição dos protocolos 1, 2 e 3, conclui-se que os valores da CP são sempre inferiores aos valores da CP das células saudáveis.

Relativamente à taxa de erro que se pode encontrar durante os três protocolos criados, é possível afirmar que a taxa de erro é bastante diminuta, encontrando-se o maior erro no protocolo 3, caudal 10, depois da constrição com um valor de **0.6387**, e é ainda neste protocolo, no mesmo caudal, mas agora antes da constrição, que também se encontra o menor erro, sendo este de **0.1391**.

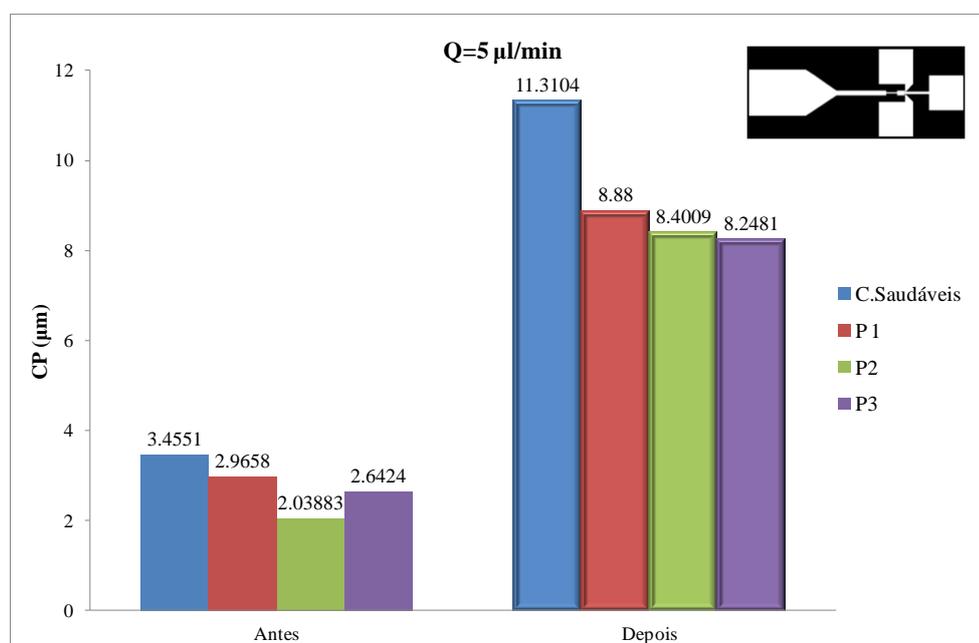


Figura 68: Estudo da CP antes e depois da constrição para todos os protocolos e para um caudal de 5 µl/min.

A Figura 68, expõe a representação gráfica da CP quando comparados os protocolos 1, 2 e 3 com as células saudáveis. Relativamente a esta representação, é possível aferir que os protocolos 1, 2 e 3 usados nas células saudáveis induziram rigidez, isto porque, tanto antes como depois da constrição, o valor da camada de plasma é sempre superior para as células saudáveis. É mais uma vez visível que depois da constrição, a CP é sempre superior.

Ao se efetuar a razão da camada de plasma depois e antes da constrição, observa-se que existe uma razão de **3.273**, **2.994**, **4.120** e **3.121** para as **células saudáveis**, **P1**, **P2** e **P3**,

respetivamente. Assim, pode-se concluir que o protocolo que melhores resultados obteve na indução celular para o caudal 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ foi o **P1**, pois foi aquele com o qual se obteve um menor valor para a CP comparativamente às células saudáveis.

