



MICROFLUÍDICA DE GOTAS PARA O ENCAPSULAMENTO DE ESFEROIDES
DE CÉLULAS-TRONCO EM ALGINATO PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL

Cristiane Raquel Sousa Mesquita

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia da Nanotecnologia, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia da Nanotecnologia.

Orientador(es): Carolina Palma Naveira Cotta

Tiago Albertini Balbino

Rio De Janeiro

Junho de 2019

MICROFLUÍDICA DE GOTAS PARA O ENCAPSULAMENTO DE ESFEROIDES
DE CÉLULAS-TRONCO EM ALGINATO PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL

Cristiane Raquel Sousa Mesquita

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE)
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA DA NANOTECNOLOGIA.

Examinada por:

Prof. Carolina Palma Naveira Cotta, D.Sc.

Prof. Tiago Albertini Balbino, D.Sc.

Prof. Leandra Santos Baptista, D. Sc.

Prof. Gutemberg Gomes Alves, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

JUNHO DE 2019

Mesquita, Cristiane Raquel Sousa

Microfluídica De Gotas Para O Encapsulamento De Esferoides De Células-Tronco Em Alginato Para Regeneração Tecidual/Cristiane Raquel Sousa Mesquita – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2019.

XVIII, 84 p.: il.; 29,7 cm

Orientadores: Carolina Palma Naveira Cotta

Tiago Albertini Balbino

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia da Nanotecnologia, 2019.

Referências Bibliográficas: p. 69-84.

1. Encapsulamento de Esferoides. 2. Microfluídica. I. Naveira Cotta, Carolina *et. al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia da Nanotecnologia. III. Título.

*“É muito melhor lançar-se em busca
de conquistas grandiosas, mesmo
expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se
com os pobres de espírito, que nem
gozam muito nem sofrem muito, porque
vivem numa penumbra cinzenta,
onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”*

Theodore Roosevelt

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer e dedicar esta dissertação a todas as pessoas que me ajudaram a chegar até aqui, sem elas não teria sido possível.

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida e por estar sempre ao meu lado, iluminando meu caminho, me protegendo, secando minhas lágrimas e guiando meus passos e pensamentos.

Meus sinceros agradecimentos aos meus orientadores, Profa. Dra. Carolina Palma Naveira Cotta, primeiro, por me dar a oportunidade de fazer esta dissertação de mestrado em seu grupo e confiar em mim, e em segundo lugar por seu acompanhamento e orientação, dedicação e ajuda ao longo deste tempo e, especialmente, nesta última etapa. E ao Prof. Dr. Tiago Albertini Balbino pela amizade, por todo o conhecimento transmitido, seu apoio, dedicação durante todo esse processo de aprendizagem, por sua paciência comigo neste último trecho e pelo constante estímulo transmitido durante o trabalho. Sem você, esse trabalho não seria possível.

Agradeço as professoras: Profa. Dr. Leandra S. Baptista, à Profa. Dra. Ariane de Jesus Sousa Batista e ao Prof. Dr. Gutemberg Gomes Alves pela participação na banca e por suas inúmeras cooperações.

Agradeço ao Núcleo Multidisciplinar de Pesquisa Inmetro/Xerém (Numpex-Bio), o qual é associado Laboratório Bioengenharia Tecidual - DIMAV, pela colaboração, doação de amostras e também leitura dos resultados obtidos neste trabalho. Dentre as pessoas deste laboratório, agradeço especialmente a aluna Letícia Charelli pela colaboração, ajuda em experimentos.

Aos amigos de laboratório e amigos que passaram por lá, pelos diversos momentos de discussões teóricas durante este trabalho, pelos momentos de descontração, pelos momentos de cooperação e pelos momentos de dúvidas que sempre surgem: Douglas, Ingrid, Jordana, Júlia, Gustavo, José Roberto, Juliana, Gabriel, Mylena, Patrick e Adam.

Aos amigos do PENT que surgiram com o tempo e se tornaram únicos.

Às amigas e amigos, que por sua amizade, apoio, entendendo a minha ausência e estando ao meu lado sempre. A amizade é o amor que nunca morre.

E, em geral, a todas as pessoas que me atravessaram durante todo esse tempo e que, de uma forma ou de outra, colocaram suas dunas de areia.

A todos os familiares, em especial à minha mãe, Karla, ao meu pai Francisco, todos os meus tios, tias e primos que sempre demonstraram preocupação e zelo, além de toda

paciência e apoio.

Ao meu marido Mauricio que sempre esteve ao meu lado, com carinho, admiração, apoio e principalmente paciência, entendendo e auxiliando nessa caminhada, especialmente durante os meus solavancos de mau humor (que não foram poucos).

Palavras nunca serão o suficiente para expressar todos os meus sentimentos, levo em mim um grande crescimento profissional e mais importante, pessoal.

À FAPERJ pelo auxílio financeiro.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

MICROFLUÍDICA DE GOTAS PARA O ENCAPSULAMENTO DE ESFEROIDES DE CÉLULAS-TRONCO EM ALGINATO PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL

Cristiane Raquel Sousa Mesquita

Junho/2019

Orientadores: Carolina Palma Naveira Cotta

Tiago Albertini Balbino

Programa: Engenharia da Nanotecnologia

A análise química, bioquímica e de transferência de massa/calor em escoamento segmentados, do tipo gotas, em dispositivos microfluídicos apresenta mais eficiência devido algumas de suas características como, grande área superficial e tamanhos monodispersos. Deste modo, a utilização de sistemas microfluídicos para encapsulamento de esferoides apresenta-se como um campo promissor por exibir propriedades importantes como distribuição do tamanhos de gotas controlados e uniformes, além de sua relativa simplicidade e reprodutibilidade, o que não é apresentado nos processos tradicionais. O uso desses esferoides encapsulados por matrizes compostas de hidrogéis são amplamente empregados no âmbito da medicina regenerativa, principalmente devido ao aumento da área de superfície. Portanto, o presente estudo apresenta a fabricação e teste de dispositivos microfluídicos, da formação de gotas de emulsão simples e por consequência, o encapsulamento de esferoides em microgotas aquosas independentes dispersas em um óleo transportador imiscível. Variações na vazão das fases dispersa e continua são observadas gerando gotas com diâmetros variando de $335 \pm 1 \mu\text{m}$ a $733 \pm 15 \mu\text{m}$, mostrando que o tamanho médio e a morfologia das gotas variam com a viscosidade e configuração dos capilares. O encapsulamento de esferoides em hidrogéis de alginato fornece uma ferramenta simples e rápida para preparar microgotas para sistemas relacionados a medicina regenerativa.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

DROPLET MICROFLUIDIC FOR ENCAPSULATION OF STEM CELLS
SPHEROIDS IN ALGINATE FOR TISSUE ENGINEERING

Cristiane Raquel Sousa Mesquita

June/2019

Advisors: Carolina Palma Naveira Cotta

Tiago Albertini Balbino

Department: Nanotechnology Engineering

The chemical, biochemical and mass transfer / heat transfer analysis in segmented droplets, of the droplets type, in microfluidic devices presents more efficiency due to some of its characteristics such as large surface area and monodisperse sizes. Thus, the use of microfluidic systems for encapsulation of spheroids is a promising field because it exhibits important properties such as distribution of controlled and uniform droplet sizes, as well as their relative simplicity and reproducibility, which is not presented in traditional processes. The use of these spheroids encapsulated by hydrogel composite matrices are widely used in regenerative medicine, mainly due to the increase in surface area. Therefore, the present study presents the fabrication and testing of microfluidic devices, the formation of single emulsion droplets and, consequently, the encapsulation of spheroids in separate aqueous microdroplets dispersed in an immiscible carrier oil. Variations in the flow of dispersed and continuous phases are observed generating droplets with diameters varying from $335 \pm 1 \mu\text{m}$ to $733 \pm 15 \mu\text{m}$, showing that the average size and morphology of the droplets vary with the viscosity and configuration of the capillaries. The encapsulation of spheroids in alginate hydrogels provides a simple and rapid tool for preparing microdroplets for systems related to regenerative medicine.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS	XVII
LETRAS GREGAS	XVIII
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 MOTIVAÇÃO	1
1.2 OBJETIVOS	2
1.3 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO EM CAPÍTULOS	3
CAPÍTULO 2 - ENGENHARIA DE TECIDOS	4
2.1 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (MSCS) PARA A ENGENHARIA DE TECIDOS....	4
2.1.1 CÉLULAS-TRONCO ORIUNDAS DO TECIDO ADIPOSEO	7
2.2 BIOIMPRESSÃO	9
2.3 ENCAPSULAMENTO DE ESFEROIDES VIA MICROFLUÍDICA.....	11
CAPÍTULO 3 - MICROFLUÍDICA DE GOTAS	15
3.1 CONCEITOS GERAIS	15
3.2 FORMAÇÃO DA GOTA E GEOMETRIAS DE FLUXO	16
3.2.1 <i>Junção T</i>	19
3.2.2 <i>Co-fluxo</i>	20
3.2.3 <i>Focalização Hidrodinâmica</i>	20
3.3 BIOIMPRESSÃO BASEADA NA MICROFLUÍDICA DE GOTAS	22
CAPÍTULO 4 - EMULSÕES E SURFACTANTES	24
4.1 HIDROGEL PARA BIOIMPRESSÃO	25
4.2 GELIFICAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO EM MICROCANAIS	26
4.3 SURFACTANTE.....	29

CAPÍTULO 5 - MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 MATERIAIS	32
5.1.1 <i>Produção dos esferoides</i>	32
5.1.2 <i>Produção das gotas</i>	32
5.2 MICROFABRICAÇÃO DE DISPOSITIVOS CAPILARES	33
5.3 FORMAÇÃO DE GOTAS EM MICROFLUÍDICA.....	38
5.4 BIOENCAPSULAÇÃO EM DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS	39
CAPÍTULO 6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6.1 CONFIGURAÇÃO DOS MICROCANAIS PARA PRODUÇÃO DE MICROGOTAS	44
6.2 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE GOTAS EM MICROCANAIS MICROFLUÍDICOS	46
6.2.1 <i>Efeito da fase contínua</i>	46
6.2.2 <i>Regime de formação de gotas e condições de escoamento</i>	47
6.3 PROCESSO DE GELIFICAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO.....	54
6.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO SURFACTANTES	57
6.5 EFEITO DA VISCOSIDADE NA FASE AQUOSA	59
6.6 ESTABILIDADE DAS GOTAS PRODUZIDAS POR MICROFLUÍDICA	61
6.7 ENCAPSULAMENTO DE ESFEROIDES DE CÉLULAS-TRONCO	62
CONCLUSÕES	66
PROPOSTAS FUTURAS	68
REFERÊNCIAS	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2. 1– (A) Organização concêntrica de células proliferadoras e necróticas em esferoides (B) há duas principais categorias de biofabricação esferoide, baseada em conjunto e automontagem baseada em colisão. (C) quando certas populações de células mistas são auto ajustáveis, o padrão específico de segregação que ocorre é considerado autocompensante. [26] 5
- Figura 2. 2 – Metodologia para fabricação dos esferoides. (A) Produção da agarose micromoldada. (B) Processo de automontagem do esferoide. (C) Desenho esquemático da produção dos esferoides. 6
- Figura 2. 3 – Formação dos esferoides pelo processo de automontagem. (A) monocamada; (B) início da compactação; (C) Esferoide compactado produzido no laboratório Numpex-Bio..... 7
- Figura 2. 4 – Publicações nos últimos anos sobre estudos com “Microfluídico*” como um termo de pesquisa junto com “Cell encapsulation*” 10
- Figura 2. 5 – Materiais utilizados em chips microfluídicos. Adaptada de [46]..... 11
- Figura 2. 6 – Técnicas baseadas em emulsão para formação de esferoides. (A) (a) Ilustração esquemática de um gerador de gotas de emulsão única para a formação de gotas de água uniformes contendo diferentes concentrações de alginato e células dispersas em óleo mineral em um dispositivo microfluídico com focalização hidrodinâmica; (b e c) uma visão geral e composição do dispositivo microfluídico real. [58]. (B) (a) Visão geral esquemática de um dispositivo microfluídico para produção de esferoides multicelulares; (b) Imagem confocal de gotas de alginato; (c) Gráfico do raio da gota em função da vazão; e (d) imagens de contraste de fase de gotas individuais encapsulando células[61]. (C) (a) Vista geral esquemática de um sistema microfluídico para geração de microgotas para a formação eficiente de esferoides de células; (b) Micrografias de contraste de fase representativas de gotas individuais encapsulando células [57]. 12
- Figura 3. 1 – Esquema de dispositivos microfluídicos para fabricar emulsões utilizando (A) Junção em T. A fase dispersa encontra a fase contínua na região transversal da junção em forma de T, e é pressionada, formando então as microgotas na jusante; (B) Co-fluxo. O fluxo interno (fase dispersa) do capilar centrado no

microcanal, é espremido na saída do capilar pela força da fase contínua, e formando as microgotas a jusante; (C) Focalização hidrodinâmica. A fase dispersa é comprimida por dois fluxos de contracorrente da fase da contínua, forçando as gotas a se soltarem. Adaptado de [103].....	21
Figura 3. 2 – Classificação das Técnicas de Bioimpressão Baseada em Gotas em modalidades de bioimpressão a jato de tinta, acústica e micro-válvula. Adaptada de [108].....	23
Figura 4. 1 – Esquemas de emulsões óleo-em-água (O / W) e água-em-óleo (W / O). .	24
Figura 4. 2 – Estratégias por gelificação externa: A) gelificação externa misturando as soluções de alginato e CaCl ₂ diretamente numa mesma gota; B) adição de uma segunda corrente contínua contendo solução de CaCl ₂ para gelificação após a formação das gotas de alginato; C) formação de gotas de alginato em microcanais e posterior gotejamento em solução contendo CaCl ₂ . Estratégias por gelificação interna: D) liberação de íons de cálcio por redução de pH para reticulação do alginato; E) gelificação lenta por troca iônica de cátions quelados com EDTA e EDDA. Imagens adaptadas dos respectivos autores destes trabalhos.....	28
Figura 4. 3 – Representação gráfica da dependência da tensão superficial com a concentração de surfactante, Esquema do comportamento do surfactante em uma interface líquido-gás: moléculas de surfactante adsorvem na superfície (<CMC) e começam a formar micelas no volume quando a superfície é saturada de moléculas (≥CMC). Adaptada de [87]	30
Figura 5. 1 – Dispositivo para obtenção de emulsões simples.	33
Figura 5. 2 – Ilustração esquemática do dispositivo microfluídico capilar de vidro alinhado para gerar emulsões simples a partir de correntes coaxiais. Dois capilares de vidro cilíndricos cônicos são inseridos em um capilar quadrado, o comprimento do lado interno é aproxima-se do diâmetro externo dos capilares cilíndricos. Tubos de injeção e de coleta são afilados, a fim de garantir o tamanho desejado. A corrente intermediária deve ser imiscível com a corrente interno. (b) Ampliação do setor circulado em (a).....	34
Figura 5. 3 – Extrator de micropipeta utilizado para afilar o diâmetro dos capilares cilíndrico. Este processo é realizado através do aquecimento do filamento metálico e em paralelo suas hastes distendem o capilar com forças controladas [1].	35

Figura 5. 4 – (a) Capilar cilíndrico após a utilização de um Extrator de Micropipeta, obtendo-se pontas menores do que o diâmetro necessário, normalmente em torno de 10 μm . (b) Ponta modificadas com o diâmetro desejado através de lixa de papel.	36
Figura 5. 5 – Montagem final do dispositivo capilar de vidro utilizado para encapsulamento de esferoides, fabricado com diâmetro do capilar de injeção em torno de 330 μm	36
Figura 5. 6 – Aparência da montagem experimental. O dispositivo microfluídicos é colocado sobre a platina do microscópio. As agulhas são conectadas às seringas, colocadas nas bombas, através de mangueiras de borracha. Os registros são realizados através da câmera acoplada no microscópio.	37
Figura 5. 7 – O processo de encapsulamento segue a distribuição de Poisson e resulta em aproximadamente 8% de gotas contendo um esferoide encapsulado.	41
Figura 6. 1 – (A) Capilar Cilíndrico reto em sua configuração original. (B) Capilar cilíndrico após a redução do seu diâmetro para aperfeiçoamento do tamanho da Gota.	44
Figura 6. 2 – Comparação entre o tamanho médio da gota produzida para os casos apresentados.	45
Figura 6. 3 – Ilustração esquemática das correntes internas (Q_{in}) e intermediarias (Q_{mid}) que compõem a fase dispersa e a corrente externa (Q_{out}) que compõe a fase contínua.	47
Figura 6. 4 – Forma de quebra das gotas usando microfluídica em capilares de vidro: formato de gotas geradas com óleo de milho como fase contínua. Nas correntes das fases dispersas foram utilizadas correntes aquosas de alginato a 1% (m /v) e de cloreto de cálcio 15 mM, caracterizando uma gelificação externa do alginato. ...	47
Figura 6. 5 – Desenho esquemático do regime de geração de gotas: (A) gotejamento; (B) Jateamento. Adaptado de [105]. Imagens do regime de geração de gotas obtidas através do experimento: (C) gotejamento; (D) Jateamento.	48
Figura 6. 6– Design dos sistemas microfluídicos para formação de gotas, sistema por focalização hidrodinâmica e co-fluxo.	49
Figura 6. 7 – Formação de gotas em função da razão de taxas de fluxo ($R = Q_C/Q_D$) e da vazão da fase contínua (Q_{OUT}). Na fase contínua foi usado óleo de milho e na	

dispersa, soluções aquosa de alginato e cloreto de cálcio originando um hidrogel.	50
Figura 6. 8 - Gotas de tamanhos maiores e instáveis (squeezing).....	51
Figura 6. 9 – Raio da Gota pelo raio do capilar de injeção versus a razão das fases de fluxo. Os losangos azuis representam o diâmetro da gota no regime de gotejamento. Círculos laranjas representam o diâmetro da gota no regime de jateamento. A linha tracejada azul representa a linha de tendência do tamanho da gota no regime de gotejamento, e a linha tracejada laranja o tamanho da gota no regime de jateamento.	51
Figura 6. 10 – Distribuição de tamanho das microgotas para cada um dos casos apresentados na Tabela 6.1.	53
Figura 6. 11 – (A) distribuição de tamanhos e visualização das gotas produzidas nestas condições de vazões com geração de gotas que variam o tamanho e (B) distribuição de tamanhos e visualização das gotas produzidas nestas condições de vazões sem geração de gotas que variam o tamanho.	54
Figura 6. 12 – Gelificação ocorre dentro da própria gota, as correntes aquosas de Alginato (cor verde) e Cloreto de Cálcio (cor vermelha) podem ser misturadas numa mesma gota através da gelificação externa.	55
Figura 6. 13 - Formação de micropartículas uniformes devido a gelificação das corrente aquosas de alginato e cloreto de cálcio dentro da gota.	56
Figura 6. 14 – Obstrução do Canal devido altas concentrações das correntes aquosas de alginato 2% (m/v) e cloreto de cálcio (30mM).	56
Figura 6. 15 – Dependência do tamanho das microgotas produzidas no dispositivo microfluídico na taxa da fase contínua (Q_C) – $6.0 \mu Lh^{-1}$ com a adição de diferentes concentrações de surfactante (Span 80)..	57
Figura 6. 16 - Formação de gotas em função da razão de taxas de fluxo ($R = Q_C/Q_D$) e da vazão da fase contínua (Q_{OUT}). Na fase contínua foi usado óleo de milho com adição de 10% de Span 80.	58
Figura 6. 17 – Tamanho das Microgotas em função da variação da vazão da fase contínua para duas soluções aquosas com diferentes viscosidades.	59
Figura 6. 18 – Esferoides utilizados nos experimentos.	60
Figura 6. 19 – Estabilidade física das microgotas de alginato em diferentes condições	61