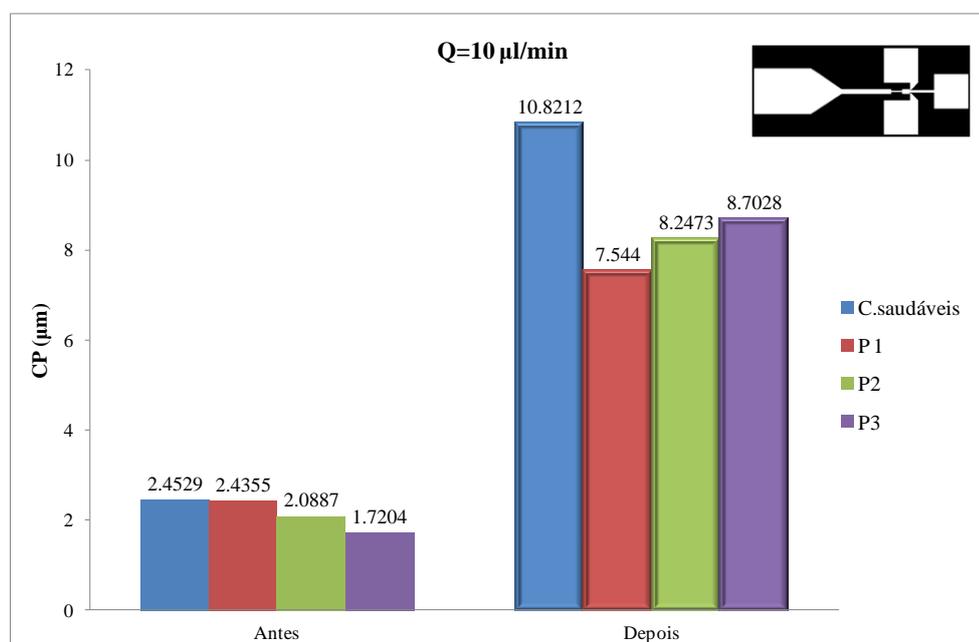


Figura 69: Estudo da CP antes e depois da constrição para todos os protocolos e para um caudal de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Para o caudal 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, (ver Figura 69) procedeu-se ao cálculo da razão da camada de plasma depois e antes da constrição, tendo-se obtido os seguintes valores: **células saudáveis** (4.4), **P1** (3.1), **P2** (3.9), **P3** (5.1). Face a estes resultados é possível confirmar que tal como para o caudal 5 $\mu\text{l}/\text{min}$, o protocolo que melhores resultados obteve para realizar a indução celular foi o **P1**, uma vez que, relativamente às células saudáveis, foi aquele que obteve menor valor para a CP.

6.4 **Discussão dos Resultados**

Seguidamente, na Figura 70, será apresentado sob forma gráfica, a relação existente quando se compara a diferença de constrições (antes e depois) com os distintos caudais (5 e 10), para as células saudáveis, protocolo 1, protocolo 2 e protocolo 3.

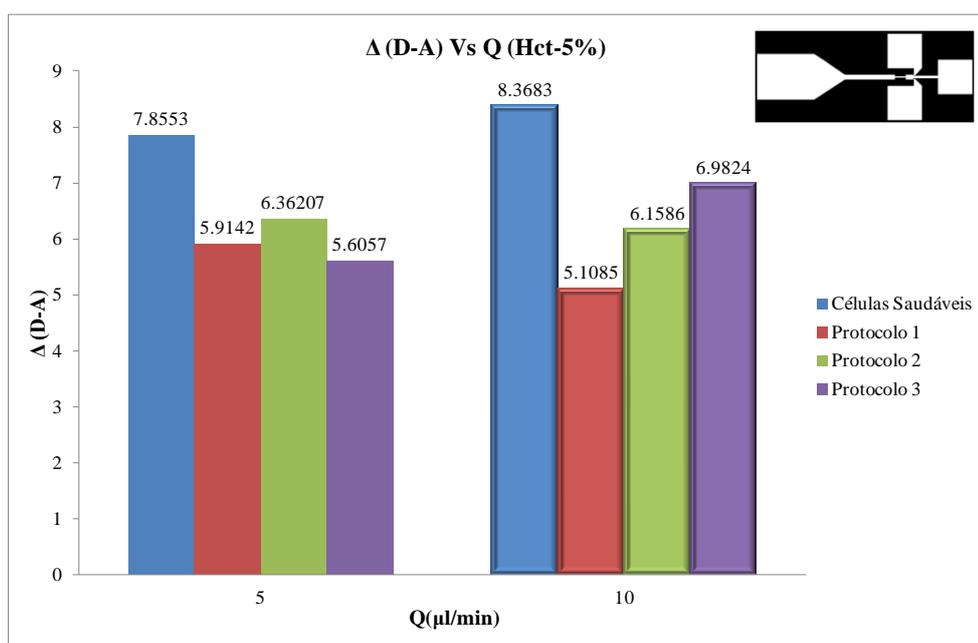


Figura 70: Diferença de constrictões (antes e depois) em função de distintos caudais para todos os protocolos.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 70, pode-se concluir que o Δ_{cp} correspondente às células saudáveis corresponde ao valor mais elevado para ambos os caudais estudados. Por outro lado, os resultados sugerem que para células saudáveis, o aumento do caudal tende a aumentar ligeiramente o Δ_{cp} . Relativamente às células sujeitas a um tratamento térmico, o Δ_{cp} é sempre inferior para todos os protocolos testados. No entanto, neste caso, enquanto que para o protocolo 1 e 2 o Δ_{cp} tende a diminuir com o caudal, no caso do protocolo 3 tal fenómeno não se verifica. Assim, em termos futuros é necessário realizar ensaios experimentais adicionais de forma a obter resultados mais conclusivos.

Sétimo Capítulo

7 Conclusões e Trabalhos Futuros

Este capítulo resume o trabalho apresentado neste projeto e sugere direções para mais trabalhos de investigação.

7.1 *Conclusões*

A finalidade deste projecto consiste no desenvolvimento de um *biochip*, com a capacidade de, num único passo, executar a separação e a deformação das células sanguíneas existentes na camada de plasma. O sucesso do desenvolvimento deste *biochip* integrado poderá suprimir horas de trabalho laboratorial e minorar possíveis erros de manuseamento, amplificando deste modo, a exatidão do diagnóstico de diversas doenças.

Este projeto divide-se em duas partes principais. A primeira parte, compreende todo o processo de *design* e fabricação do microdispositivo por litografia suave usando moldes fabricados por fotolitografia criados a partir de desenhos produzidos no *software AutoCAD*. A segunda parte, baseia-se no estudo do escoamento sanguíneo nestes dispositivos dando especial atenção à deformação e rigidez celular.

As conclusões sumárias e principais deste projeto são apresentadas seguidamente. Relativamente à **primeira parte do projeto**, pode-se aferir que as geometrias dos micro-canais para efetuar o estudo da micro-circulação sanguínea, separação e deformação das células da camada de plasma foram projetadas e fabricadas com sucesso. Usando técnicas de análise como o perfilómetro e o SEM, pode concluir-se que o controlo dimensional e geométrico foi suficiente para o tipo de experiências em questão. O uso do polímero PDMS empregue durante o processo de fabricação permitiu o desenvolvimento de micro-canais para o estudo *in vitro* do escoamento sanguíneo à micro escala. De salientar, que a técnica de fotolitografia usada durante o processo de micro-fabricação foi uma mais-valia para a

realização deste projeto, tendo demonstrado grande qualidade na replicação dos padrões pretendidos.

Relativamente às conclusões tiradas na **segunda parte do projeto** (na análise da variação da espessura da camada de plasma), pode-se afirmar que, relativamente às duas geometrias criadas, a geometria 1 com uma razão de expansão de **4** e a geometria 2 com uma razão de expansão de **20**, o estudo efetuado com a geometria 2, conduziu a uma série de obstáculos, como a obstrução dos micro-canais devido ao tamanho muito reduzido da constricção. Contudo é importante referir, que foi com a geometria 2, que se obteve maiores valores para a camada de plasma, daí se poder concluir que a razão de expansão tem uma elevada influência na espessura da camada de plasma, ou seja, quanto **maior** a razão de expansão, **maior** a camada de plasma. Adicionalmente, os resultados também demonstram que a camada de plasma é sempre superior a jusante da constricção. Quando comparados os valores da diferença da espessura da camada de plasma (jusante -montante), é evidente que o fluido com um Hct de 5% é aquele que possui maiores valores, seguido do fluido com um Hct de 10% e por fim o fluido com um Hct de 15%. Quando comparados estes valores da diferença da espessura, é bastante visível que é sempre na geometria 2 que se obtêm os maiores valores. Relativamente aos estudos referentes à deformação, rigidez e novamente à espessura da camada de plasma, conclui-se que apenas três dos sete protocolos resultaram com sucesso na indução da rigidez celular, uma vez que os valores da camada de plasma depois da utilização destes protocolos reduziam significativamente quando comparados aos valores da camada de plasma das células saudáveis.

Como conclusão final, pode-se ainda mencionar que foi o **protocolo 1**, aquele que obteve melhores resultados na indução da rigidez, uma vez que foi aquele que quando comparado com as células saudáveis obteve uma menor camada de plasma. Este resultado corrobora outros estudos onde verificaram que uma maior indução de rigidez celular implica uma diminuição na camada de plasma.

7.2 *Trabalhos Futuros*

A pesquisa realizada nesta tese fornece a base para novos trabalhos de investigação em vários desafios científicos no campo biomédico. Alguns dos muitos tópicos de investigação possíveis que devem ser tratados num futuro próximo são:

- I. Micro-canais de PDMS circulares- A técnica de fotolitografia tem a capacidade de fabricar micro-canais em PDMS de forma retangular, com características precisas, reprodutíveis e versáteis. Usando esta técnica, é possível criar geometrias complexas do sistema micro cardiovascular, que imitam na perfeição arteríolas e capilares por exemplo. No entanto, o comportamento do escoamento sanguíneo através deste tipo de micro-canais pode apresentar características diferentes do que realmente acontece nos vasos sanguíneos. Desta forma, é imperativo o desenvolvimento de micro-canais circulares em PDMS de forma a imitar ambientes *in vivo*, tal como foi referido no subcapítulo 3.3.1.
- II. Repetição de testes- Seria interessante repetir novamente alguns testes com uma câmara de alta velocidade e objetiva com maiores potencialidades, de forma a melhorar a resolução das imagens e validar alguns dos resultados obtidos.
- III. Aumento das variáveis- Com a finalidade de obter uma vasta gama de resultados, seria interessante aumentar o número de hematócrito e o número de caudais estudados. Deste modo poder-se-ia confirmar se o caudal tem ou não realmente influência sobre a camada de plasma.
- IV. Método automático- Dentro do *software ImageJ*, usou-se comando *Add tracks* do plugin *MtrackJ* para obter a trajetória da camada de plasma. Apesar de ser um método eficiente, é bastante moroso para o utilizador, fazendo com que este esteja suscetível a cometer erros. Assim sendo, torna-se importante a criação de um método automático de forma a reduzir o tempo, e evitando deste modo um trabalho tedioso para o utilizador.
- V. Propostas- Face ao grande interesse por esta área de investigação, seria pertinente/interessante, proceder à investigação/teste, do efeito da camada de plasma por parte de células cancerígenas.