Figura 6. 20 – Momento no qual o esferoide será encapsulado, indicado pela seta vermelha. A corrente em que o esferoide está (Q_{in}) é composta da solução aquosa de alginato e os proprios esferoides.	63
Figura 6. 21 – (A) Encapsulamento de esferoide individual. (B) Esferoides encapsulados acomodados no micromolde indicado por setas.....	64
Figura 6. 22 – Esferoides encapsulados após a período de estabilidade causado pela adição de surfactante.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 3. 1 – Comparação de algumas características entre os métodos de emulsificação em massa (‘batelada’) e microfluídica. Adaptado de [87].	17
Tabela 5. 1 – Lista de materiais utilizados na construção do dispositivo.....	37
Tabela 5. 2 – Propriedades físico-químicas dos óleos de milho e de soja [154].	38
Tabela 6. 1 – Valores encontrados dos diâmetros dos capilares cilíndricos nas configurações inicial e após modificação.	45
Tabela 6. 2 – Casos estudados para avaliação do tamanho médio da gota gerada em função das configurações do capilar cilíndrico.	45
Tabela 6. 3 – Casos estudados para avaliação entre as fases dispersa (Q_{out}) e contínuas (Q_{in} e Q_{mid}) correlacionando com o tamanho médio da gota gerada.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ASCs – Células-tronco derivadas do tecido adiposo
CIJ - Bioimpressão de Jato Contínuo
CM - Suspensão celular em óleo em meio de cultura
CS - Suspensão celular
CS / O - Suspensão celular em emulsão de óleo
DBB – Bioimpressão baseada em gotas
DEP – Dieletroforese
DOD - Bioimpressão de Gotas por demanda
ECM – Matriz extracelular
EHD - Bioimpressão de jateamento eletro-hidrodinâmico
EWOD – Eletrovoltáica no dielétrico
Gel - Hidrogel
Gel / O - Geração de gotas em hidrogel com células em óleo
HD - Gotas suspensas
HES - Hidrogéis com uma superfície em relevo
HTSF - Esferoides de alto rendimento
HUVEC - Célula endotelial da veia umbilical humana
iPSCs - Células estaminais pluripotentes induzidas
MSCs - Células-tronco mesenquimais
NFC – Compostos de celulose nanofabricada
NFC/A – Compostos de celulose nanofabricada com alginato
NFC/AH – Compostos de celulose nanofabricada com ácido hialurônico
O - Emulsão de óleo
O/W – Óleo-em-água
PDMS - Polidimetilsiloxano
PEG - Poli (etileno glicol)
W/O – Água-em-óleo
 μ SFCs - Chips microfluídicos para cultura de esferoides

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca – Número de capilaridade
d – Diâmetro
D – Difusão ou dispersão
L – Comprimento característico
Pe – Número de Péclet
Q_C – Fase Continua
Q_D – Fase Dispersa
Q_{in} – Fase interna
Q_{mid} – Fase intermediária
Q_{out} – Fase externa
Re – Número de Reynolds
U – Velocidade do fluido
We – Número de Weber

Letras gregas

ρ – Massa específica
 γ – Tensão superficial
 ν – Viscosidade cinemática
 η – Viscosidade dinâmica

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O presente capítulo avalia a importância deste estudo, apresentando primeiramente as motivações que levaram a pesquisa a ser produzida e os objetivos central e específicos do mesmo. Na seção seguinte, é explicitado a organização da dissertação em capítulos.

1.1 MOTIVAÇÃO

Com o desenvolvimento da microfluídica de gotas, o encapsulamento de células tornou-se um método promissor para garantir avanços na engenharia de tecidos[2]–[4]. Dispositivos microfluídicos *in vivo* têm sido usados para recriar o microambiente celular e permitem análises em tempo real do comportamento celular e respostas a estímulos externos[5]. Dispositivos microfluídicos foram implementados para induzir a diferenciação de células-tronco [5], o desenvolvimento e função de órgãos de estudo [6], manipular grandes números de células, além da possibilidade de fácil integração de todos os tipos de operações padrão analíticas no sistema microfluídico [7].

O estudo da função tecidual *in vitro* foi auxiliado pelo desenvolvimento de sistemas de cultura tridimensionais que replicam com mais acurácia os complexos componentes celulares de tecidos e órgãos. No entanto, as abordagens tradicionais para o encapsulamento celular levam muitas vezes a microgotas com alta polidispersibilidade de tamanhos e baixa reprodutibilidade [8].

Utilizando polímeros sintéticos ou de extratos naturais e empregando métodos gelificantes adequados, as gotas que encapsulam as células podem ser convertidas em hidrogéis carregados de células. Esses podem fornecer microambiente 3D fisiológico para o metabolismo celular, proteger as células contra forças externas de cisalhamento e reduzir a resposta imune potencial para aplicações *in vivo*. Além disso, os hidrogéis são permeáveis ao fluxo de nutrientes e oxigênio, bem como ao fluxo de moléculas terapêuticas. Assim, esses hidrogéis têm sido amplamente utilizados em aplicações para mimetizar a montagem de tecidos e liberação de células para terapias.

Dispositivos microfluídicos oferecem características promissoras para a geração de hidrogéis carregados de células que manipulam pequenas quantidades de fluidos em plataformas com tamanhos reduzidos, cujas características particulares de escoamento

são capazes de produzir emulsões múltiplas com propriedades físico-químicas altamente ajustáveis. Nesse sentido, esse trabalho pretende investigar o desenvolvimento e a fabricação de esferoides celulares encapsulados por meio de dispositivos microfluídicos baseados em gotas.

O encapsulamento celular em matrizes de hidrogéis biodegradáveis tem grande interesse para aplicações de engenharia de tecidos, especialmente se desenvolvido em plataformas microfluídicas, pois pode oferecer inúmeras características atraentes, incluindo manuseio direto, com relativa simplicidade e reprodutibilidade. Alguns requisitos são necessários para que a matriz extracelular seja desenhada, como por exemplo, o material ser biocompatível e funcionar sem a interrupção de outros processos fisiológicos[9].

1.2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral projetar, fabricar e experimentar um sistema microfluídico de capilar de vidro para encapsulamento de esferoides de células-tronco em matrizes baseadas em hidrogéis levando em conta parâmetros de fabricação, características de escoamento nos capilares, o estudo e caracterização da formação da gota como propósito de otimizá-lo e ter a melhor conjuntura para a produção do encapsulamento. Os dispositivos serão baseados em capilares de vidro e os esferoides serão encapsulados em gotas de água-em-óleo (w/o).

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Fabricação de um microdispositivo de baixo custo que seja capaz de promover o encapsulamento de esferoides, utilizando a focalização hidrodinâmica e co-fluxo (método para geração de gotas duplas).
- Produção de gotas de alginato em óleo em dispositivos de capilares de vidro com focalização hidrodinâmica e co-fluxo;
- Estudo do regime de escoamento no processo de formação de gotas e das proporções entre as vazões de cada corrente;
- Encapsulamento em fluxo contínuo de esferoides de células-tronco de tecido adiposo humano;
- Estudo da variação da concentração de surfactante no processo de formação de gotas e das proporções entre as vazões de cada corrente.

1.3 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO EM CAPÍTULOS

Para apresentar didaticamente a constituição deste trabalho, ele está separado em capítulos. No capítulo 2 será apresentado a revisão da literatura no contexto das linhas base para esta pesquisa, tais como: a importância das células-tronco na engenharia de tecido, encapsulação de células-tronco em dispositivos microfluídicos como um modo alternativo para aumento de produtividade na bioimpressão e as consequências que a microfluídica traz a bioimpressão, a influência do hidrogel para o encapsulamento de esferoides.

O capítulo 3 apresentará os fundamentos teóricos que embasam a microfluídica de gotas empregada na criação do dispositivo utilizado na pesquisa. Além de apresentar sumariamente a bioimpressão baseada em gotas, na qual foi a motivação central para este trabalho.

O capítulo 4 apresentará os fundamentos teóricos que embasam emulsões e surfactantes. A fim de explorar esse campo e definir quais são as razões para nortear a criação de hidrogéis.

O capítulo 5 mostrará os processos de produção de micropartículas de alginato usando capilares de vidro e focalização hidrodinâmica, bem como o uso de diferentes vazoes das soluções para fases contínuas e dispersas na gelificação de alginato em microcanais.

O capítulo 6 apresentará a aplicabilidade de micropartículas de alginato para cultivo em função da sua estabilidade e eficiência de encapsulação usando microfluídica de gotas. Onde será exposto as ferramentas desenvolvidas ao longo do trabalho que foram empregadas na análise experimental da formação de gotas através do dispositivo microfluídico de capilares de vidro e a encapsulação de esferoides feitas por migrogotas de alginato.

Por fim, serão relatadas as conclusões gerais desta pesquisa bem como as sugestões para trabalhos futuros.

ENGENHARIA DE TECIDOS

A seguir é apresentada um breve detalhamento sobre engenharia de tecidos, onde esse tema influencia diretamente neste trabalho, compreendendo os diferentes aspectos do problema aqui tratado: Células-tronco mesenquimais para a engenharia de tecidos, bioimpressão e encapsulamento de células-tronco via microfluídica.

2.1 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (MSCs) PARA A ENGENHARIA DE TECIDOS

As células-tronco são genericamente definidas como células indiferenciadas capazes de auto renovação através de replicação, bem como diferenciação em linhagens celulares específicas. Essa característica das células-tronco, as torna extremamente interessantes, pois são capazes de se multiplicar, mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos; além disso, uma outra característica mais interessante ainda, é sua capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares [10].

Desta forma, acredita-se que células-tronco presentes nos diferentes tecidos tenham papel regenerativo quando estes sofrem uma lesão [11], agindo como imunocondutores do reparo e da regeneração tecidual, estimulam as células vizinhas a iniciar a reparação dos tecidos danificados. Ademais, elas possuem propriedades imunomoduladoras, baixa imunogenicidade e características não tumorigênicas que podem diminuir a rejeição imunológica de células transplantadas [10].

As células-tronco mesenquimais (MSCs) foram primeiramente isoladas e caracterizadas por Friedenstein et al. [12] em 1974. Agora, elas podem ser isolados de diferentes espécies e tecidos [12] e podem ser usadas em estudos clínicos e pré-clínicos [13], [14]. Elas podem ser colhidos de tecidos conjuntivos, como medula óssea, tecido adiposo, fígado fetal e outros, e podem ser expandidas com sucesso in vitro [15].

Os pesquisadores estão continuamente tentando identificar a fonte ótima de células-tronco e desenvolver protocolos apropriados e eficientes para o seu isolamento por meio de métodos acessíveis e rápidos. Várias fontes de células, incluindo MSCs isoladas frequentemente da medula óssea e tecido adiposo já foram exploradas para bioimpressão

[16]–[19]. Algumas podem facilmente ser colhidas por lipoaspiração e, na maioria dos pacientes, uma grande quantidade delas podem ser obtida sem causar danos ao doador [20].

As características das células cultivadas em ambiente tridimensional (3D) diferem das células cultivadas em ambiente bidimensional (2D) em vários aspectos, como heterogeneidade celular, morfologia e transporte de massa [21], melhoraram a viabilidade, a capacidade de autorrenovação e o diferenciação, [22]–[25].

Em técnicas 2D, as interações célula-plástico prevalecem em vez das interações cruciais célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC) que formam a base para a função celular normal [26]. Além disso, a placa de Petri de plástico é um substrato não natural em comparação com o ambiente mecânico mais macio que as células experimentam *in vivo*, que é bem conhecido por alterar a função celular.

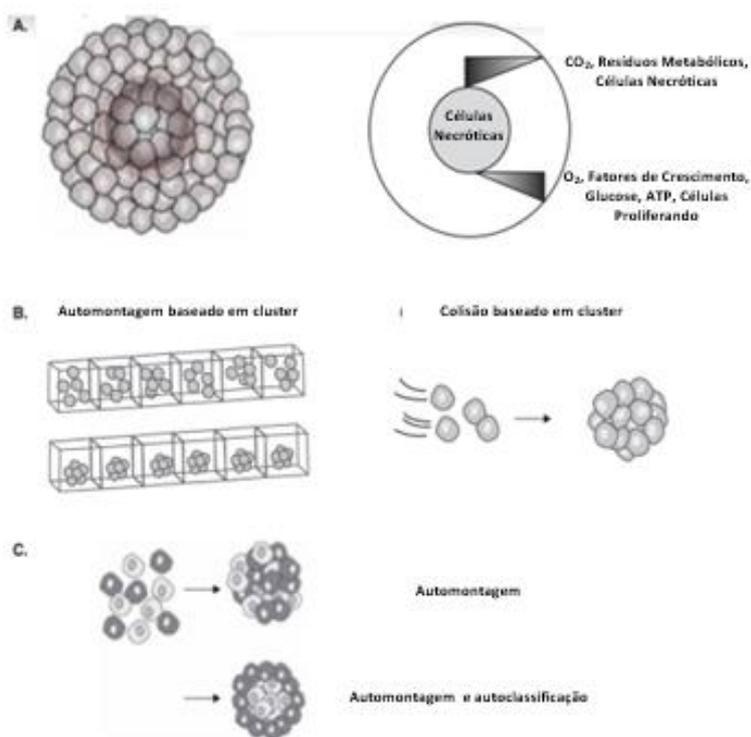


Figura 2. 1– (A) Organização concêntrica de células proliferativas e necróticas em esferoides (B) há duas principais categorias de biofabricação esferoide, baseada em cluster e automontagem baseada em colisão. (C) quando certas populações de células mistas são auto ajustáveis, o padrão específico de segregação que ocorre é considerado autocompensante. [27] .

Esferoides celulares são agregados esféricos formados pela auto-organização de células *in vitro*, cuja estrutura tridimensional pode se adaptar a vários tecidos *in vivo*, bem como sua relativa simplicidade e reprodutibilidade. Na Figura 2. 1, é possível visualizar

a automontagem dos esferoides simulando processos naturais. Os esferoides imitam as características arquitetônicas e funcionais do tecido nativo, tais como esferoides de cardiomiócitos que batem com ritmo semelhante ao coração. A adesão célula a célula é uma das principais forças motrizes de sua formação. Na maioria dos casos, essas estruturas são denominadas esferoides devido à sua forma próxima a de uma esfera.

As MSCs têm sido amplamente utilizadas para cultura 3D devido seu alto rendimento de isolamento através de um processo relativamente não invasivo, rápida proliferação e capacidade de se diferenciar em várias linhagens [28]. Logo, o desenvolvimento de plataformas de cultura 3D podem fornecer um ambiente fisiologicamente mais próximo ao encontrado *in vivo*. A Figura 2. 2 mostra que as MSCs são levadas a se automontar em esferoides quando mantidas em suspensão. Após a expansão como culturas em monocamada, as MSCs são suspensas em uma placa de cultura em alta concentração de células para ativar / preparar as células – Figura 2. 2B. Já na Figura 2. 2C, é apresentada a representação esquemática da plataforma desenvolvida. Os esferoides compactos que se formam podem ser facilmente transferidos usando uma pipeta.

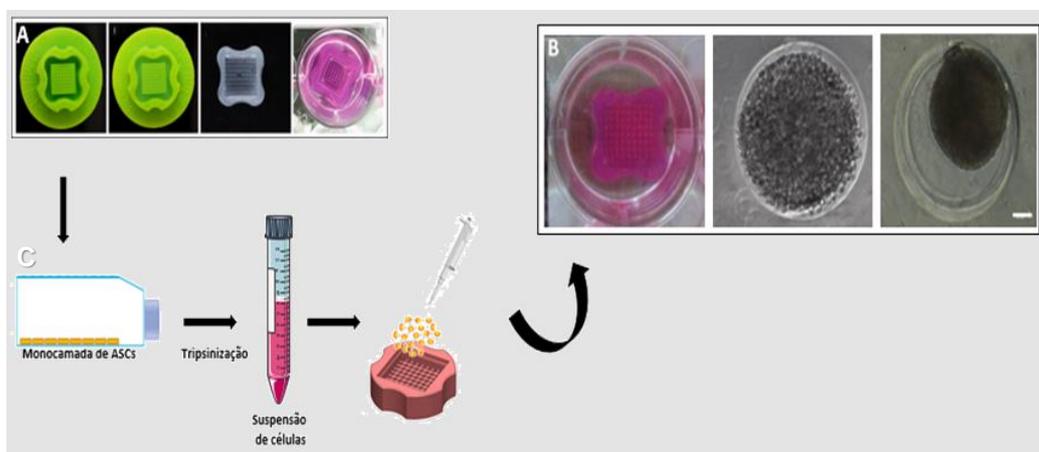


Figura 2. 2 – Metodologia para fabricação dos esferoides. (A) Produção da agarose micromoldada. (B) Processo de automontagem do esferoide. (C) Desenho esquemático da produção dos esferoides.[29]

Certas construções na engenharia de tecidos podem ser difíceis sem o uso de matrizes poliméricas que fornecem estabilidade e moldabilidade aos esferoides. Nestes casos, uma estratégia recorrente é o encapsulamento dos esferoides em diferentes matrizes microparticulares formadas por hidrogéis [30]. As microcápsulas esféricas são amplamente utilizadas para cultura de células porque fornecem grandes áreas de

superfície para o crescimento celular. Vários materiais com diferentes composições têm sido utilizados para este fim, como polissacarídeos, gelatina e colágeno. Entre essas matrizes, o alginato e suas diferentes composições têm sido amplamente utilizados para o encapsulamento de células [31], na qual será o tipo de hidrogel utilizado nesta pesquisa.

Lee et al., trabalharam no desenvolvimento de estruturas tridimensionais com propriedades mecânicas melhoradas para a regeneração do tecido hepático [32]. Um sistema de impressão de tecido de cabeça múltipla foi empregado para imprimir alginato irradiado com fibras de poli (ϵ -caprolactona) - PCL como um material de estrutura para fornecer propriedades mecânicas adequadas. Além disso, três tipos de células foram impressas em PCL para estudar a proliferação das células do fígado. Os resultados deste trabalho sugerem que o microambiente co-cultivado promoveu interação celular heterotípica dentro de uma construção 3D.

2.1.1 CÉLULAS-TRONCO ORIUNDAS DO TECIDO ADIPOSEO

Para este estudo, as células-tronco serão oriundas do tecido adiposo (ASCs) – Figura 2. 3. Na Figura 2.3A, é visto a formação e crescimento do esferoide em cultura de monocamadas. Elas vêm ganhando reconhecimento como uma fonte celular extremamente versátil para a engenharia de tecidos. As ASC sintetizam a sua própria matriz extracelular, que serve para aumentar a robustez das células às tensões mecânicas. A composição da matriz extracelular pode ser alterada com base no ambiente externo dos esferoides e estas construções podem ser cultivadas de uma maneira reprodutível e a um tamanho consistente. A formulação esferoide ajuda a preservar a viabilidade e a plasticidade do desenvolvimento de ASCs, mesmo sob condições definidas, sendo assim um excelente material celular para o uso na bioimpressão [33].

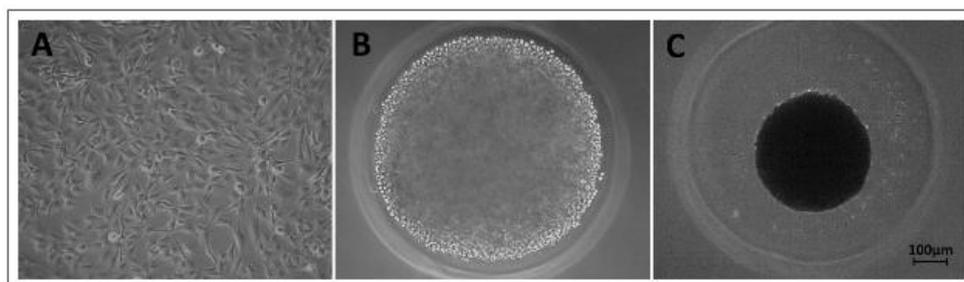


Figura 2. 3 – Formação dos esferoides pelo processo de automontagem. (A) monocamada; (B) início da compactação; (C) Esferoide compactado produzidos no laboratório Numpex-Bio.[29]

As ASC têm sido tradicionalmente cultivadas em condições 2D convencionais, que são inapropriadas para imitar as interações célula-célula e do meio ambiente *in vivo* [34], [35]. Cultivos em 3D tem uma alta capacidade de mimetizar os ambientes celulares *in vivo* [36], [37]. Os arcabouços tridimensionais são gerados usando métodos de biofabricação, combinando biomateriais, fatores de crescimento molecular e matrizes extracelulares para fornecer um microambiente 3D para proliferação e diferenciação celular, que regula ainda mais o crescimento de tecidos ou órgãos [38]. Em andaimes 3D, a linhagem de diferenciação de ASCs pode ser controlada pelas características mecânicas, químicas e outras do microambiente [39]. Além de controlar a diferenciação, os arcabouços 3D também podem aumentar a viabilidade celular durante a proliferação [40]. Considerando os benefícios acima, mais e mais atenção tem sido dada ao estudo de ASCs dentro de arcabouços 3D *in vitro*.

Os componentes mais essenciais para preparar e regular os andaimes tridimensionais são os biomateriais e os métodos de fabricação. Até agora, muitos biomateriais foram utilizados para desenvolver ASCs em andaimes 3D [41]. As ASCs localizam, anexam e proliferam durante o encapsulamento 3D *in vitro*. Os andaimes biofabricados ideais oferecem ambientes adequados aos ASCs para facilitar sua proliferação e manter seus potenciais de diferenciação. Muitos atributos-chave dos biomateriais devem ser considerados, uma vez que imitam de perto os ambientes 3D *in vivo*: primeiro, os biomateriais devem ser biocompatíveis e não causar uma reação imunológica a longo prazo [42]; segundo, os biomateriais são desejados para ter estruturas altamente porosas com arquitetura interconectada para imitar o nicho de tecido nativo [43]; terceiro, os biomateriais devem ter propriedades mecânicas ajustáveis para regular o microambiente celular. A manutenção de propriedades bioquímicas, biomecânicas e biológicas durante a proliferação também é importante para suportar o impacto do ambiente externo [42]. Com o desenvolvimento de biomateriais e biofabricação, muitas metodologias têm sido empregadas para fabricar suportes tridimensionais para cultura de células, incluindo bioimpressão [44], padronização [45], automontagem [44] e órgão em bordo [46].

Estudos atuais e registros clínicos indicam que ASCs em arcabouços 3D podem ser uma alternativa potencial para cicatrização de feridas [47], enxertos cardiovasculares [48], reparo de tecidos ortopédicos [49] e reconstrução de tecidos plásticos após cirurgia [50]. O sucesso das aplicações acima mencionadas prova que o grande potencial dos

ASCs deve ser utilizado como uma terapia baseada em células para a medicina regenerativa. Embora ASCs de engenharia de tecidos sejam reconhecidas como um substituto atraente para a medicina regenerativa, ainda há problemas a serem resolvidos, incluindo os mecanismos das interações entre ASCs, a metodologia de cultura livre de soro e a segurança a longo prazo.

2.2 BIOIMPRESSÃO

No campo da medicina regenerativa, existe um interesse crescente em aplicar métodos de bioimpressão [51], sendo este, o principal processo envolvido no crescimento de células e reconstrução de órgãos [52]. A engenharia de tecidos foi concebida para desenvolver substitutos práticos para tecidos danificados por meio da aplicação de princípios de biologia e engenharia. Uma combinação de células e biomateriais é muitas vezes empregado como o precursor de impressão em bioimpressão 3D. Esse é um método estudado ativamente na engenharia de tecidos, uma vez que mostra um controle efetivo sobre a fabricação de *scaffolds* e a distribuição das células. A resolução de impressão das técnicas de bioimpressão em 3D é de 10 a 10.000 μm , o que é uma ampla variedade que mostra a flexibilidade da bioimpressão comparada a outros métodos de montagem, como moldagem e estruturas porosas [53], [54].

Como uma técnica de manufatura aditiva, a bioimpressão baseia-se na deposição de biomateriais, encapsulando células carregadas ou não, em escala micrométrica para formar estruturas aptas ao tecido. Devido a vantagens como deposição precisa, custo-benefício, simplicidade e controlabilidade da distribuição de células, o desenvolvimento e aplicação da bioimpressão em 3D tem aumentado constantemente nos últimos anos. Como resultado, a necessidade de novos *bioinks* fornecerá as propriedades necessárias para uma impressão bem-sucedida, como capacidade de impressão, fidelidade de impressão, e melhoras das propriedades mecânicas vêm aumentando, levando a um extenso trabalho para desenvolver novos materiais.

Rees et al. consideraram dois tipos de estruturas impressas em nanocelulose como curativos [55]. O primeiro tipo foi preparado por oxidação mediada por (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il) oxidanil e o segundo tipo foi preparado por carboximetilação e oxidação de periodato combinados. A biomassa de nanocelulose produzida foi então usada para imprimir estruturas porosas 3D, estudada para suporte de crescimento

bacteriano, e mostrou ter potencial para carregar e liberar componentes antimicrobianos, enquanto não suporta o crescimento bacteriano.

Yu e Ozbolat utilizaram um sistema de bocal coaxial para imprimir fitas de tecido como um bioink para impressão de órgãos [56]. O bioxisto baseado em alginato desenvolvido neste trabalho mostrou uma viabilidade de células TC3 de camundongos próxima a 90%. Além disso, as células do músculo liso da veia umbilical humana foram incorporadas no bioink para fabricar estruturas semelhantes ao tecido pancreático para demonstrar ainda mais a aplicabilidade do seu método.

No entanto, para verificar o impacto da microfluídica em aplicações de bioimpressão, comparamos o número de publicações envolvendo estudos microfluídicos de células *versus* estudos da bioimpressão por gotas nos últimos anos. Foi observado a partir da Figura 2. 4 que as evidências experimentais sobre bioimpressão acumularam-se em ritmo muito rápido com o aumento do número de publicações e envolveram grupos de pesquisa em todo o mundo nos últimos tempos [57]–[61]. A pesquisa foi realizada usando o sistema de relatório de análise da *Web of Science*. É importante mencionar que os resultados nominais dessa busca na literatura provavelmente variariam se outras ferramentas de busca fossem aplicadas. Os números correspondem à quantidade acumulada publicações ao longo do tempo e (*) levam em consideração as permutações das palavras-chave.

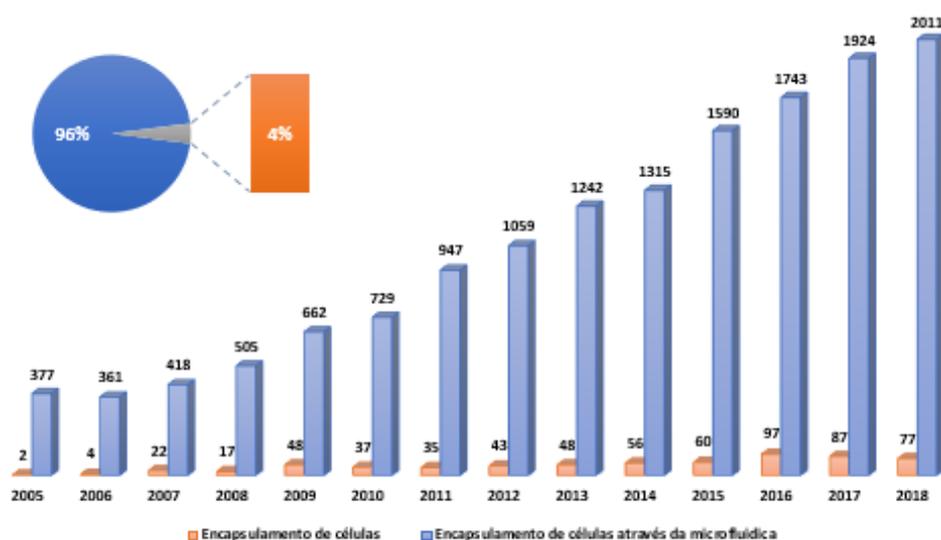


Figura 2. 4 – Publicações nos últimos anos sobre estudos com “*Microfluídica**” como um termo de pesquisa junto com “*Cell encapsulation**”. Pesquisa realizada em 06/04/2019.

Embora a bioimpressão tenha se desenvolvido extensivamente nos últimos anos, as atuais tecnologias implementadas na bioimpressão são, na maioria das vezes, incapazes

de imprimir órgãos sólidos funcionais. Pesquisas abordaram essa questão desenvolvendo modelos que poderiam ser usados *in vivo* para apoiar o desenvolvimento de órgãos sólidos vascularizados, como ossos [54]. Células-tronco foram encapsuladas em um bioink à base de alginato, que foi reforçado pela adição de fibras PCL. Também, peptídeos do ácido Arginilglicilaspártico (RGD) foram incorporados para melhorar a osteogênese para aplicações de engenharia de tecido ósseo. Neste trabalho, uma construção cartilaginosa semelhante ao corpo vertebral foi fabricada e demonstrou apoiar o desenvolvimento ósseo vascularizado *in vivo*.

2.3 ENCAPSULAMENTO DE ESFEROIDES VIA MICROFLUÍDICA

Microfluídica pode ser definida como a ciência e tecnologia de sistemas que estudam o comportamento dos fluidos, bem como os dispositivos de manipulação controlada para realizar tarefas em estruturas com dimensões que variam de dezenas a centenas de micrômetros [62]. As plataformas microfluídicas podem ser fabricadas com diferentes geometrias e em substratos (Figura 2. 5) que podem ser escolhidos de acordo com a aplicação, como polímeros, silício, metais, vidro e cerâmica. Estes sistemas também podem apresentar construções complexas envolvendo eletrodos, termopares, sistemas ópticos, válvulas, entre outros [63], [64].

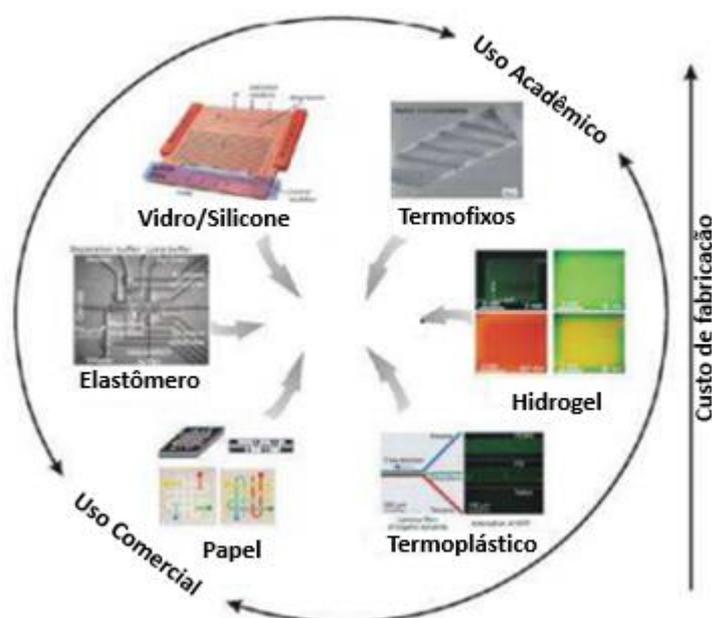


Figura 2. 5 – Materiais utilizados em chips microfluídicos. Adaptada de [65].

Os dispositivos microfluídicos têm sido amplamente utilizados para manipular hidrogéis carregados de células para engenharia de tecidos [66]. Os canais microfluídicos são extremamente adequados para a rápida fabricação de microgotas carregadas com células (também chamadas de microesferas) [67] e microtubos (também chamadas de microfibras) [68]; ambas desempenham papéis importantes na fabricação de *scaffolds* (tecido) [66].

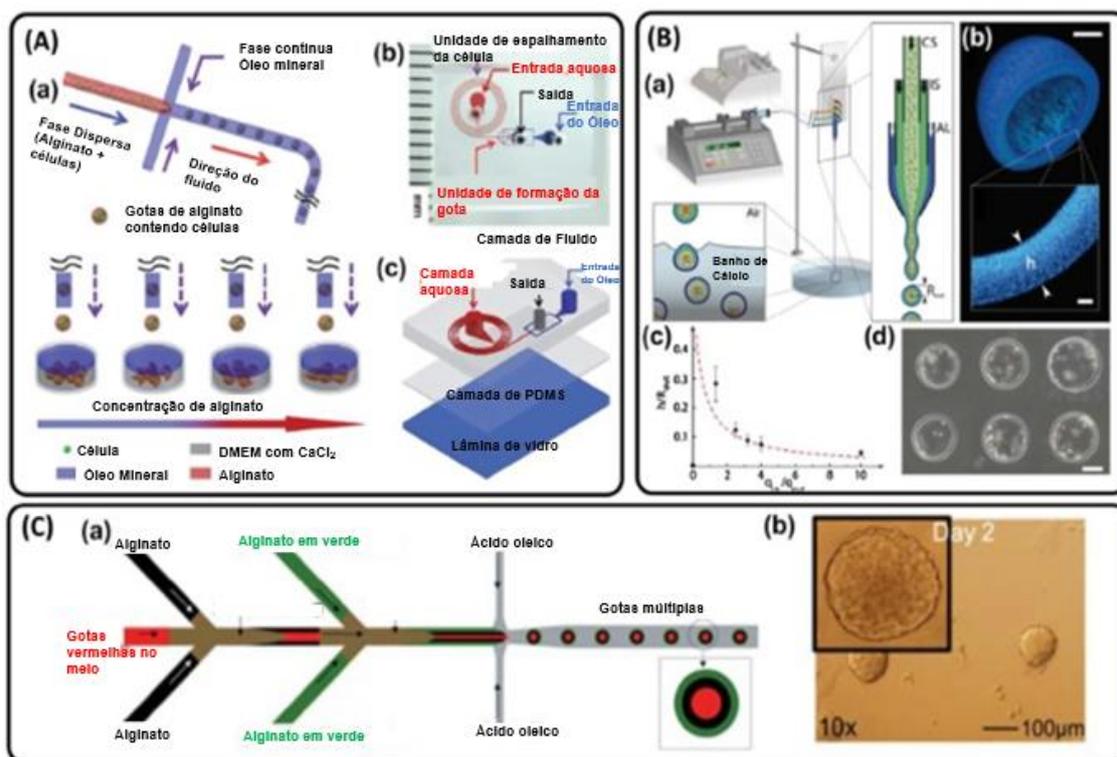


Figura 2. 6 – Técnicas baseadas em emulsão para encapsulamento de esferoides. (A) (a) Ilustração esquemática de um gerador de gotas de emulsão única para a formação de gotas de água uniformes contendo diferentes concentrações de alginato e células dispersas em óleo mineral em um dispositivo microfluídico com focalização hidrodinâmica; (b e c) uma visão geral e composição do dispositivo microfluídico real. [69]. (B) (a) Visão geral esquemática de um dispositivo microfluídico para produção de esferoides multicelulares; (b) Imagem confocal de gotas de alginato; (c) Gráfico do raio da gota em função da vazão; e (d) imagens de contraste de fase de gotas individuais encapsulando células[70]. (C) (a) Vista geral esquemática de um sistema microfluídico para geração de microgotas para a formação eficiente de esferoides de células; (b) Micrografias de contraste de fase representativas de gotas individuais encapsulando células [71].

Os dispositivos microfluídicos têm influência na uniformidade dos tamanhos de gotas e esferoides produzidos por eles [71]. Dispositivos para a geração emulsões simples (Figura 2. 6 A) [69], [72], duplas (Figura 2. 6 B) [70], [73] e triplas (Figura 2. 6 C)

[71] tem sido utilizadas em chips microfluídicos para cultura de esferoides (μ SFCs). Dispositivos de focalização hidrodinâmica para esta aplicação possuem configurações tanto em eixos simétricos [70] quanto assimétricos [71], [72]. A natureza deste método facilita a produção rápida de microgotas e, portanto, a formação de esferoides de alto rendimento (HTSF). Frequências de geração de gotas até 50 gotas por segundo [74] e 200 gotas por minuto foram alcançadas usando hidrogéis de colágeno [75] e alginato [76].