Bibliografia

- Abkarian, M., Faivre, M., Stone, H.A., *High-speed microfluidic differential manometer for cellular-scale hydrodynamics*. Proc. Nat. Acad. Sci. Vol.42 (2006), pp: 103-538.
- Andersson, H., Van den Berg, A., *Microfluidic devices for cellomics: a review*, *Sensores and Actuators*, Vol.92 (2003), pp: 315-325.
- Arruda, R., *Permeabilidade de silicones e seus derivados*, São Paulo: Dow Corning, (2004), pp:14.
- Balloni, A.J., *Prototipagem Rápida de Circuitos Integrados*, CenPRA/MCT Campinas, (1999).
- Banks, D., *Introduction to microengineering: MEMS: Banks*, (2002).
- Bessis, N., Mohandas, N., *Mesure continue de la déformabilité cellulaire par une méthode diffractométrique*. C R Acad Sci Paris, (1974), pp: 263-65.
- Bokhorst, E., *Microfluidic Flow in Porous Medium Analogues*, Integrated Master in Chemical Eng., (2010).
- Brooks, D., E., Evans, E., A., *Rheology of blood Cells*. In: “Clinical Hemorheology”, S. Chien, J. Dormandy, E. Ernst, A. Matrai (eds), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, (1987), pp: 73-96.
- Burton, A., *Physiology and Biophysics of the circulation*, Year Book Medical Publishers, (1966).
- Caro, C., Pedley, T., Schroter, R., Seed W., *The mechanics of the circulation*, Oxford University Press, (1978).
- Castro, S.,A.,L., *Processamento de Amostra para a microscopia eletrônica de varredura*, (2002), pp:9-15.
- Cheng, J., Kricka, L. J., Wilding, P., In *Microsystem Technology in Chemistry and Life Sciences*, Manz, A., Becker, H., In: *Topics in Current Chemistry*, Vol.194 (1998), Springer-Verlag, pp: 215-231.
- Chien, S., *Determinants of blood viscosity and red cell deformability*. Scan J Clin Lab Invest. Vol. 41, (1981), pp: 7-12.
- Chien, S., Usami, S., Skalak, R., *Blood flow in small tubes* In: *Handbook of Physiology – The cardiovascular system IV*, (1984) pp: 217-249.

- Chong, H. A., Jin-Woo, C., Gregory, B., Joseph H, N., Jeong-Bong, L., Aniruddh, P., et al., *Disposable Smart lab on a chip for point-of-care clinical diagnostics*. Proceedings of the IEEE, Vol.92, (2004), pp: 73-154.
- Cidre, D.C.M., *Estudo numérico e experimental do escoamento sanguíneo em canais com bifurcações*, IPB, (2010).
- Correia, J., H., Carmo, J., P., *Introdução às microtecnologias no silício*. Edição apoiada por: Algoritmi (Universidade do Minho) e FCT (Fundação para a ciência e a Tecnologia), Editora: Lidel, (2010), edições técnica, lda. pp: 15-27; 29; 59-81; 173-197.
- Dahlin, A.P., Bergstrom, S.K., Andren, P.E., Markides, K.E., Bergquist, J., *Poly-(dimethylsiloxane)-based microchip for two-dimensional solid-phase extraction-capillary electrophoresis with an integrated electrospray emitter tip*. Anal Chem, Vol.77, (2005), pp: 5356– 6330.
- De Mello, A. J., Beard, N., *A microchip- based proteolytic digestion system driven by electroosmotic pumping*, (2003).
- Dias, T, C, S., *A química da silicone*, Cosméticos & Toiletries, Vol. 16, (2004), nº 2, pp: 52-56.
- Dormandy J. “*Red Cell Deformability and Filtrability*”, Martinus Nijhoff Publishers, (1983).
- Duarte, L. C., et al., *Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistemas de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas*, Vol.30, (2003), pp: 3-15.
- Fahraeus, R., Lindqvist, T., *The viscosity of the blood in narrow capillary tubes*. Am. J. Physiol, Vol.96, (1931), pp. 562-568.
- Faivre, M., Abkarian, M., Bickraj, K., Stone, HA., *Geometrical focusing of cells in a microfluidic device: an approach to separate blood plasma*. Biorheology, Vol.43, (2006), pp: 147-159;
- Ferreira, T., Rasband, W., *The imagej user guide*, (2011).
- Fujiwara, H., Ishikawa, T., Lima, R., Matsuki, N., Imai, Y., Kaji, H., Nishizawa, M, Yamaguchi T., *Red blood cell motions in high-hematocrit blood flowing through a stenosed microchannel*. *Journal of Biomechanics*, Vol 42, (2009), pp: 838-843.
- Fung, Y., *Biomechanics – Mechanical properties of living tissues*, second edition, Springer-Verlag, New York, (1993).
- Giddens, D., Zarins, C., Glagov, S., *The role of fluid mechanics in the localization and detection of atherosclerosis*. Journal of Biomechanical Engineering Vol.115, (1993), pp: 588-594.