Dispositivos microfluídicos simulando ambientes *in vivo* são mais eficientes do que quando comparados a métodos não microfluídicos [77]–[79] para a formação de esferoides e cultura, apesar de desempenharem papéis essenciais para o desenvolvimento da medicina regenerativa apresentam deficiências em sua formação como diâmetros de esferoides variáveis, difícil manuseio e baixo rendimento, que limitam a sua eficácia na pesquisa biológica. Além disso, o microambiente estático de uma placa de cultura convencional de micropoços ou de gotas suspensas (HD) provoca a rápida diminuição de oxigênio e nutrientes, influenciando diretamente nos esferoides e nos resultados subsequentes de teste de drogas [80]. Outros métodos convencionais, tais como frascos rotativos e agitação de tanques [81], [82] são abordagens lentas que exigem grandes quantidades de meio de cultura e espaço. Esses métodos também resultam em variações significativas no tamanho dos esferoides, bem como nos efeitos prejudiciais nas células, principalmente devido ao estresse de cisalhamento.

Avanços recentes na microfluídica contribuíram significativamente para a pesquisa de esferoides em 3D, abordando as limitações acima mencionadas [83], [84]. As vantagens significativas dos sistemas microfluídicos incluem o fornecimento de mistura controlada [85], gradientes de concentração química, menor consumo de reagente, perfusão contínua e controle preciso da pressão e tensão de cisalhamento nas células [86]. Uma característica notável dos dispositivos microfluídicos é que as células podem ser cultivadas em um microambiente dinâmico para melhor mimetizar o ambiente dos tecidos.

Lee et al. relataram que a viabilidade celular dos hepatócitos foi menor em culturas de células estáticas quando comparadas com condições dinâmicas em dispositivos microfluídicos após vários dias de cultura [87]. Além disso, Ruppen et al. demonstraram experimentalmente que os esferoides de câncer expostos à perfusão contínua de drogas apresentaram maior resistividade do que os esferoides sob condições estáticas (em uma placa de micropoços) [88].

Vários líquidos são usados para encapsulação de células e para a formação de esferoides em μ SFCs com diferentes configurações ao redor da corrente. Suspensão celular (CS) em emulsão de óleo (O) (isto é, CS/O) e geração de gotas em hidrogel com células (Gel) em óleo (isto é, Gel / O) estão entre os métodos de emulsão simples que são amplamente utilizados [72], [89], [90]. Já a suspensão celular em óleo em meio de cultura (CM) (isto é, CS/O/CM) e CS/Gel/CM são técnicas emulsões duplas [70], [73]. A técnica de dupla emulsão CS/Gel/CM pode melhorar a uniformidade das gotas e prender as células firmemente dentro da gota. No qual é facilitado pelo encapsulamento da gota central contendo células dentro de um invólucro de hidrogel de alginato [70], [71] que atua como uma barreira impermeável em relação às células. No entanto, em contraste com o método CS/O/CM, a gelificação é necessária no método CS/Gel/CM, normalmente neste tipo de composição a gelificação ocorre através de UV (Ultra-Violeta). O uso de óleo como barreira em vez de hidrogel aumenta o transporte de oxigênio para as gotas, refletindo a maior permeabilidade do óleo a pequenas moléculas [91]. Embora essas barreiras produzam gradientes de concentração de nutrientes dentro das gotículas, elas atuam como uma interface entre o meio de cultura e as células encapsuladas que protegem as células das altas forças de cisalhamento. Esse assunto será aprofundado no capítulo 3, no qual terá um enfoque maior para emulsões simples que é o tipo de emulsão utilizada nesta pesquisa.

CAPÍTULO 3

MICROFLUÍDICA DE GOTAS

A manipulação de fluidos em canais com dimensões de dezenas de micrômetros - microfluídica - emergiu como um novo campo distinto. As primeiras aplicações de tecnologias microfluídicas têm sido analisadas, para as quais oferecem uma série de recursos úteis: a capacidade de usar quantidades muito pequenas de amostras e reagentes, e de realizar separações e detecções com alta resolução e sensibilidade; baixo custo; tempos curtos para análise; e pequenas pegadas para os dispositivos analíticos. A microfluídica explora tanto sua característica mais óbvia - tamanho pequeno - quanto características menos óbvias de fluidos em microcanais, como o fluxo laminar. Oferece fundamentalmente novas capacidades no controle de concentrações de moléculas no espaço e no tempo.

O presente capítulo revisa os conceitos da Microfluídica de Gotas, apresentando primeiramente os conceitos básicos da microfluídica e na sequência são introduzidos os princípios para a formação de gotas através de dispositivos microfluídicos juntamente com os tipos de geometrias mais usuais da literatura, na qual será particularmente útil dentro do cenário da metodologia proposta neste trabalho. Em seguida, é apresentada a aplicabilidade da microfluídica dentro da biopressão, sendo o ponto central a bioimpressão a base de gotas.

3.1 CONCEITOS GERAIS

A microfluídica tem características impactantes que a tornam atraente como ferramentas práticas e viáveis em áreas de biotecnologia. O conhecimento dos conceitos de física e dinâmica de fluidos, bem como diversas possibilidades de configurações de material e geometria, são aspectos importantes para o desenvolvimento de novos projetos microfluídicos com aplicações adequadas. As tecnologias microfluídicas mostram características específicas que devem ser consideradas na construção de novas plataformas, e os sistemas gerador de gradiente, gotas e microbiorreatores são as ferramentas mais aplicáveis em ensaios biológicos [92]. Assim, para idealizar novas abordagens em microfluídica, é importante conhecer as características conceituais da construção e das aplicações.

Diferente do que ocorre na macroescala, os sistemas microfluídicos têm propriedades particulares, como fluxo laminar e grandes relações área-volume, levando a taxas de transferência de calor e massa aumentadas e reações mais rápidas. [93]. Outra vantagem é que a manipulação controlada de pequenos volumes de amostras e reagentes em sistemas miniaturizados [3] também proporciona custos operacionais reduzidos. No entanto, técnicas avançadas de detecção são normalmente necessárias.

A compreensão dos fenômenos físicos que ocorrem dentro de sistemas microfluídicos é essencial para compreender como ele pode ser usado ou personalizado para diferentes aplicações [92]. Em termos de microfluídica, as principais forças que operam em fluidos e influenciam seu comportamento são as forças inerciais, viscosas e interfaciais. Diversos números adimensionais indicam a relevância entre essas forças, como o número de Reynolds (Re), relacionando forças inerciais a forças viscosas; o número de Capilaridade (Ca), relacionando as forças viscosas com as forças interfaciais; e Weber (We) relacionando a força de inércia e as forças interfaciais [94], e caracterizam os padrões de escoamento com a possibilidade de explorar processo de mistura até geração de gotas dentro de microcanais.

Devido aos pequenos diâmetros hidráulicos, sistemas de microfluidos operaram em regime de escoamento laminar, com valores típicos de Reynolds na faixa entre $0,1 \sim 100$ [95]. Todavia, um dos parâmetros mais importantes para a formação de gotas é o número de Capilaridade. Em valores baixos de Ca (<1), parece que as forças de tensão superficial são dominantes sobre a força viscosa e as gotas são esféricas. Em altos valores de Ca ($\gg 1$) a força viscosa desempenha um papel importante, levando à deformação das gotas pelo escoamento, caracterizada por formas assimétricas [96].

Se o número de Weber (We) for maior que o valor crítico, $We_{crit} = 1.1$, as gotas são fortemente distorcidas pelas forças de inércia e a quebra pode ocorrer. No caso de um valor muito baixo para este número, a inércia passa a ser considerada desprezível frente as forças interfaciais, já para um valor moderado We , a inércia deforma a gota sem interrompê-la. [97]

3.2 FORMAÇÃO DA GOTA E GEOMETRIAS DE FLUXO

Uma emulsão é uma mistura de dois líquidos imiscíveis, onde um líquido é disperso na forma de pequenas gotas em outro líquido que forma uma fase contínua. A maioria dos métodos convencionais de fabricação de emulsões envolve a quebra usando tensões

de cisalhamento geradas através de agitação manual ou mecânica (método de emulsificação em massa ou “batelada”) ou através da microfluídica. Os métodos de emulsificação granel e microfluídica são comparados na Tabela 3. 1, que inclui critérios como controle sobre a estrutura e composição das gotas, distribuição de tamanho, produção de volume, simplicidade ou possibilidades de expansão entre outras características.

Tabela 3. 1 – Comparação de algumas características entre os métodos de emulsificação em massa (‘batelada’) e microfluídica. Adaptado de [98].

Características	Métodos de emulsificação em massa (‘BATELADA’)	Métodos de emulsificação por Microfluídica
Controle do tamanho da gota	O tamanho das gotas depende das propriedades físico-químicas dos líquidos, da ordem de adição, da taxa de mistura e, para alguns, amplia a forma do reator e do agitador.	O tamanho das gotas depende das dimensões dos capilares, propriedades físico-químicas dos líquidos e suas taxas de fluxo.
Controle de forma e composição das gotas	Nenhum controle preciso sobre a estrutura e a composição da gota. Difícil de produzir gotículas não esféricas.	Alta precisão sobre a estrutura e composição das gotas. Capaz de formar materiais complexos e gotículas não esféricas facilmente.
Distribuição de tamanho	Polidispersividade > 5%.	Polidispersividade ≤ 3% (produção de uma gota de cada vez).
Viscosidade	Líquidos com uma ampla gama de viscosidades podem ser usados.	Difícil de trabalhar com líquidos altamente viscosos.
Encapsulamento em múltiplas emulsões	Muitas perdas durante a formação da emulsão devido ao esforço de cisalhamento aplicado (baixa eficiência de carga).	Quase uma eficiência de carga perfeita, principalmente devido ao controle preciso sobre a formação de cada gotícula.
Produção	Produção de grandes volumes (alta produtividade).	Produção de pequenos volumes (baixa produtividade).
Aumento de escala	Fácil de aumentar a escala (reatores maiores).	Difícil de aumentar a escala (dispositivos em paralelo).
Equipamento	O material usado no dispositivo para a formação da emulsão (reator, agitador, ...) geralmente não precisam de nenhum tratamento especial.	Um dispositivo microfluídico específico tem de ser construído e, por vezes, é necessário um tratamento prévio da sua superfície devido a problemas de molhabilidade.
Compatibilidade entre componentes de emulsão e equipamento	Quase nenhum problema em relação a incompatibilidades entre o líquidos e o material utilizado para a formação da emulsão.	Algumas incompatibilidades entre os líquidos e o material do dispositivo (inchaço, degradação do dispositivo...).

Embora as origens da microfluídica baseada em gotas possam ser rastreadas formalmente até os conceitos de análise de fluxo segmentado e análise de injeção de fluxo desenvolvidos há mais de 40 anos, a tecnologia atual que utiliza gotas na faixa de diâmetro micrométrico a nanométrico está mais relacionada ao desenvolvimento de técnicas de microfabricação – análise e os conceitos de *lab-on-chip*[99]. A microfluídica baseada em gotas é uma subcategoria de microfluídica, na qual as gotas servem como vasos de transporte e reação. O princípio da formação de gotas baseia-se na utilização de dois líquidos imiscíveis em que a fase dispersa é injetada no escoamento de uma fase contínua. Tempos de reação rápidos em compartimentos tão pequenos são induzidos pela alta área superficial em razão do volume, transferência eficiente de calor e massa e distâncias curtas de difusão. [97].

Para a formação de gotas estáveis, as emulsões (suspensões de gotas criadas usando dois líquidos imiscíveis [100]) são um fator fundamental da microfluídica de gotas. Independentemente de seu uso final ser em microreatores ou em aplicações baseadas em partículas/células [101] as gotas devem atender às propriedades desejadas, incluindo tamanho, forma e monodispersividade [102] e resistência à coalescência durante o uso e armazenamento. As gotas também devem fornecer um ambiente biocompatível para experimentos com células vivas ou organismos superiores [103]. As fases contínuas mais comuns incluem óleos de hidrocarbonetos e fluorocarbonetos.

A formação de gotas pode ser categorizada em dois tipos de métodos, isto é, abordagens passiva e ativa [97]. Em comparação com métodos ativos, os métodos passivos geram gotas através de ajustes nas dimensões e geometrias de microcanais ou controlando as vazões de dois líquidos imiscíveis sem a utilização de forças adicionais. Já a ativa é projetada para fornecer controle preciso sobre parâmetros como tamanho, forma, monodispersividade e componentes dentro das gotas, além de proteger as gotas sintetizadas com interferência externa. Foi definido vários métodos para a formação de gotas[104], incluindo:

- Hidrodinâmica – método passivo (junções em T, em Y, focalização hidrodinâmica, co-fluxo).
- Pressão pneumática (a pressão do gás é usada como força de cisalhamento e força motriz para formar gotas).
- Acionado opticamente (o princípio que usa a força óptica para manipular partículas em dispositivos microfluídicos foi aplicado com sucesso por Park et al [105] que

relataram um mecanismo de formação de gotas de alta velocidade, acionado por laser de pulso.

- Técnicas acionadas eletricamente: dieletroforese (DEP) e eletrovoltaica no dielétrico (EWOD) [104].

Nesta seção, nos concentraremos nos dispositivos que utilizam o método passivo para geração de gotas, assim trataremos do método hidrodinâmico, incluindo junções em T, focalização hidrodinâmica e co-fluxo.

3.2.1 JUNÇÃO T

A geometria microfluídica mais comum usada para a geração de gotas é a junção em T. Nesta configuração, o canal de entrada, contendo a fase dispersa, intercepta o canal principal, contendo a fase contínua, quando a força de cisalhamento da fase contínua é grande o suficiente para fazer a mudança de momentum leva-se à instabilidade interfacial do líquido formando as gotas (Figura 3. 1 A). Os canais são normalmente dispostos ortogonalmente e as gotas se formam na interseção do canal. Esta geometria também pode ser usada para a formação de bolhas e / ou emulsões duplas. Tal mecanismo de formação de gotas foi primeiro relatado por Thorsen et al [106]. Seus resultados descobriram que o tamanho das gotículas formadas dependia da força de cisalhamento da fase contínua e da força de Laplace.

No entanto, estudos mais recentes mostraram que o número de capilares e a relação de aspecto do microcanal também influenciam a formação de gotas [1]. Charles et al [101] descreveram que existem três modelos para geração de gotas na junção em T, ou seja, fluxos paralelos estáveis, gotejamento e jateamento, de acordo com a taxa de vazão da fase contínua com a fase dispersa e a relação x da largura do canal da fase dispersa W_{in} com a largura do canal da fase da contínua W_{out} .

Devido ao seu mecanismo simplista e estudos detalhados da formação de gotas, a junção em T simples pode ser vista como uma técnica microfluídica básica para gerar gotas. Até agora, existem várias configurações avançadas sendo derivadas disso, como dispositivo duplo em forma de T e dispositivo de junção em T integrado de microbombas/micro-válvulas. Por exemplo, Lin et al [107] integraram uma bomba pneumática no microcanal em forma de T, no qual o tamanho das gotículas era controlado, ligando/desligando a micro-válvula.

3.2.2 CO-FLUXO

O método co-fluxo é projetado a partir de um capilar / microcanal embutido em um outro microcanal, onde a fase contínua flui para o microcanal e a fase dispersa flui para o capilar/microcanal, respectivamente. Neste dispositivo, a fase contínua em torno do orifício do capilar espreme a fase dispersa formando gotas (Figura 3. 1 B). Esse método foi introduzido pela primeira vez por Cramer et al [108], dois diferentes mecanismos de formação de gotas foram propostos: ou as gotas são formadas na ponta capilar em um processo de gotejamento; ou o fluido interno no capilar forma um jato, jateamento.

Existe um ponto de transição entre os dois mecanismos. No modelo de gotejamento, o diâmetro da gota diminui à medida que a vazão da fase contínua aumenta. Quando o diâmetro da gota se torna aproximadamente igual ao diâmetro interno do capilar, há uma transição espontânea para o jateamento [109]. Isso ocorre porque a tensão superficial desempenha um papel importante na baixa vazão da fase dispersa; quando a vazão da fase dispersa é grande o suficiente, a força de inércia do fluido da fase dispersa é maior do que a tensão superficial. Além disso, Cramer et al [108] investigaram o efeito da vazão, viscosidades dos fluidos e tensão interfacial no tamanho das gotas. Eles mostraram que a taxa de formação de gotas e o tamanho não se relacionavam apenas com o fluido, mas também com os parâmetros do processo. Com a taxa de fluxo da fase contínua aumentando, a taxa de formação de gotas aumentou e o raio da gota diminuiu.

3.2.3 FOCALIZAÇÃO HIDRODINÂMICA

Neste arranjo de formação de gotas, os canais simétricos, fornecendo a fase contínua, circundam o canal que fornece a fase dispersa. À medida que a fase dispersa flui para o canal aberto, a fase contínua força a fase dispersa através de um pequeno orifício levando a um canal maior preenchido com a fase contínua. As gotas são formadas à medida que as duas fases são forçadas através do diâmetro do microcanal.

Tipicamente, o processo de formação de gotas através da focalização hidrodinâmica poderia ser descrito por três etapas [110] (Figura 3. 1 C). Primeiro, uma interface formada na intersecção entre dois fluidos imiscíveis flui para a posição "A"; Segundo, um pescoço claramente visível se desenvolve sob a pressão da fase contínua e com a coordenação da estrutura geométrica da posição "A"; Terceiro, a corrente entra em colapso, quebra-se sob a força crescente de "compressão" e retrai-se a montante do orifício, e todo o processo

recomeça. Esse dispositivo de focalização hidrodinâmica pode ser visto como derivado do dispositivo em junção T, e o orifício na posição “A” é mais condutivo para aumentar a instabilidade da fase dispersa.

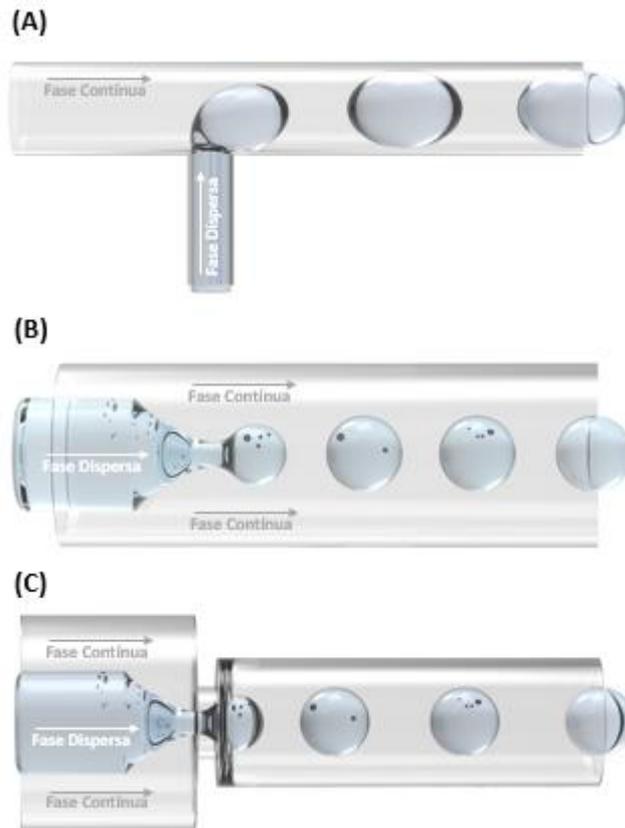


Figura 3. 1 – Esquema de dispositivos microfluídicos para fabricar emulsões utilizando (A) Junção em T. A fase dispersa encontra a fase contínua na região transversal da junção em T, e é pressionada, formando então as microgotas a jusante; (B) Co-fluxo. O fluxo interno (fase dispersa) do capilar centrado no microcanal, é espremido na saída do capilar pela força da fase contínua, e formando as microgotas a jusante; (C) Focalização hidrodinâmica. A fase dispersa é comprimida por dois fluxos de contracorrente da fase da contínua, forçando as gotas a se soltarem. Adaptado de [111].

Na microfluídica, o tamanho da gota é basicamente determinado por três parâmetros diferentes: a vazão das fases, as propriedades dos líquidos (tensão superficial e viscosidade) e as dimensões características do dispositivo. Também é importante notar que as propriedades de molhabilidade das paredes dos microcanais são cruciais para uma geração constante de gotículas. Como já mencionado, além de emulsões simples, técnicas microfluídicas também permitem a formação de emulsões múltiplas, seja pela combinação de dois ou mais passos consecutivos de co-fluxo [112] ou pela combinação de geometrias de co-fluxo e de focalização hidrodinâmica [67].

3.3 BIOIMPRESSÃO BASEADA NA MICROFLUÍDICA DE GOTAS

A bioimpressão 3D, uma tecnologia baseada em manufatura aditiva para construção 3D precisa, é amplamente utilizada atualmente para melhorar a aplicabilidade e a função de *scaffolds* carregados de células. A capacidade de impressão para melhorar o processo de fabricação e o encapsulamento de células são dois dos principais fatores a serem considerados no desenvolvimento da bioimpressão 3D. Outros fatores importantes podem ser incluídos, estabilidade, tempo de reticulação, biocompatibilidade, proliferação celular, propriedades de cisalhamento e propriedades mecânicas, tais como resistência mecânica e elasticidade [33].

A bioimpressão baseada em gotas (DBB) promete maiores vantagens devido à sua agilidade e simplicidade, versatilidade, com controle otimizado da deposição. Mas alguns desafios ainda precisam ser resolvidos. O maior desafio é projetar uma cabeça de impressão adequada. As características físicas das cabeças de impressão atualmente disponíveis limitam o controle de poucos parâmetros, incluindo o volume de microgotas, o posicionamento preciso de gotas, o número de células encapsuladas em cada gota, viscosidade *bioink* e viabilidade a longo prazo do sistema fabricado [114].

A bioimpressão baseada em gotas, como mostrado na Figura 3. 2, compreende jato de tinta, ejeção de gota acústica (ou simplesmente acústica) e bioimpressão com micro-válvulas. Bioimpressão a jato de tinta é classificada em três: (i) Contínua (CIJ), (ii) Gotas por demanda (DOD) e (iii) jateamento eletro-hidrodinâmico (EHD). A bioimpressão a jato de tinta contínuo aproveita a instabilidade do Rayleigh-Plateau para quebrar os jatos em gotas. A bioimpressão de gotas por demanda, por outro lado, usa atuadores térmicos ou piezoelétricos, ou forças eletrostáticas para gerar gotas. Em contraste, a bioimpressão com jato eletro-hidrodinâmico (EHD) usa altas faixas de tensão elétrica para liberar gotas. Ao passo que, a bioimpressão acústica usa ondas acústicas para produzir gotas e a bioimpressão de micro-válvulas usa uma bomba de solenóide para liberar gotas.

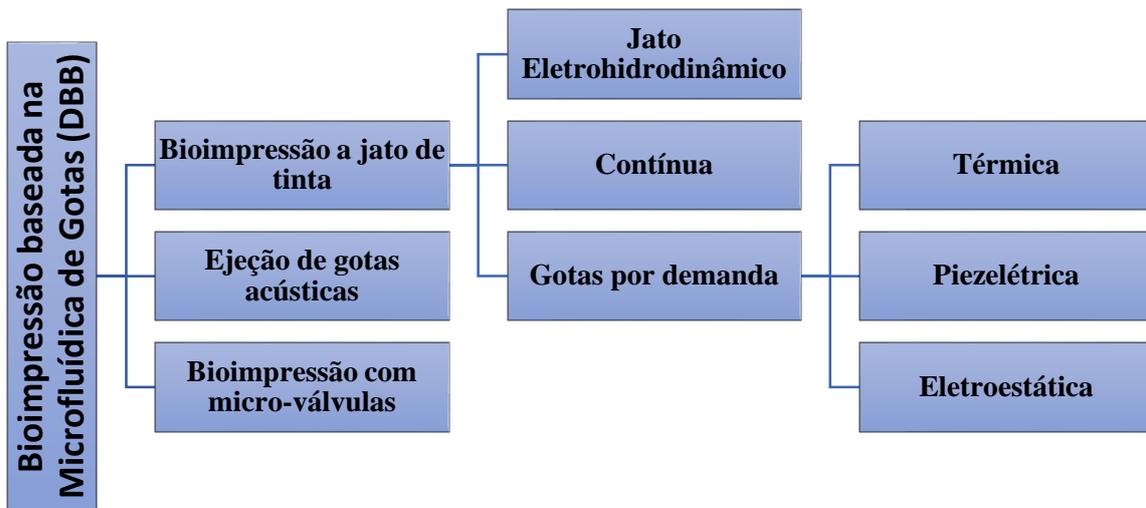


Figura 3. 2 – Classificação das Técnicas de Bioimpressão Baseada em Gotas em modalidades de bioimpressão a jato de tinta, acústica e micro-válvula. Adaptada de [115]

CAPÍTULO 4

EMULSÕES E SURFACTANTES

Na maioria das emulsões, um líquido é água (ou uma solução aquosa) e o outro é um líquido orgânico, geralmente chamado de óleo. Assim, a emulsão pode ser classificada dependendo da natureza da fase dispersa em dois tipos principais: emulsões óleo-em-água (gotas de óleo dispersas em água, abreviadas como O/W) ou emulsões água-em-óleo (gotas de água dispersas em óleo, abreviado como W/O), conforme representado esquematicamente na Figura 4. 1. Eles são extremamente importantes para uma variedade de aplicações, como entrega macromolecular, recuperação de óleo, processamento de alimentos e manuseio de materiais perigosos. A presença de um surfactante nativo ou adicionado é necessária para a estabilidade a longo prazo das emulsões: as moléculas de surfactante migram para a interface líquido-líquido e inibem a coalescência de gotas.

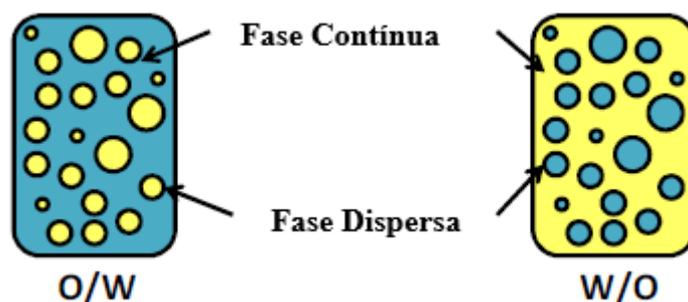


Figura 4. 1 – Esquemas de emulsões óleo-em-água (O / W) e água-em-óleo (W / O).

O presente capítulo revisa os conceitos sobre emulsões e surfactantes, apresentando primeiramente os princípios e a influência do hidrogel no encapsulamento celular e na sequência é introduzido o processo de gelificação do hidrogel (micropartículas de alginato), logo após os conceitos de surfactante juntamente como estes atuam na formação de gotas.

4.1 HIDROGEL PARA BIOIMPRESSÃO

A geração de hidrogéis em microfluídica oferece a capacidade de atender às características necessárias para manter os esferoides ativos. Em dispositivos microfluídicos, as dimensões do microcanal geralmente variam de dezenas a centenas de micrômetros, o que permite a geração de hidrogéis de tamanho similar [116]. Hidrogéis podem ser produzidos com diferentes formas e morfologias, incluindo uma morfologia uniforme ou estrutura capsular [117]. Para que o encapsulamento celular seja possível, os hidrogéis têm requisitos básicos, como estabilidade química e mecânica, biocompatibilidade e permeabilidade suficiente.

Os dispositivos microfluídicos têm a capacidade de controlar e, com alto desempenho, alterar as propriedades físicas e químicas do hidrogel, alterando as quantidades relativas dos componentes do gel. Em cápsulas, a membrana externa do hidrogel permite a proteção das espécies encapsuladas de estímulos externos prejudiciais, enquanto um núcleo líquido fornece um microambiente celular adequado [118], [119]. Além disso, é possível modular sua composição e estrutura para imitar os microambientes naturais.

A encapsulação de células em hidrogéis oferece o método de encapsulação mais simples, com um processo que envolve os seguintes passos: 1) suspensão de células a uma densidade desejada numa solução de pré-gelatina; 2) a suspensão de células pré-gel através de um processo de transição de temperatura, reação química ou fotocura [120]. O método de gelificação induzido por ultrassom é um processo adicional que acelera a cinética de gelificação, na qual polímeros sintéticos como hidrogéis baseados em poli(etileno glicol) – PEG – são comumente usados como materiais volumosos de encapsulamento de hidrogel [121]. A maioria dos hidrogéis baseados em PEG para encapsulação requer um procedimento de fotopolimerização para gelificação. Misturas de monômeros, reticuladores e fotoiniciadores são componentes chave da formação de gel [122].

Como encapsulamento de células vivas, a opção comumente encontrada na indústria farmacêutica, engenharia de tecidos e medicina regenerativa são sistemas microencapsulados baseados em alginato [116], [123]–[126]. Alginatos são polissacarídeos aniônicos extraídos de algas marinhas compostas de ácidos b-D-manurônico e a-L-gulurônico. Eles formam hidrogéis com cátions multivalentes, como Ca^{2+} , Ba^{2+} ou Fe^{3+} . Eles também representam uma opção atraente para a produção de

sistemas de liberação de fármacos devido à sua biocompatibilidade e efeitos colaterais reduzidos.

O alginato é um copolímero natural e linear isolado de algas marrons [127], algas marinhas ou bactérias[128]. É um polissacarídeo hidrofílico que é comumente usado em indústrias de alimentos, indústrias farmacêuticas [127], entrega de medicamentos, pesquisa com células-tronco e engenharia de tecidos [129]. Ele solidifica ionicamente em contato com íons bivalentes para produzir matrizes 3D em torno de células [130]. Microesferas de alginato permitem a difusão de nutrientes e resíduos de e para as células, respectivamente [130]. Este polímero tem muitas vantagens que o tornam um dos hidrogéis mais usados na microencapsulação celular [127]. É não-tóxico, biocompatível, biodegradável, fácil de polimerizar e comercialmente disponível [130]. Além disso, forma um gel em condições que são adequadas para fornecer viabilidade celular a longo prazo [128].

Por se assemelharem à matriz extracelular natural, os hidrogéis de alginato também podem ser usados na engenharia de tecidos [131], [132] no encapsulamento de células transplantadas, fornecendo uma barreira de isolamento imunológico para as células [133]–[136] e potencialmente permitindo o transplante sem a necessidade de imunossupressão.

Alginatos podem atuar como unidades de cultura micrométricas tridimensionais, o que permite que células individuais e seus agregados esferoidais sejam independentemente monitorados e/ou manipulados, por exemplo, para entrega de células para o reparo de tecido danificado[137]. As micropartículas de alginato ideais para as aplicações acima mencionadas devem ser compostas por uma rede homogênea que permita um aprisionamento estável da célula encapsulada.

4.2 GELIFICAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO EM MICROCANAIS

A gelificação iônica é um processo simples, que não requer o uso de solventes orgânicos nem de temperatura ou pH extremos, tornando-se de baixo custo em comparação com outras técnicas [138] Além disso, a gelificação iônica permite encapsular substâncias hidrofílicas ou hidrofóbicas [139]. Por outro lado, apesar das partículas de gelificação iônica serem adequadas para a encapsulação, estas são sensíveis a valores de pH extremos. Além disso, seu principal diferencial é a porosidade da matriz, a qual determina a liberação da substância encapsulada. Para superar essa limitação pode-se

modificar a estrutura do gel, a partir da combinação de diferentes tipos de biopolímeros, de forma a garantir o aproveitamento das vantagens da composição química de cada composto ou pela interação com polieletrólitos como proteínas[138].

Embora o processo de gelificação e a sua natureza aparentemente estocástica sejam fenómenos complexos, as macro e microgotas são construções macromoleculares bem estruturadas. No caso da encapsulação de células, as restrições mecânicas e químicas impostas pelas células encapsuladas induzem toda a estrutura a procurar um equilíbrio dinâmico das interações físico-químicas entre as células e a matriz polimérica. Mesmo que os biopolímeros usados para a encapsulação possuam unidades monoméricas repetitivas, cada uma delas pode adaptar diferentes configurações tridimensionais durante a gelificação, sendo este um dos fatores responsáveis pelas propriedades do gel [140].

A formação de microgotas de alginato por microfluídica foi investigada pelos métodos de gelificação externa e interna, uma vez que a cinética de gelificação pode influenciar na formação de gotas em sistemas microfluídicos e, conseqüentemente, na estrutura de micropartículas de alginato [137]. Para o presente estudo, a partir da revisão da literatura, foi convencionado a utilização da gelificação do tipo externa.

As técnicas de gelificação de alginato em microfluídica de gotas, tanto no método tipo externo quanto do tipo interno, são baseados no processo de emulsificação. Nos estudos em microcanais, a gelificação externa usando o reticulante juntamente com o alginato numa mesma gota é o processo menos favorável, uma vez que a rápida reticulação do gel pode obstruir os canais e causar quebras das micropartículas durante o processamento. Apesar disso, alguns trabalhos mostraram que é possível utilizar este método de gelificação ao adicionar uma fase intermediária entre as correntes da solução de alginato e do reticulante, a fim de limitar a difusão do reticulante, conforme apresentado nos estudos de CHOI et al. [141] e por MADRIGAL et al. [142] (Figura 4. 2 A e B). Outra forma de induzir a gelificação do tipo externa em microfluída é a formação de gotas contendo apenas a solução de alginato e a reticulação ser feita posteriormente, após o processamento microfluídico, com a coleta das gotas geradas em um reservatório que já contenha a solução do agente gelificante, assim como apresentado no trabalho de CHEN et al. [143] (Figura 4. 2 C).

Com relação à produção de micropartículas de alginato usando a gelificação do tipo interna, a liberação dos íons complexados gera um processo de reticulação mais lento, sem

afetar a geração de gotas nos microcanais. No trabalho de Tan & Takeuchi [124] foi estudada a formação de micropartículas de alginato por gelificação do tipo interna numa configuração de junção T. Neste estudo foi usado nanopartículas de carbonato de cálcio (CaCO_3), sendo a liberação dos íons de Ca^{2+} feita por redução de pH. A gelificação do tipo interna também pode ser feita sem mudanças de pH, a qual a pode afetar a viabilidade celular (Figura 4. 2 D). Nos trabalhos de Håti et al. [144] e Bassett et al. [144] foi utilizando um sistema de focalização hidrodinâmica para produção de gotas e a gelificação do tipo interna ocorreu devido à troca iônica entre cátions complexados com quelantes, tais como ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e ácido N-diacético (EDDA). Desta forma, a reticulação é feita de uma forma lenta e gradual conforme há a troca os íons e consequentemente são formadas micropartículas monodispersas para encapsulação de diversos materiais biológicos (Figura 4. 2 E).

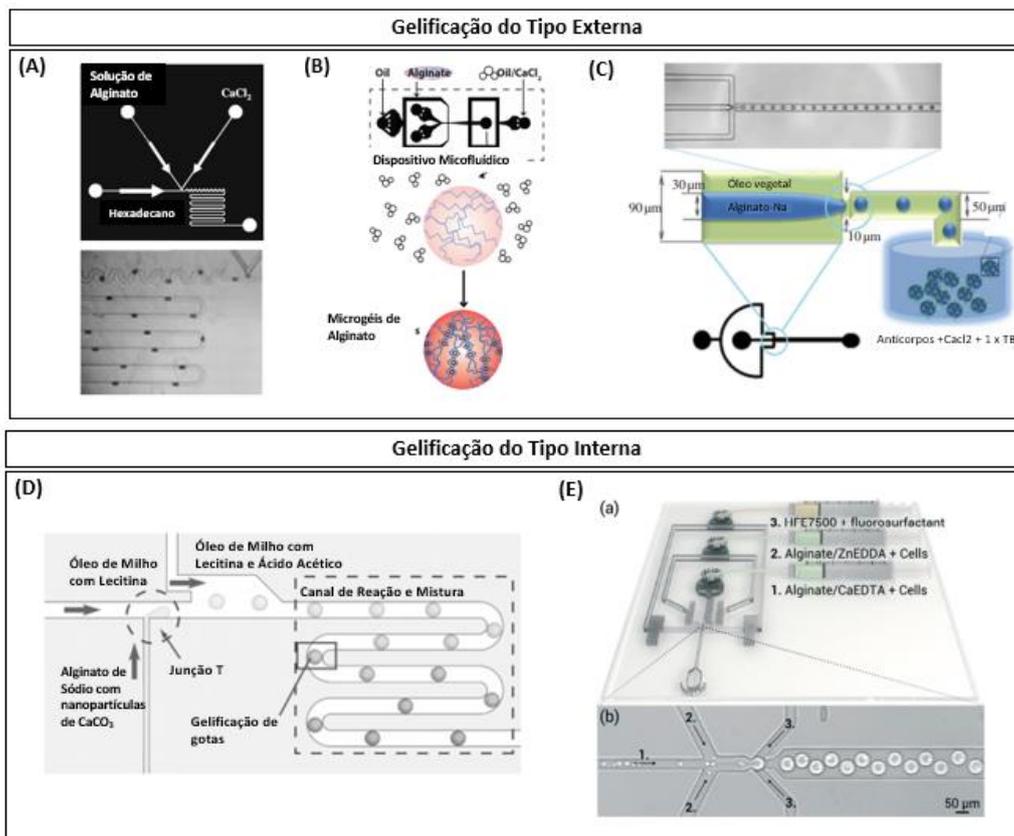


Figura 4. 2 – Estratégias por gelificação externa: A) Gelificação externa misturando as soluções de alginato e CaCl_2 diretamente numa mesma gota [123]; B) Adição de uma segunda corrente contínua contendo solução de CaCl_2 para gelificação após a formação das gotas de alginato[124]; C) Formação de gotas de alginato em microcanais e posterior gotejamento em solução contendo CaCl_2 [125]. **Estratégias por gelificação interna:** D) Liberação de íons de cálcio por redução de pH para reticulação do alginato [106]; E) Gelificação lenta por troca iônica de cátions quelados com EDTA e EDDA [126]. Imagens adaptadas dos respectivos autores destes trabalhos.