- Goldsmith, H., *Red cell motions and wall interactions in tube flow*, Federation Proceedings Vol: 30(5), (1971a), pp: 1578-1588.
- Goldsmith, H., *Deformation of human red cells in tube flow*, Biorheology Vol:7, (1971b), pp: 235-242.
- Goldsmith, H., Turitto, V., *Rheological aspects of thrombosis and homeostasis: Basic principles and applications*, Vol.55, (1986), pp: 43-415.
- Goldstein, J. I., Newbury, D., E., Echlin, P., Joy, D., C., Romig Jr., A. D., Lyman, C., E., *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*, Plenum Press: New York, (1992), pp: 820.
- Golster, H., Linden, M., Bertuglia, S., Colantuoni, A., Nilsson, G., Sjoberg, F., *Red blood cell velocity and volumetric flow assessment by enhanced high-resolution laser Doppler imaging in separate vessels of hamster cheek pouch microcirculation*. Microvascular research, Vol.58, (1999), pp: 62-73.
- Gossett, Daniel, R., Westbrook, M., Weaver, Albert, J., Mach, Soojung C., H., Henry, Tat, K., T., Wonhee, L., Hamed A., Dino, Di C., *Label-free cell separation and sorting in microfluid systems*, Vol.397, (2010), pp: 3249-3267.
- Huang, R., Barber, T.A., Schmidt, M.A., Tompkins, R.G., Toner, M., Bianchi, D.W., Kapur, R., Flejter, W.L., *A microfluidics approach for the isolation of nucleated red blood cells pa(NRBCs) from the peripheral blood of pregnant women*. Prenat Diagn Vol.28, (2008), pp: 892-899.
- Ichihara, A., Tanaami, T., Isozaki, K., Sugiyama, Y., Kosugi Y., Mikuriya K., *High-speed confocal fluorescent microscopy using a Nipkow scanner with microlenses for 3-D imaging of single fluorescent molecule in real time*. Bioimages Vol.4, (1996), pp: 57-62.
- Inoue, S., Inoue, T., *Direct-view high-speed confocal scanner: the CSU-10*. Cell Biological Applications of Confocal Microscopy, Academic Press, (2002), pp: 87-127.
- Swart, J. W., "Materiais Elétricos", curso de materiais elétricos, (2002).
- Jäggi, RD., Sandoz, R., Effenhauser, CS., *Microfluidic depletion of red blood cells from whole in high-aspect-ratio microchannels*. Microfluid.Nanofluid. Vol.3, (2006), pp: 47-53;
- Ji, H., Samper, V., Chen, Y., Heng, C., Lim, T., Yobas, L., *Silicon-based microfilters for whole blood cell separation*. Biomed Microdevices, Vol.10, (2008), pp: 251-257.

- Jia, Y.F., Jiang, J.H., Ma, X.D., Li, Y., Huang, H, M., Cai, K.B., *PDMS microchannel fabrication technology based on microwire-molding*, Chin Sci Bull, Vol.53, (2008), pp: 3928- 36.
- Johnson, R., M., *Ektacytometry of red blood cells*. Subcell Biochem, Vol. 23, (1994), pp: 161-203.
- Junior, F. P. N., *Caracterização e otimização dos processos de fotolitografia aplicados na fabricação de dispositivos micrométricos MOS e microssistemas*, (2004), pp:4 4-40.
- Kieseweter, H., Daver, V., Gesch, M., Seiffge, D., Angelkort, B., Schmid-Schönbein, H., *A method for the measurement of the red blood cell deformability*. Scand J. Clin. Lab. Invest. Vol.41, (1991), pp: 229-232.
- Kricka, L. J., Wilding, P., *Microchip PCR*, In: Analysis Bioanal. Chem, Vol.377, (2003), pp: 820-825.
- Kyongmi, C., Jihee, M., Shhan, K., Sang-Don, K. and Jaeweon, C., *Bioparticle separation using microfluidic porous Plug for environmental monitoring*, Vol.23, (2007), pp: 202-215.
- Leblond, P., *The discocyte echinocyte transformation of the human red cell: deformability characteristics*. In: "Red Cell Shape", New York, (1973), pp: 95-104.
- Levick, J., *An Introduction to Cardiovascular Physiology*, fourth ed., Arnold, (2003).
- Li, J., Zhang, Z., Rosenzweig, J., Wang, YY., Chan DW, *Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast Cancer*. Clin.Chem, Vol.48, (2002), pp: 1296-1304;
- Li, N., Tourovskaia, A., Folch, A., *Biology on a Chip: Microfabrication for studying the behavior of cultured cells*, Critical Reviews™ in Biomedical Engineering, Vol.31, (2003), pp: 423-488.
- Lima, R., Oliveira, M., Yaginuma, T., Ishikawa, Imai, Y e Yamaguchi, T., *Development of a Microfluidic Device for Partial Cell Separation*, (2011).
- Lima, R., *Analysis of the Blood Flow Behavior through Microchannels by a Confocal Micro-OIV/PTV System*, Tohoku University, Cap.1 (2007), pp: 1-18.
- Lima, R., Ishikawa, T., Imai, Y. and Yamaguchi, T., *Blood flow behavior in microchannels: Past, current and future trends*, (2012), pp: 1-2.
- Lin ,WJ., Chen, WC., *Theoretical Analysis of Baking Process in Two Polymer/Solvent Systems: PMMA/Anisole and PMDA-ODA/NMP*, Jornal of The Eletrochemical Society, Vol.148, (2001), pp: 621-626.