4.3 SURFACTANTE

Gotas de alginato assim produzidas têm sido usadas para o encapsulamento de várias biomoléculas, incluindo proteínas, enzimas, anticorpos, células e DNA. Como as esferas menores oferecem várias vantagens, como transporte mais fácil, dispersão limitada, maior resistência mecânica e injeção mais fácil, a necessidade de microgotas de alginato com dimensões $<100 \mu\text{m}$ está aumentando [109], [132]. Os métodos de preparação convencionais para pequenas gotas de alginato são técnicas de emulsificação e de gelação interna. No entanto, o tamanho das microesferas produzidas não pode ser facilmente manipulado, e as gotas resultantes tendem a fundir-se em esferas maiores antes do pós-processamento, porque um grande número de parâmetros pode influenciar as características das microesferas.

Recentemente, os métodos microfluídicos forneceram uma abordagem simples para a síntese de microgotas monodispersas, sendo o tamanho resultante controlado pelo uso de dois fluidos imiscíveis e pela geometria dos microcanais [147], [148]. No entanto, há poucos relatos sobre a síntese de microgotas envolvendo biopolímeros devido à sua alta viscosidade [117], [135]. Para um melhor controle do tamanho resultante e uma alta permanência da estrutura das microgotas de alginato permanecerem estáveis, é utilizado surfactantes.

Um surfactante é definido como uma substância que reduz a tensão superficial entre duas fases imiscíveis, aumentando assim a emulsificação e a estabilidade da emulsão. Uma característica fundamental dos surfactantes é sua tendência a adsorver nas interfaces. Quando presentes em baixas concentrações em um sistema líquido, as interações entre as moléculas na superfície do líquido são alteradas. Como resultado, a tensão superficial é alterada. Como a tensão superficial depende do número de moléculas adsorvidas por unidade de área, aumentando a concentração de surfactante, a tensão superficial diminui, até que a superfície disponível esteja saturada e não mais moléculas possam ser acumuladas nela (Figura 4. 3). O sistema atinge então a tensão superficial mais baixa e as moléculas de surfactante começam a se autoagregar espontaneamente. A concentração mínima na qual as micelas se formam é chamada Concentração Micelar Crítica (CMC) e é uma característica importante de um surfactante. Em concentrações mais elevadas de surfactante ocorre uma transição de fase para fases líquidas cristalinas.

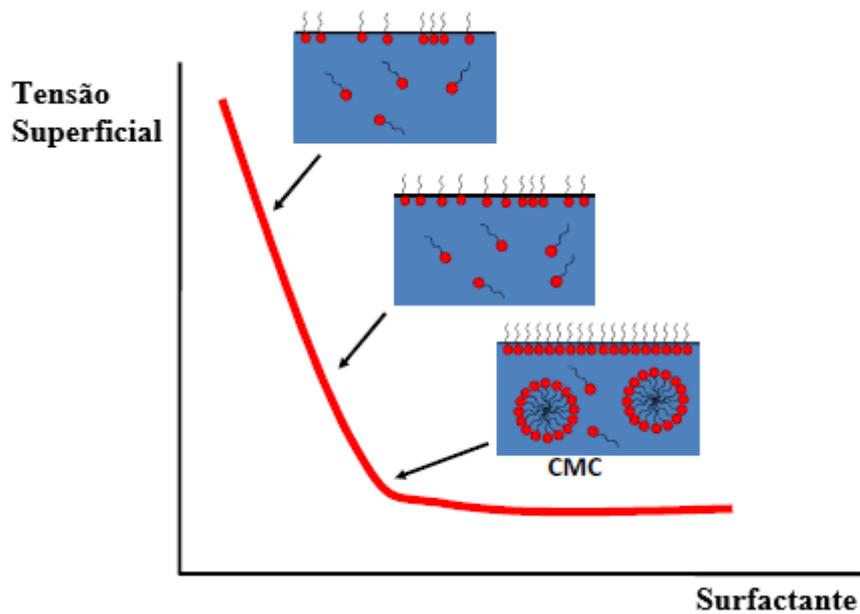


Figura 4. 3 – Representação gráfica da dependência da tensão superficial com a concentração de surfactante, Esquema do comportamento do surfactante em uma interface líquido-gás: moléculas de surfactante adsorvem na superfície ($< \text{CMC}$) e começam a formar micelas no volume quando a superfície é saturada de moléculas ($\geq \text{CMC}$). Adaptada de [98]

Zhang et. al mostrou que as microgotas de alginato produzidas pelo método de focalização hidrodinâmica através da gelificação foi realizada por gotejamento de microgotas de alginato polimerizadas numa solução de calcio em um canal microfluídico. Então foi produzida uma difusão controlada de cálcio. Embora a estrutura dos microgéis de alginato tenha sido controlada variando o tempo de permanência das gotas de alginato nos microcanais, tempos relativamente maiores eram um pré-requisito para a obtenção de microesferas de alginato uniformes, porque a gelificação era criticamente dependente do tempo de difusão [117].

CAPÍTULO 5

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, será apresentado a metodologia e os materiais utilizados para a fabricação dos dispositivos desenvolvidos ao longo do trabalho. O tipo de dispositivo adotado para esta pesquisa foi o dispositivo feito a partir de capilares de vidro, dispositivos estes que possui uma alta monodispersidade em relação aos dispositivos convencionais de emulsificação.

Dispositivos convencionais de emulsificação são baseados na mistura de líquidos imiscíveis com alta tensão de cisalhamento. Estes dispositivos, no entanto, sofrem com a baixa reprodutibilidade do tamanho de gota e não são adequados para geração delas. Recentemente, os dispositivos de emulsificação microfluídica têm atraído muita atenção devido ao seu nível de controle sem precedentes sobre o tamanho e a morfologia das gotas. Utada et al. [67],[94] desenvolveram um dispositivo capilar de vidro coaxiais combinando co-fluxo e focalização hidrodinâmica. A focalização hidrodinâmica em um dispositivo capilar de vidro é uma estratégia útil para minimizar os problemas de umectação encontrados nos dispositivos de focalização hidrodinâmica produzidos em dispositivos feitos em Polidimetilsiloxano (PDMS).

Em dispositivos microfluídicos de capilares de vidro, as gotas podem ser produzidas em dois regimes principais, gotejamento e jateamento, dependendo do equilíbrio entre as forças interfacial, viscosa, inércia e de gravidade [152]. No regime de gotejamento, onde as taxas da fase contínua são baixas, a tensão interfacial domina as forças inerciais e viscosas e as gotas são produzidas perto do canal de injeção [153]. O Jateamento ocorre quando a força viscosa causada pela alta velocidade da fase contínua excede a força interfacial, resultando em um jato de desbaste longo que se divide em pequenas gotas longe do canal de injeção. A transição de gotejamento para jateamento é causada pela alta velocidade da fase dispersa. Os estudos experimentais de geração de gotas em dispositivos capilares de vidro foram focados nos efeitos das taxas da fase contínua, geometria e morfologia do tamanho das gotas [50], [88],[97], [139]–[140] e na transição de gotejamento para jateamento [109].

Primeiramente, na Seção 5.1, é apresentados materiais necessários para a produção dos esferoides e das gotas. Em seguida, na seção 5.2 todos os detalhes da microfabricação

do dispositivo de capilar de vidro são exibidos, utilizando conceitos da fabricação de capilares para emulsões duplas, afim de empregar as premissas das geometrias de co-fluxo e focalização hidrodinâmica.

Na Seção 5.3 o objetivo é mostrar qual a função da fase continua para a aplicação, analisando suas características físico-químicas. Já a seção 5.4 mostra o rendimento da encapsulação de esferoides por gota nessa pesquisa, analisando seus valores e concluindo que mesmo sendo encontrados valores baixos do rendimento, quando comparados a processos convencionais, o trabalho converge com a literatura refletindo em um processo de formação de esferoides encapsulados rápido e de natureza homogênea, este último, fator principal para escolha deste estudo.

5.1 MATERIAIS

5.1.1 PRODUÇÃO DOS ESFEROIDES

As ASC de monocamadas confluentes foram colhidas utilizando tripsina a 0,125% e ácido etilenodiaminotetracético a 0,78 mM (EDTA) (ambos da Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA). As suspensões de células foram centrifugadas a 400 g durante 5 min, e 2×10^6 células em DMEM (suplementadas como descrito abaixo) foram plaqueadas em hidrogel não-adesivo micro-moldado com 81 recessos circulares (2% de agarose - Ultrapure Agarose, Invitrogen, Waltham, MA, EUA - em NaCl a 0,9%), de acordo com as recomendações do fabricante (Microtissue Inc., EUA), e incubadas por 24 h, a 37 ° C (e 5% de CO₂), para a formação de um esferóide em cada recesso circular. Esses esferoides fixados foram obtidos através da colaboração do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

5.1.2 PRODUÇÃO DAS GOTAS

Em nossos experimentos, o alginato de sódio (Sigma- Aldrich), como a corrente interna (Q_{in}), se mistura com o Cloreto de Cálcio (Sigma- Aldrich), que é a corrente intermediária (Q_{mid}), gelificando e formando um hidrogel – denominado de fase continua, na qual quebra-se em microgotas no vão entre os capilares cilindricos. E então, as gotas de hidrogel são cortadas pela fase oleosa externa, que consiste em óleo de milho e Span 80 como o surfactante, denominada de corrente externa (Q_{out}). A formação das emulsões simples foi observada por microscópio digital 3D (Hirox KH-8700, EUA) associado a uma câmera de vídeo digital CCD de 1/1,8 pol., 2,11 Mp.

Os dados experimentais (dados dos diâmetros de bolhas, gotas e micropartículas e o número de esferoides encapsuladas em cada gota) foram obtidos a partir dos vídeos e micrografias capturados pela câmera de vídeo digital CCD.

5.2 MICROFABRICAÇÃO DE DISPOSITIVOS CAPILARES

Das técnicas mais utilizadas para a produção de emulsões, podemos citar as que utilizam dispositivos construídos a partir de tubos capilares de vidro, ou com micro-canais preparados em uma matriz de poli(dimetilsiloxano) (PDMS) ou poli(metacrilato de metila) (PMMA), utilizando técnicas de litografia. O que motiva o desenvolvimento e o aperfeiçoamento destas técnicas são as várias possibilidades de aplicação de emulsões nas mais diversas áreas.

Os microdispositivos capilares de vidro consistem na montagem de tubos capilares coaxiais, onde dois tubos capilares são colocados no interior de outro capilar de secção quadrada.

Na produção de emulsões simples, os fluidos se deslocam no mesmo sentido pelo interior dos canais, de modo que a fase dispersa é conduzida pelo capilar de menor diâmetro. Na saída deste tubo, na região de focalização hidrodinâmica, são então formadas as gotas da emulsão, conforme é mostrado na Figura 5. 1.

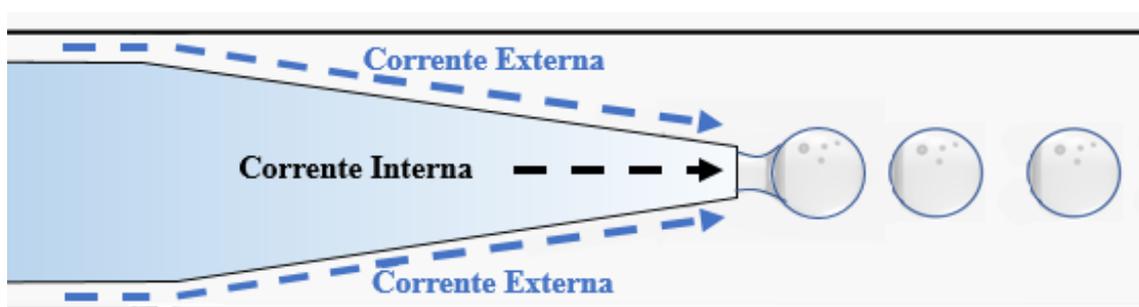


Figura 5. 1 – Dispositivo para obtenção de emulsões simples.

Para a obtenção de emulsões simples (que é o caso explorado neste trabalho), foi fabricado um dispositivo baseado nos dispositivos para produção de emulsões duplas, que combina tanto o co-fluxo como a focalização hidrodinâmica, conforme ilustrado na Figura 5. 2. A razão pela qual foi usado este tipo de dispositivo pode ser explicado por duas razões, a resistência à obstrução do canal através do hidrogel formado anterior a formação da gota; e a formação de microfibras de hidrogel, características encontradas

quando utilizado o dispositivo para formação de emulsões simples (co-fluxo), conforme Figura 5. 1.

No dispositivo usado, o fluido que constitui a corrente interna (Q_{in}) é bombeado através do interior de um dos capilares circulares, o fluido que compõe a corrente intermediária (Q_{mid}) flui através do capilar externo no mesmo sentido (co-fluxo), essas correntes juntas formam a fase dispersa (Q_D) que flui no dispositivo. Enquanto o fluido que forma a corrente externa (Q_{out}) da emulsão, também denominada de fase contínua (Q_C), flui pelo capilar externo, mas na direção oposta aos demais fluidos (focalização hidrodinâmica). Quando os três fluidos entram no capilar de coleta, uma perfeita emulsão é formada, conforme disposto na Figura 5. 2.

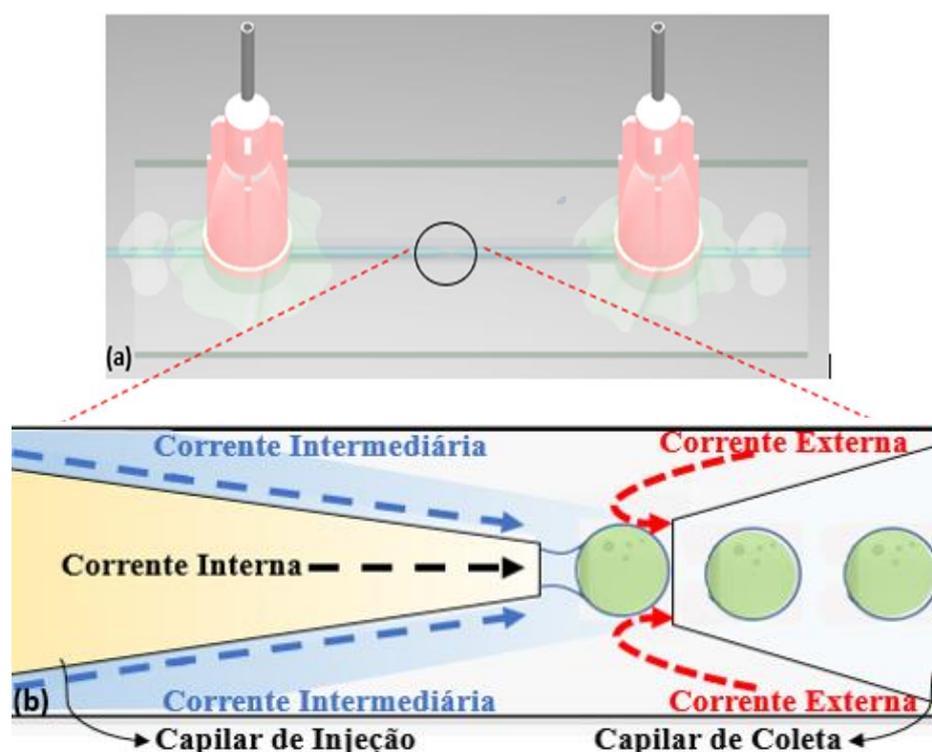


Figura 5. 2 – Ilustração esquemática do dispositivo microfluídico capilar de vidro alinhado para gerar emulsões simples a partir de correntes coaxiais. Dois capilares de vidro cilíndricos cônicos são inseridos em um capilar quadrado, o comprimento do lado interno é aproxima-se do diâmetro externo dos capilares cilíndricos. Tubos de injeção e de coleta são afilados, a fim de garantir o tamanho desejado. A corrente intermediária deve ser imiscível com a corrente interna. (b) Ampliação do setor circulado em (a).

Observando a Figura 5. 2 (b) é visível que o capilar de injeção apresenta um afunilamento do diâmetro médio interno na seção final do microcanal, o que torna menor a área através da qual a corrente interna passar ao longo do microcanal. A mistura entre as correntes interna e intermediária formam a emulsão de hidrogel no espaço entre os capilares de injeção e de coleta. Enquanto que, o capilar de coleta com

seu o diâmetro interno maior do que o capilar de injeção, através da intersecção entre a fase dispersa e a fase contínua resulta no aumento da velocidade de fluxo no espaço entre os capilares e assim, a fase contínua provoca uma tensão de cisalhamento maior na fase dispersa o que favorece a quebra da gota e a consequente formação da emulsão, regulada pela vazão da fase contínua.

O modelo de dispositivo microfluidico utilizado nos experimentos consiste em dois capilares de seção circular dispostos concentricamente no interior de um capilar retangular (de dimensões 1.05 x 1.05 mm). A concentricidade é obtida naturalmente, visto que as dimensões internas do capilar quadrado são próximas as dimensões externas dos capilares cilíndricos, desta maneira, obtemos um bom alinhamento coaxial.. Os três capilares são fixados com cola epóxi (Araldite®) em uma lâmina para microscopia.

É importante lembrar que todo o material de vidro foi devidamente limpo com etanol e pulverizado com ar, uma vez que a limpeza é essencial na microfluídica para evitar problemas de entupimento.

Durante a construção do dispositivo, deve-se preparar um capilar com uma das pontas apresentando um diâmetro menor. Para isso, o capilar interno de injeção foi obtido através de um Extrator de Micropipeta (Microelectrode Puller PUL-1000® - Figura 5. 3), onde sua ponta foi afilada (Figura 5. 4 (a)). O capilar cilíndrico é aquecido por um filamento metálico e puxado por uma força controlada. e em seguida, o tamanho da ponta do capilar foi ajustado (Figura 5. 4 (b)) até o tamanho desejado utilizando lixas de papel e fazendo o controle do diâmetro desejado através da verificação no Microscópio Hirox.



Figura 5. 3 – Extrator de micropipeta utilizado para afilar o diâmetro dos capilares cilíndrico. Este processo é realizado através do aquecimento do filamento metálico e em paralelo suas hastes distendem o capilar com forças controladas [157].