- Lindsey, K. Fi., Neta, R., Suthan, S., Ethan, T., Craig A. S., Aaron R., Wheeler, Eugenia Kumacheva, *A circular cross-section PDMS microfluidics system for replication of cardiovascular flow conditions*, Vol.31, (2010), pp: 3459-3464.
- Lorenzo,G., David, C., *Depósitos por Sputtering*, (2009).
- MacDonald, M.P., Spalding, G.C., Dholakia, K., *Microfluidic sorting in an optical lattice*. Nature, Vol.426, (2003), pp: 421 – 424.
- Maeda, N., *Erythrocyte rheology in microcirculation*. In: Japanese Journal of Physiology, Vol. 46, (1996), pp: 1-14.
- Malek, C. K., “*Introdução à microlitografia e sua aplicação a microeletônica*”, apostila do curso de microlitografia, IFUSP e LNLS, (1990).
- Marques, M., J., Vasconcelo, M., J., André, M., M., *AutoCAD 2005, 2D*, Fundação para a Divulgação das Tecnologias de Informação, Lisboa, (2004).
- Martins, M., *Produção de superfícies seletivas por magnetron sputtering para aplicação em coletores solares*, (2010), pp: 17-49.
- McDonald, J.C., Duffy, D., C., Anderson, J., R., Chiu, D., T., Wu, H., Schueller, O., J, *Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)*, Electrophoresis, Vol. 21, (2000), pp:27-40;
- Mchedlishvili, G., Maeda, N., *Blood flow structure related to red cell flow: a determination of blood fluidity in narrow microvessels*. Japanese Journal of Physiology, Vol.51, (2001), pp: 19-30.
- Meinhart, C., Wereley, S., Gray, H., *Volume illumination for two-dimensional particle image velocimetry*. Measurement Science and Technology Vol.11, (2000) pp: 809-814.
- Meinhart, C., Wereley, S., Santiago, J., *A PIV algorithm for estimating time-averaged velocity fields*. Journal of Fluids Engineering, Vol. 122, (2000), pp: 285-289
- Meinhart, C., Wereley, S., Santiago, J., *PIV measurements of a microchannel flow*. Experiments in Fluids, Vol. 27, (1999), pp: 414-419.
- Meireles, C., Pereira, A., Yaginuma, T., Lima, R., *Analysis of the Cell-Free Layer in a Circular Microchannels: Trajectories of Labeled Red Blood Cells*, (2011).
- Microchem, acessado em Janeiro de 2012 em, www.microchem.com.
- Milica, R., Rohin, I. and Shashi K, M., *Micro and nanotechnology in cell separation*. International Journal of Nanomedicine (2006), pp: 3-14.

- Milne, G., Rhodes, D., MacDonald, M., Dholakia, K., *Fractionation of polydisperse colloid with acousto-optically generated potential energy landscapes*. Opt Lett Vol.32, (2007), pp: 1144-1146.
- Mishra, R., *Photoresist development on sic and its use as an etch mask for sic plasma etch*, M.S. thesis, Department of Electrical and Computer Engineering, Mississippi State University, (2002).
- Mohamed, Al-Fandi., Mohammad, Al-Rousan., Mohammad, A.K., Jaradat, L. Al-Ebbini., *New design for theseparation of microoganisms using microfluidic deterministic lateral displacement*, Vol.27, (2011), pp: 237-244.
- Mohandas, N., Chasis, J., A., *Red Blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids*. Semin Hematol. Vol.30, (1993), pp: 171-92.
- Musielak.M., *Red Blood Cell-deformability measurement: Review of techniques*, Vol. 42, (2009), pp: 47-64.
- Nan, L., Daniel, K. and Chih-Ming, H., *On-Chip continuous blood cell subtype separation by deterministic lateral displacement*, In: Proceedings of the 2nd IEEE international conference on nano/micro engineered and molecular systems, Thailand, (2007).
- Nguyen, N., Wereley, S., *Fundamentals and applications of microfluidics*, Norwood, MA: Artech House, 2002.
- Nianzhen, Li., Tourovskaia, A., Folch, A., *Biology on a Chip: Microfabrication for Studying the Behavior of Cultured Cells*. Critical Reviews™ in Biomedical Engineering, Vol: 31, (2003), pp: 423-488.
- Rai-Choudrury, P., *Handbook of Microlitography and Microfabrication: Microlithography*, SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Washington, USA, Vol.1, (1997), pp: 3-135.
- Paegel, B., M., Blazej, R.,G., Mathies, R., A, *Microfluidic devices for DNA sequencing: sample preparation and electrophoretic analysis*, In: Current Opin. Biotechnol, Vol.14, (2003), pp: 42-50.
- Parot, P., Dufrene, Y., F., Hinterdorfer, P., Le Grimellec, C. Navajas, D., Pellequer, J., C., and Scheuring, S., *Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine*, J. Mol. Recogn.Vol. 20, (2007), pp: 418– 431.