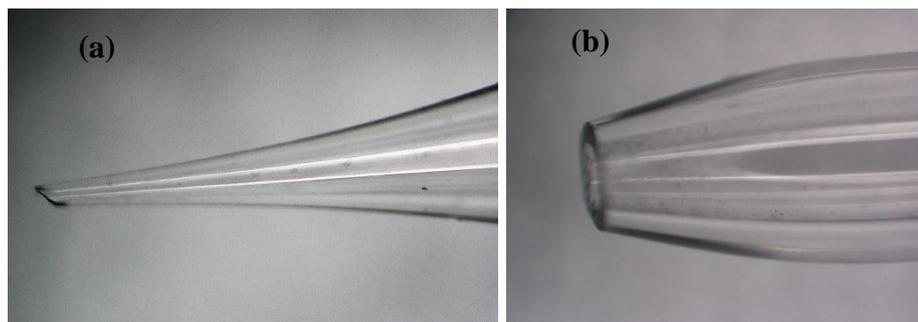


Figura 5. 4 – (a) Capilar cilíndrico após a utilização de um Extrator de Micropipeta, obtendo-se pontas menores do que o diâmetro necessário, normalmente em torno de 10 μm . (b) Ponta modificadas com o diâmetro desejado através de lixa de papel.

Ao montar o dispositivo na lâmina paramicroscopia, os capilares foram separados por uma distância adotada empiricamente entre 1,0 – 1,5 vezes o diâmetro interno do capilar de injeção, afim de reduzir a probabilidade de variação das montagens do dispositivo e conseqüentemente, aumentar a acurácia dos experimentos. Posteriormente, deve-se preparar as agulhas hipodérmicas com canhão de polipropileno que foram fixadas, com cola epóxi, nos capilares para introduzir as três correntes no dispositivo, conforme Figura 5. 5.

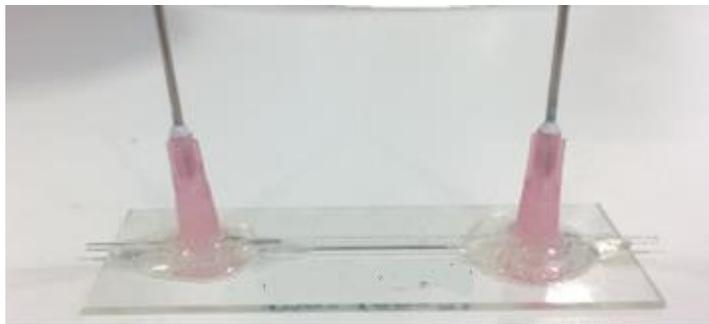


Figura 5. 5 – Montagem final do dispositivo capilar de vidro utilizado para encapsulamento de esferoides, fabricado com diâmetro do capilar de injeção em torno de 330 μm .

Cada agulha e a entrada do capilar cilíndrico a esquerda foram conectadas sua respectiva seringa, preenchida com as correntes informadas anteriormente, com tubo de plástico que eram acionadas por bombas seringas, vide Figura 5.6. Durante o processo de conexão, é extremamente importante garantir que não haja bolhas de ar dentro do dispositivo, isso é feito através de choques mecânicos nas seringas para que todo o ar possa ser mantido próximo ao bico da seringa, obtendo assim uma mistura bifásica, e pressionando o embolo para a retirada dessa fase composta de ar até que se obtenha visualmente, um fluido com característica homogênea. Caso contrário, observa-se uma

instabilidade durante os experimentos, interferindo nas vazões das correntes nas quais possuem bolhas e com isso não há a formação de gotas. Os líquidos das seringas foram bombeados com bombas de alta precisão (NE 1000, New Era Pumping Systems Inc.). A formação de emulsões dentro dos dispositivos microfluídicos foi monitorada usando um microscópio óptico. A Figura 5. 6 mostra a aparência da montagem experimental. Para melhor entendimento, os itens sumarizados para a construção deste dispositivo foram relacionados na Tabela 5. 1.

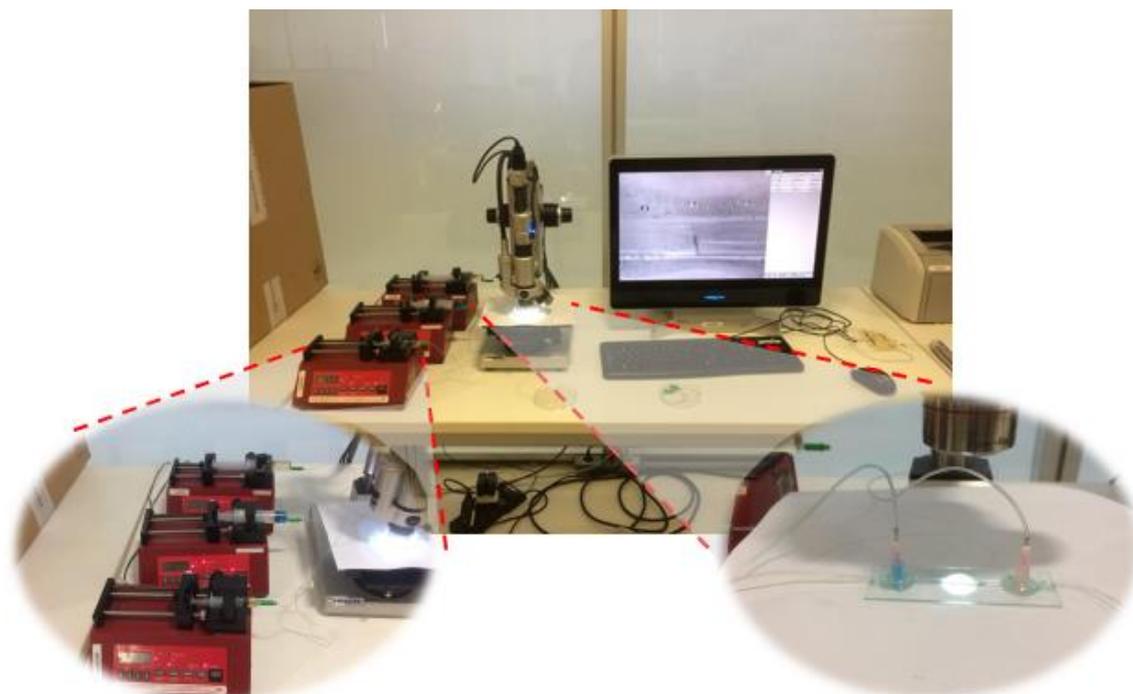


Figura 5. 6 – Aparência da montagem experimental. O dispositivo microfluídicos é colocado sobre a platina do microscópio. As agulhas são conectadas às seringas, colocadas nas bombas, através de mangueiras de borracha. Os registros são realizados através da câmera acoplada no microscópio.

Tabela 5. 1 – Lista de materiais utilizados na construção do dispositivo.

Qtd	Descrição Material	Medidas	Unid.	Fabricante
1	Capilar quadrado	150 x 1,05 x 1,5 (L x W x H)	mm	Vitrocom company
1	Capilar cilíndrico	150 x 1,0 x 0,58 (L x OD x ID)	mm	WPI
1	Lâminas para microscopia	76,2 x 25,4 x 1,0 (L x W x H)	mm	Exacta
2	Agulhas Hipodérmicas	40 x 1,2 x 1,2 (L x W x H)	mm	Descarpack
3	Seringa	20	mL	Descarpack
3	Bombas seringas - NE 300	228,6 x 146,05 x 114,3 (L x W x H)	mm	Syringe Pump
1	Cola Epóxi	16	g	Araldite
4	Sonda de aspiração traquial n° 4	300 x 4 (L x OD)	mm	Markmed
1	Placa de petri	80 x 15 (OD x H)	mm	Firstlab

5.3 FORMAÇÃO DE GOTAS EM MICROFLUÍDICA

O efeito da quebra e o formato das gotas em microcanais foram avaliados em função do tipo de óleo empregado na fase contínua usando os sistemas de capilares de vidro combinando co-fluxo com focalização hidrodinâmica.

Neste estudo, foram investigados o uso de óleo de soja e óleo de milho como fase contínua, o primeiro por ter um custo mais viável e mais disponível para aquisição e o segundo por ser estatisticamente mais empregado em estudos de microfluídica na literatura [124], [153], [158], [159]. É importante ressaltar que células encapsuladas permanecem viáveis durante longos períodos de tempo em gotas [160] devido à utilização de óleos, que podem dissolver ~ 20 vezes mais oxigênio do que a água[161]. Estes óleos, sendo ambos hidrofóbicos e lipofóbicos, são solventes muito pobres para moléculas orgânicas [162] e são assim especialmente bem adequados para ensaios baseados em células e ensaios bioquímicos [163].

As características do óleo que compõe a fase contínua são relevantes num processo de emulsão em microcanais, uma vez que pode influenciar na forma e estabilidade das gotas [1]. Considerando que a quebra de gotas em microcanais microfluídicos está relacionada com as propriedades da fase contínua, nós investigamos a geração de gotas por óleo de milho. O óleo de milho tem sido usado na geração de gotas em microfluídica, uma vez que é compatível com diferentes tensoativos e tem custo acessível[124], [164].

Por se tratar de um sistema baseado em emulsão, a composição e as propriedades físico-químicas da fase contínua são relevantes no processo de geração e na estabilidade das gotas formadas. Com base nisso, a fase contínua, sendo esta o óleo de milho, foi consultado em literaturas [124], [153], [158], [159] quanto às propriedades de densidade, viscosidade e tensão interfacial, considerando a água como fase dispersa de uma emulsão.

Tabela 5. 2 – Propriedades físico-químicas dos óleos de milho e de soja [165].

Propriedade do óleo	Tipo de Óleo	
	Óleo de milho	Óleo de soja
Massa Específica (kg/m³)	915,3 ± 0,7	915,7 ± 0,7
Tensão interfacial (mN/m)	31,6 ± 0,1	31,3 ± 0,4
Viscosidade (mPa·m)	59,2 ± 0,8	57,1 ± 1,1

A viscosidade e tensão interfacial entre as soluções de fase contínua e dispersa se tornam importantes em um sistema operando em pequena escala, como a microfluídica [101], pois a relação área/volume é bem maior que a normalmente encontrada na macroescala. Num sistema em que a viscosidade da fase contínua é muito maior que da fase dispersa, a pressão interna do sistema aumenta e a interfere no tamanho das gotas [166], [167].

A viscosidade da fase contínua está relacionada à tensão de cisalhamento que o fluido exerce sobre a fase dispersa. A redução da tensão interfacial entre a fase contínua e dispersa pela adição de tensoativos facilita o processo de quebra de gotas nos microcanais e impede a coalescência entre as gotas, garantindo também a estabilidade da emulsão [139], [160].

5.4 BIOENCAPSULAÇÃO EM DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS

Embora os esferoides cheguem aleatoriamente à região de formação de gotas, ainda é possível estimar probabilisticamente a proporção de esferoides encapsulados de acordo com a distribuição de Poisson, que é aplicável no caso em que a taxa média de chegada celular é conhecida, a taxa de chegada facilmente mensurável (a partir da concentração de esferoides na solução de alimentação), e a chegada individual de esferoides ocorre independentemente de outros esferoides.

Mazutis et. al. [163] apresentou um protocolo detalhado para o uso de microfluídica baseada em gotas para o isolamento de alto rendimento de células secretoras de anticorpos individuais a partir de um grande excesso de células não secretoras. Os princípios e métodos descritos por Mazutis et. al. podem ser adaptados para muitas aplicações, para analisar uma ampla gama de células incluindo bactérias, esferoides, levedura, inseto e células de mamíferos.

O encapsulamento celular é realizado de forma que a maioria das gotas não contenha mais de um esferoide. Embora este protocolo resulta na formação de algumas gotas de vazios e algumas gotas contendo dois esferoides ou mais, o rendimento permanece elevado em comparação com a taxa de técnicas convencionais, no qual a análise é realizada a ~ 1 esferoide por segundo (1 Hz) [168].

No processo de bioencapsulação por microfluídica, a concentração inicial celular foi determinada usando a distribuição de Poisson; que indica a probabilidade (P) para

encontrar X número de células por gota (λ), com a base do número de eventos esperados (x). Assim, esta probabilidade é dada pela equação de seguimento [163]:

$$P (X = x) = \frac{e^{-\lambda} \times \lambda^x}{x!} \quad \text{Equação 5-1}$$

Para um melhor entendimento, Matuzis et al. [163] utilizou o valor de $\lambda = 0,3$ para encapsular esferoides em gotas de 50-pl, os esferoides foram preparados a uma densidade de 6×10^6 esferoides por ml. Considerando que o processo de encapsulamento é completamente aleatório, esta escolha de densidade celular resultou em 74,08% da gota contendo nenhum esferoide, 22,22% contendo um único esferoide, 3,3% contendo dois esferoides e 0,38% contendo mais de dois esferoides. Seguindo a mesma abordagem, podemos estimar o número de esferoides por gota. Se pretendermos obter um número médio de esferoides por gota, por exemplo, uma média de um esferoide por gota de 50 pl ($\lambda = 1,0$), precisamos preparar uma mistura contendo $\sim 5 \times 10^7$ esferoides por ml.

Para este estudo, a densidade celular utilizada foi de $2,0 \times 10^6$ esferoides por mL, contendo uma mistura de alginato que é emulsionada com CaCl_2 em gotas monodispersas. Descobrimos que essa densidade celular resulta em 8,38% das gotas geradas transportando esferoides individuais, enquanto a maioria das gotas (92,75%) permanece vazia. O número de gotas nas quais mais de uma célula é encapsulada é pequeno e está de acordo com o número esperado da distribuição de Poisson, conforme ilustrado na Figura 5. 7 [137]. Mesmo encontrando valores baixos para o encapsulamento de um esferoides, esses valores são plausíveis em relação a literatura [137], [163], [165], [169], [170].

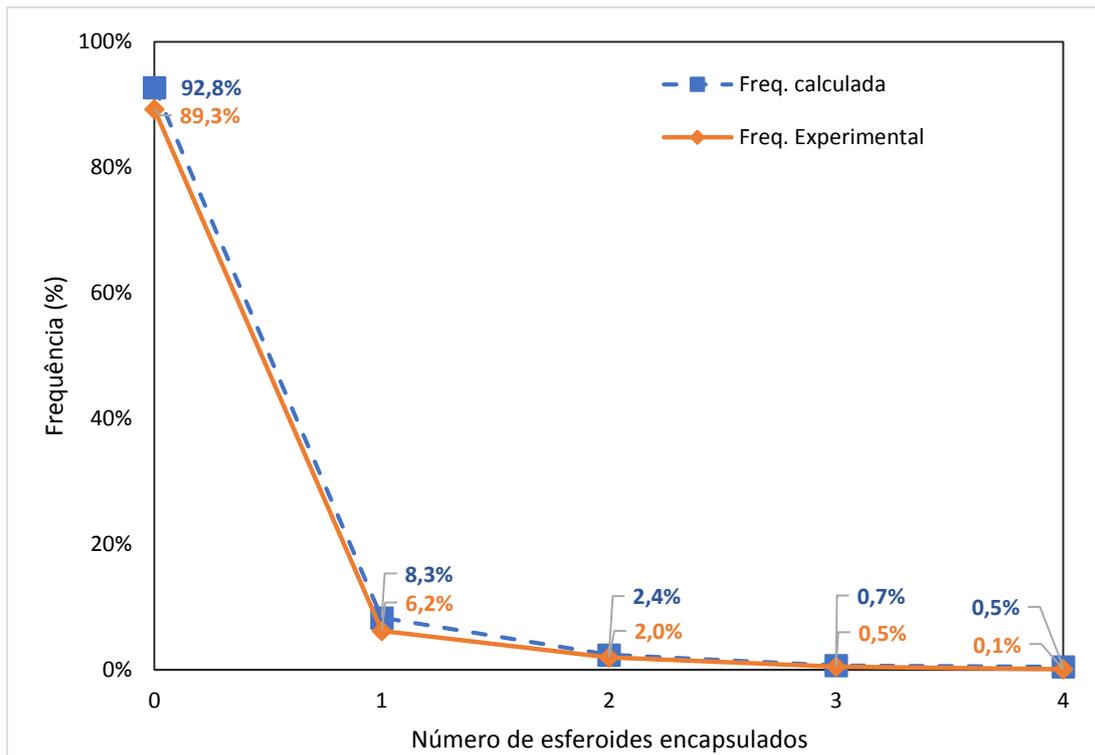


Figura 5. 7 – O processo de encapsulamento segue a distribuição de Poisson e resulta em aproximadamente 8% de gotas contendo um esferoide encapsulado.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento da microfluídica, especificamente a microfluídica de gotas, levou a muitas descobertas interessantes, e o número de estudos publicados que a exploram está aumentando constantemente a cada ano de todas as tecnologias disponíveis [160]–[164]. Microfluídica baseada em gota é uma das abordagens mais poderosa para estudar o comportamento funcional de esferoides. As dimensões dos micropoços tradicionalmente usados para cultura de esferoides (placas de 384 poços) são muito grandes, fazendo com que todos os metabólitos secretados sejam altamente diluídos e tornando impraticável a detecção deles por técnicas convencionais.

A microfluídica baseada em gotas permite o encapsulamento e a ativação de esferoides em alta produtividade e também garante que os metabólitos solúveis secretados sejam confinados em um volume relativamente pequeno, o que permite uma grande redução no ruído e, assim, aumentando a sensibilidade da técnica. Um dos principais obstáculos que dificultam a rápida progressão neste campo foi, por muitos anos, a incapacidade de realizar etapas de lavagem dentro de gotas, o que é crucial para muitos protocolos biológicos [155]. Várias soluções para este problema foram sugeridas, incluindo o uso de agarose e hidrogéis de baixa temperatura de fusão [53],[156]. A introdução de hidrogéis e sua lavagem certamente melhorou as perspectivas de uso de microfluídica de gotículas [156].

Além disso, a possibilidade de manipular as gotas contendo células por meio de triagem, divisão e fusão também permitirá relacionar as características funcionais dos esferoides isolados e o efeito dessas características na ativação dos esferoides encapsulados. Dessa maneira, é possível estudar como a heterogeneidade celular afeta a comunicação entre esferoides e a tomada de decisão celular.

Atualmente, a manipulação de gotas (contendo esferoides) requer uma configuração relativamente complexa e envolve o uso sequencial de vários módulos diferentes, o que torna difícil gerar condutas experimentais resistentes. Além disso, a microfluídica baseada em gotas ainda depende principalmente de ferramentas convencionais de medição de 'ponto final', o que significa que as gotas geradas devem

ser compatíveis, por exemplo, com relação ao tamanho e composição, com essas ferramentas de medição.

Neste capítulo, as ferramentas desenvolvidas ao longo do trabalho foram empregadas na análise experimental da formação de gotas através do dispositivo microfluídico de capilares de vidro e a encapsulação de esferoides feitas por microgotas de alginato. Primeiramente, a Seção 6.1, mostra o efeito da configuração dos capilares na produção das gotas, onde a variação do diâmetro do capilar de coleta auxilia na formação dessas gotas.

Em seguida, a seção 6.2 avalia a formação das gotas é investigada a partir do efeito da fase contínua em relação a fase dispersa, visando o desenvolvimento da gota em função das vazões utilizadas na pesquisa, permitindo demonstrar a aplicação da metodologia de solução introduzida neste trabalho em uma situação prática. Nesta seção será detalhado os tipos de regime de escoamento encontrados com / sem a inserção de surfactante na fase contínua. E finalmente serão apresentados as avaliações de monodispersidade das gotas geradas para as principais vazões utilizadas neste experimento. Além da comparação morfológica e dos tamanhos da gotas geradas dentro do canal e o seu comportamento fora do dispositivo.