- Patavino, G., M., Silveira, P., A., Gualandro, S., F., M., Yokomizo, I., K., Moromizato, D., M., T., *Deformabilidade eritrocitária na anemia ferropriva (Erythrocyte deformability in iron deficiency)*, Vol.28, (2006), pp:253-257.
- Perry, H., Greiner, C., Georgakoudi, I., Cronin-Golomb, M., Omenetto, F.G., *Simple fabrication technique for rapid prototyping of seamless cylindrical microchannels in a polymer substrate*, Rev Sci Instrum, Vol.78, (2007).
- Pries, A., Neuhaus, D., Gaehtgens P., *Blood viscosity in tube flow: dependence on diameter and hematocrit*, Am J Physiol, Vol. 263, (1992), pp: 1770-1778.
- Pries, A., Secomb, T., Gessner, T., Sperandio, M., Gross, J., Gaehtgens, P., *Resistance to blood flow in microvessels in vivo*, Circ. Res. Vol.75, (1994), pp: 904-19.
- Pries, A., Secomb, T., *Rheology of the microcirculation*, Clinical Hemorheology and Microcirculation Vol. 29, (2003) pp: 143-148.
- Radmacher, M., *Studying the mechanics of cellular processes by atomic force microscopy*, Methods Cell Biol. Vol.83 (2007), pp: 347– 372.
- Ramsey, J.M., *The burgeoning power of the shrinking laboratory*, In: Nat. Biotechnol, Vol.17 (1999), pp: 1061-1062.
- Regnier, F., *Chromatographia*, Vol. 49, (1999), pp: 56.
- Reinhart, W., H., Singh, A., *Erythrocyte aggregation: the roles of cell deformability and geometry*. Eur J clin Invest. Vol. 20 (1990), pp: 458-62.
- Rezende, A., C., *Auto-organização de nanopartículas utilizando padrões formados por transição de molhabilidade*, (2007), pp: 35-95.
- Ribeiro, M., A., *Modificação superficial de dispersão aquosa de poliuretano por meio de polimerização por plasma*, (2008), pp:37.
- Rivera, G., E., L., *Fabricação e Caracterização de NanoPeneiras Poliméricas*, (2009).
- Saad, G., M., P., *Avaliação da deformabilidade eritrocitária através da ectacitometria na deficiência do ferro*, (2002), pp: 10-16.
- Sangho, Kim, Peng, Kai Ong, et al., *The cell-free layer in microvascular blood flow*, Vol.46 (2009), pp: 181-189.

- Schmid-Schonbein, H., Wells, R., *Fluid drop-like transition of erythrocytes under shear*. Science , Vol.165, (1969), pp: 288-291.
- Seeley, R.R., Stephens, T.D., Tate, F., *Anatonia & Fisiologia*, Lusodidacta, 3ª Edição, (1997).
- Shevkopylas, S.S., Yoshida, T., Munn, L.L., Bitensky, M.W., *Biomimetic autoseparation of leukocytes from whole blood in a microfluidic device*. Anal. Chem. Vol. 77, (2005), pp: 933-937.
- Shin, S., Ku, Y., Park, M., S., Jnag, J., H., Suth, J., S., *Rapid cell-deformability system based on slit-flow laser diffractory with decreasing preassure differential*. Biosens Bioelectron, (2005), pp: 291-7.
- Silva, J., M., Saldanha, C., *Principais métodos de quantificação em hemorreologia clínica*, Boletim da SPHM, Vol. 20, (2005), pp: 5-15.
- Silva., J., A., M., *Factores intervenientes no controlo da microcirculação e da oxigenação tecidual* In: O médico, Vol.82, (1997), pp: 397-408.
- Silveira, P., Cynober, T., Dhermy, D., Mohandas, N., Tchernia, G., *Red blood cell abnormalities in hereditary elliptocytosis and their relevance to variable clinical expression*. Am J Clin Pathol, Vol. 108, (1997), pp: 319-9.
- Sistema Circulatório. Acedido em Janeiro de 2012 em, <http://cardiovasculogando.blogspot.com>\
- Skinner, R. D., *Basic Integrated Circuit Technology Reference Manual*, Basic Integrated Circuit Manufacturing, Integrated Circuit Engineering Corporation (1993);
- Sollier, E., Rostaing, H., Pouteau, P., Fouillet, Y., Achard, J., *Chemical: Passive microfluidic devices plasma extraction from whole human blood*. Sens. Actuators B. Chem. Vol.141, (2009), pp: 617-624;
- Somasundaran, P., Mehta, S., Purohit, P., *Silicone emulsions*. In: Advances in colloid and interface science. [S.l: s.n.], (2006), pp. 103-109, 128-130.
- Sousa A. R., *Dissertação de mestrado em informática: Localização automática de objectos em sequências de imagens*, (2005).
- Stadnik, D., Chudy, M., Brzozka, Z., Dybko, A., *Spectrometric analysis using PDMS microfluidic detectors*. Bull Pol Acad Sci, Vol.53, (2005), pp: 163-5.
- Stanton, A., *Haemodynamics, wall mechanics and atheroma: a clinician`s perspective*. Proc. Inst. Mech. Engrs, H., Vol.213, (1999), pp: 385-390.

- Streekstra, G., J., Hoekstra, A., G., Heethaar, R., M., *Anomalous diffraction by arbitrarily oriented ellipsoids: applications in ektacytometry*. Applied Optics , (1994), pp: 288-96.
- Streekstra, G., J., Hoekstra, A.,G., Nijhof, E.,J., Heethaar, R., M., *Light scattering by red blood cells in e ktacytometry: Fraunhofer versus anomalous diffraction*. Applied Optics, Vol.2, (1993), pp: 266-72.
- Sung ,S. Lee, Yoonjal, Yim et al., *Extensional flow-based assessment of red blood cell deformability using hyperbolic converging microchannel*, (2009).
- Suzuki, Y., Tateishi, N., Soutani, M., Maeda, N., *Deformation of erythrocytes in microvessels and glass capillaries: effects of erythrocyte deformability*. Microcirculation, Vol.3, (1996), pp. 49-57.
- Takagi, J., Yamada, M., Yasuda, M., Seki, M., *Continuous particle separation in a microchannel having asymmetrically arranged multiple branches*. Lab Chip, Vol.5, (2005) pp: 778.
- Tamaiulo, G., *Blood-Mimicking fluid for biotechnological applications-fluidodynamic behavior of red blood cells and droplets under confined shear flow*, (2008), pp: 18-75.
- Tanaani, T., Otsuki, S., Tomosada, N., Kosugi, Y., Shimizu, M., Ishida, H., *High-speed 1-frame/ms scanning confocal microscope with a microlens and Nipkow disks*. Applied Optics Vol.44, (2002), pp: 4704-4708.
- Teixeira, M., Sebenta de Anatomio-Histo-Fisiologia, IPB, (2008).
- Tejal, A., *Micro and nanoscale structures for tissue engineering constructs*, Medical Engineering & Physics, Vol.22, (2000), pp: 595-606.
- Tom, McCreedy., *Fabrication techniques and materials commonly used for the production of microreactors and micro total analytical systems*, Vol.19, (2000), pp: 396-401.
- Toner, M., Irimia, D., *Blood-on-a chip*. Annu.Rev.Biomed. Eng, Vol.7, (2005), pp: 77-103;
- Tsubota, K., Wada, S., Yamaguchi, T., *Simulation study on effects of hematocrit on blood flow properties using particle method*. Journal of Biomechanical Science and Engineering Vol.1, (2006), pp: 159-170.
- Uijtewaal, W., Nijhof, E., Heethaar, R., *Lateral migration of blood cells and microspheres in twodimensional Poiseuille flow: a laser Doppler study*. Journal of Biomechanics, Vol.27, (1994), pp: 35-42.

- Verma, M.K.S., Mujumder, A., Ghatak, A., *Embedded template-assisted fabrication of complex microchannels in PDMS and design of a microfluidic adhesive*. Langmuir, Vol.22, (2006), pp: 10291-5.
- Vilkner, T., Janasek, D., Manz, A., *Micro total analysis systems: recent developments*, In: Anal.Chem, Vol.76, (2004), pp: 3373-3385.
- Villanueva, J., Shaffer, DR, Philip, J., Chaparro, CA., Erdjument, BH., Olshen, AB., Fleisher, M., Lilja, H., Brogi, E., Boyd, J., Sanched, M., Holland, EC., Cordon-Cardo, C., Scher HL, Tempst, P., *Differential exoprotease activities confer tumor specific serum peptidome patterns*. Vol.116, (2006) pp: 271-284;
- Wada, S., Kobayashi, R., *Simulation of the shape change of a red blood cell at the entrance of a capillary*. In: Proceedings of the 4th World Congress of Biomechanics, Calgary, Canada, (2002).
- Waite, L., Fine,J., *Applied Biofluid Mechanics*, McGraw-Hill, USA, (2007).
- Wang, D., Thomas, S., Wang, K., Xia, Y., Whitesides, G., *Nanometer scale patterning and pattern transfer on amorphous Si, crystalline Si, and SiO₂ surfaces using self-assembled monolayers*, Appl.Phys.Lett, Vol.70, (1997), pp: 1593-1595.
- Westerhof, N., Stergiopulos, N., *Snapshots of Hemodynamics*, An aid for Clinical Research and Graduate Education, Spinger, (2005).
- Xia,Y.,Whitesides,G., *Soft lithography*, Annu.Rev.Mater.Sci, Vol.28, (1998), pp: 153-184.
- Yamaguchi, T., Ishikawa, T., Tsubota, K., Imai, Y., Nakamura M., Fukui T., *Computational blood flow analysis – new trends and methods*. Journal of Biomechanical Science and Engineering 1 (2006), pp: 29-50.
- Yang, S., Undar, A., Zahn, JD., *A microfluidic device for continuous, real time blood plasma separation*. Lab.Chip, Vol.6, (2006), pp: 871.
- Yole Developpement , *Microfluidic Substrates* (2011).
- Yong, C., and Pepin, A., *Nanofabrication: Conventional and Nonconventional Methods*, Electrophoresis, Vol 22, (2001), pp: 187– 207.
- Yuan Wen, B., S., *Microfluidic and microscale cell cultures for high-throughput cell- based assays and bioprocess development*, (2009), pp:24-26.