Na Seção 6.3 o objetivo é a examinar a eficácia do método de gelificação aplicada ao experimento. Esta etapa da pesquisa incluiu a investigação da variação das concentrações das corrente que formam a fase dispersa. As seções 6.4 e 6.5 expõem os efeitos gerados pela viscosidade na fase e a utilização do surfactante na fase contínua, respectivamente.

Na seção 6.6 tem como propósito avaliar a estabilidade das gotas em relação a concentração de surfactante na fase contínua, expondo que a concentração de surfactante está diretamente relacionada ao tempo de estabilidade da gota. E por fim, a seção 6.7 trata do encapsamento dos esferoides, apresentando as etapas para este processo e exibindo seus resultados.

6.1 CONFIGURAÇÃO DOS MICROCANAIS PARA PRODUÇÃO DE MICROGOTAS

Apesar da produção homogênea das micropartículas de alginato pelo método de gelificação do tipo externa, observamos que a estrutura dos microcanais poderia estar afetando o tamanho das microgotas, as gotas geradas estavam maiores do que o desejado. Isso ocorria devido o diâmetro do capilar de coleta que auxilia na geração gotas por isso, foi realizada a diminuição no diâmetro do capilar de coleta a fim de melhorar o tamanho e formato das microgotas. Nos experimentos iniciais, era utilizado o capilar cilíndrico reto no seu diâmetro original (Figura 6. 1 A) e realizando os experimentos, era visível que o tamanho das gotas, tinham seu diâmetro médio variando entre 600 μm e 800 μm , e esses valores não estava no tamanho desejado – diâmetro médio próximo do tamanho dos esferóides em torno de 400 μm . Afim de otimizar o tamanho e o volume da gota, reduzimos o diâmetro do capilar cilíndrico (Figura 6. 1 B). Para melhor entendimento, a Tabela 6. 1 mostra os valores dos diâmetros interno e externo nas configurações inicial e após a modificação descrita acima. Esta nova configuração no dispositivo microfluídico mostrou-se eficiente para a geração de gotas e conseqüentemente, para produção de microgotas de alginato para encapsulação de esferóides, estas alterações podem ser vistas na Figura 6. 2, que correlaciona o tamanho médio da gota para as configurações dos capilares mencionada neste item. Com o intuito de catalogar algumas hipóteses adotadas para o estudo, alguns casos estudados foram descritos na Tabela 6.2.

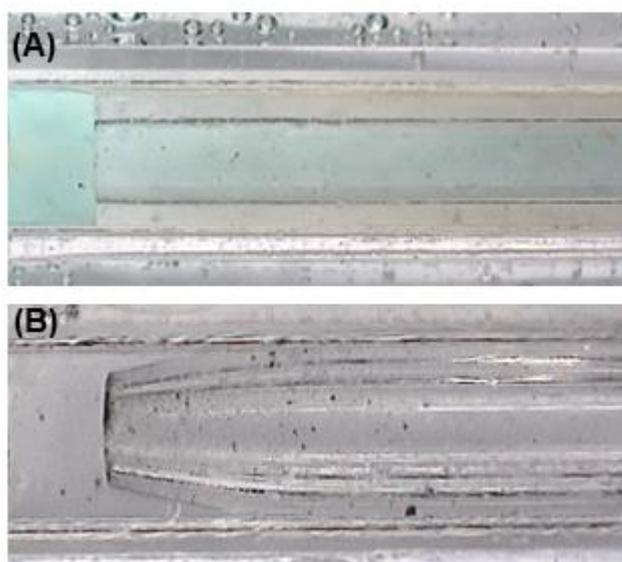


Figura 6. 1 – (A) Capilar Cilíndrico reto em sua configuração original. (B) Capilar cilíndrico após a redução do seu diâmetro para aperfeiçoamento do tamanho da Gota.

Tabela 6. 1 – Valores encontrados dos diâmetros dos capilares cilíndricos nas configurações inicial e após modificação.

	Capilar Reto	Capilar Afunilado
Diam. int.	580 μm	380 $\mu\text{m} \pm 5.2$
Diam. ext.	1 mm	548 $\mu\text{m} \pm 7.3$

Tabela 6. 2 – Casos estudados para avaliação do tamanho médio da gota gerada em função das configurações do capilar cilíndrico.

Casos	Corrente interna (Q _{in}) – mL/h	Corrente intermediária (Q _{mid}) – mL/h	Fase dispersa (Q _{out}) – mL/h
1	3.5	3.5	6.5
2	3.5	3.5	7
3	4	4	6
4	4	4	6.5
5	4	4	8
6	3.5	4.5	6

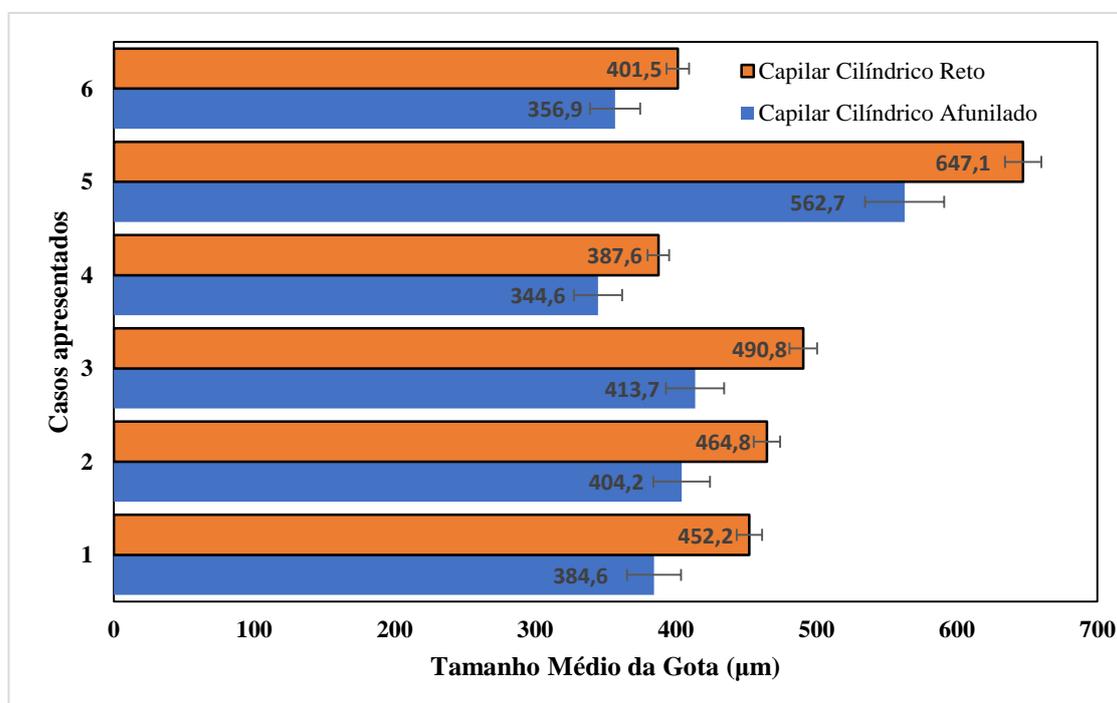


Figura 6. 2 – Comparação entre o tamanho médio da gota produzida para os casos apresentados na Tabela 6.2.

Analisando a Figura 6.2 nota-se que o tamanho das gotas aumenta com o aumento da taxa de fluxo da fase contínua (Q_{out}) – Casos 1 e 2. Com o aumento da taxa de fluxo da corrente intermediária, o tamanho das gotas aquosas permanece aproximadamente o mesmo. Isso ocorre porque a taxa de fluxo da corrente Q_{mid} é insignificante em comparação com a taxa de fluxo da fase dispersa (Q_{out}). Além disso, a quebra das gotas é determinada principalmente pelo equilíbrio entre a interface tensão e força de cisalhamento viscosa, e as taxas de fluxo da fase intermediária tem pouca influência na balança. O tamanho da gota aumenta com o aumento da taxa de fluxo da fase dispersa e diminui com o aumento da taxa de fluxo da fase contínua. Isto é também devido aos efeitos da fase intermediária e do fluxo de fase externa sobre a pressão de Laplace e os efeitos da fase externa na força de cisalhamento viscosa, conforme será detalhado nas seções a seguir. Além disso, é visto que o tamanho médio das gotas diminuem com a diminuição do diâmetro do capilar de coleta.

6.2 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE GOTAS EM MICROCANAIS MICROFLUÍDICOS

6.2.1 EFEITO DA FASE CONTÍNUA

Para analisar o processo de formação de gotas usando óleo de milho como fase contínua, foi usado a solução aquosa de Cloreto de Cálcio como fase dispersa – corrente intermediária (Q_{mid}), e também, a solução aquosa de Alginato – a corrente interna (Q_{in}), a primeira flui tangenciando a superfície externa do capilar de injeção, enquanto que a segunda transcorre internamente pelo capilar de injeção, conforme Figura 6.3. É importante ressaltar que essas correntes só se misturam no momento da formação da gota. A capacidade da fase contínua em romper a fase dispersa em gotas foi avaliada em função da razão (R) entre as taxas das vazões das corrente que compõem a fase dispersa ($Q_{mid} + Q_{in}$) e a fase contínua (Q_{out}), sendo exploradas faixas de vazões entre 2,5 a 7,5 mL h⁻¹ para Q_{mid} e Q_{in} e entre 6,5 e 15 mL h⁻¹ para Q_{out} , a escolha das vazões e o procedimento adotado se deu através de estudos comparativos a literatura [151], [155], [156]. O procedimento adotado foi variar as vazões das fases dispersa e contínua até que obtivesse a formação das gotas. Essa formação foi observada usando um microscópio digital 3D (Hirox KH-8700, EUA) associado a uma câmera digital CCD de 1/1,8 pol., 2,11 Mp. Os casos gerados a partir das variações das vazões serão melhor descritos na seção 6.2, e para análise da influência do óleo de milho como fase contínua para geração de gotas não foi adotado a utilização, neste momento inicial, de surfactante, pois o objetivo era encontrar as vazões

necessárias para a interação entre as fases e a consequente geração de gotas monodispersas.

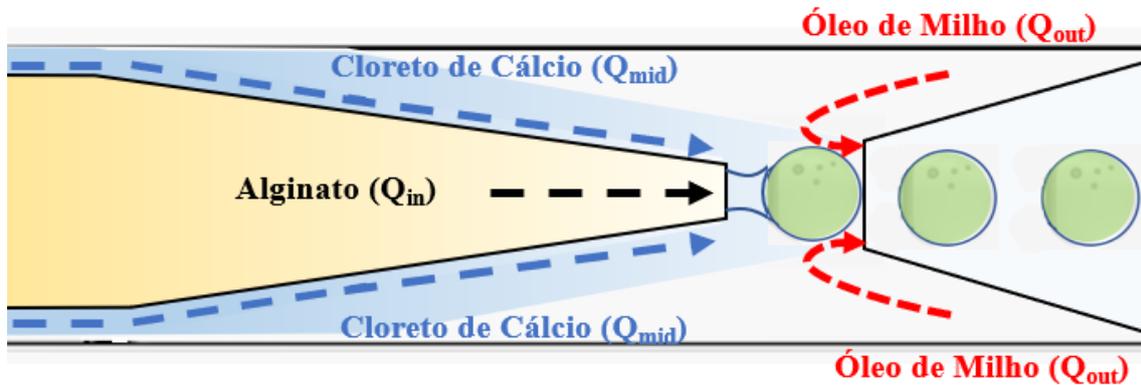


Figura 6. 3 – Ilustração esquemática das correntes internas (Q_{in}) e intermediárias (Q_{mid}) que compõem a fase dispersa e a corrente externa (Q_{out}) que compõe a fase contínua.

Realizando uma análise visual da Figura 6.4, do ponto de vista da monodispersidade das gotas, nota-se que as gotas geradas pelos sistemas com óleo de milho apresentaram formatos semelhantes, sendo um fator fundamental para o estudo.



Figura 6. 4 – Forma de quebra das gotas usando microfluídica em capilares de vidro: formato de gotas geradas com óleo de milho como fase contínua. Nas correntes das fases dispersas foram utilizadas correntes aquosas de alginato a 1% (m/v) e de cloreto de cálcio 15 mM, caracterizando uma gelificação externa do alginato.

6.2.2 REGIME DE FORMAÇÃO DE GOTAS E CONDIÇÕES DE ESCOAMENTO

A combinação entre a relação de vazões das fases contínua e dispersa, a geometria e razão entre as larguras de microcanais resultam num processo dinâmico em que as gotas apresentam formatos que variam até que haja a produção de gotas numa condição estável. A característica do regime de geração de gotas compreende em regimes de *dripping*

(gotejamento) – Figura 6.5(A) – que formam gotas esféricas e o perfil de jateamento – Figura 6.5 (B), além das condições em que não se observa a formação de gotas [158], [162].

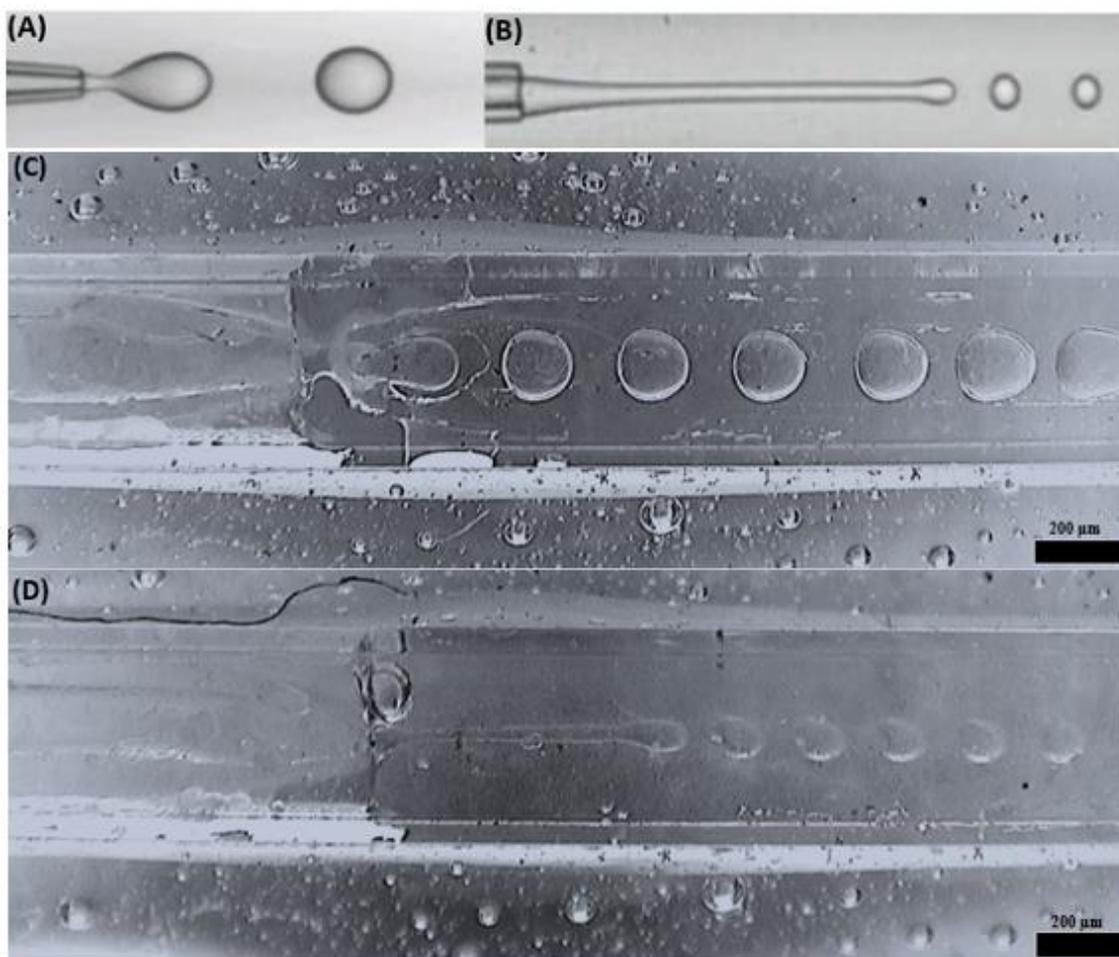


Figura 6. 5 – Desenho esquemático do regime de geração de gotas: (A) gotejamento; (B) Jateamento. Adaptado de [105]. Imagens do regime de geração de gotas obtidas através do experimento: (C) gotejamento; (D) Jateamento. .

O equilíbrio entre as forças viscosas e interfaciais com a pressão interna das gotas levam a esta dinâmica de formação de gotas, dado pela faixa de $0,01 < Ca < 1$ [127], [158]. No caso em que há o predomínio da tensão interfacial sob as forças viscosas, $Ca < 1$, as gotas apresentam formatos mais esféricas e tamanhos menores. Nestas circunstâncias, se $Ca < 0,01$, a pressão interna da gota é que domina o corte das gotas. Por outro lado, se as forças viscosas são altamente significativas, $Ca > 1$, causam grandes deformações às gotas e em formas assimétricas [127], [158]. Outro fator importante a ser considerado é a vazão da fase contínua, que atua nas forças viscosas, e que pode influenciar tanto no comportamento dos fluxos, como na forma de quebra e tamanho das gotas.

O regime de Jateamento pode ser considerado como um regime de instabilidade convectiva para a instabilidade absoluta para fluxos em baixos números de Reynolds [163] e é afetada pelo número capilar, grau de confinamento e razão de viscosidade ambas as fases [163], [164]. Além do regime de gotejamento ser um regime controlado por geometria para a formação de gotículas em baixos números capilares[165]. A partir dos aprofundamentos na literatura, e pelas razões acima descrita, este trabalho será direcionado ao regime de gotejamento.

Neste estudo, o regime de formação de gotas em capilares de vidro de foi avaliado usando alginato e cloreto de sódio na fase dispersa. A dinâmica das gotas foi observada com a combinação das geometrias de focalização hidrodinâmica e co-fluxo. O estudo de formação de gotas nestes sistemas foi realizado com óleo de milho, o qual apresenta maior viscosidade em relação à fase dispersa. O regime de formação de gotas no sistema foi investigado em função da razão entre vazões (R), o somatório das vazões das correntes Q_{in} e Q_{mid} que resultam na fase dispersa (Q_D), pela vazão Q_{out} que corresponde a vazão da fase contínua (Q_C), como mostrado na Figura 6. 7 , ou seja:

$$R = \frac{Q_D}{Q_C} = \frac{Q_{in} + Q_{mid}}{Q_{out}} \quad \text{Equação 6-1}$$

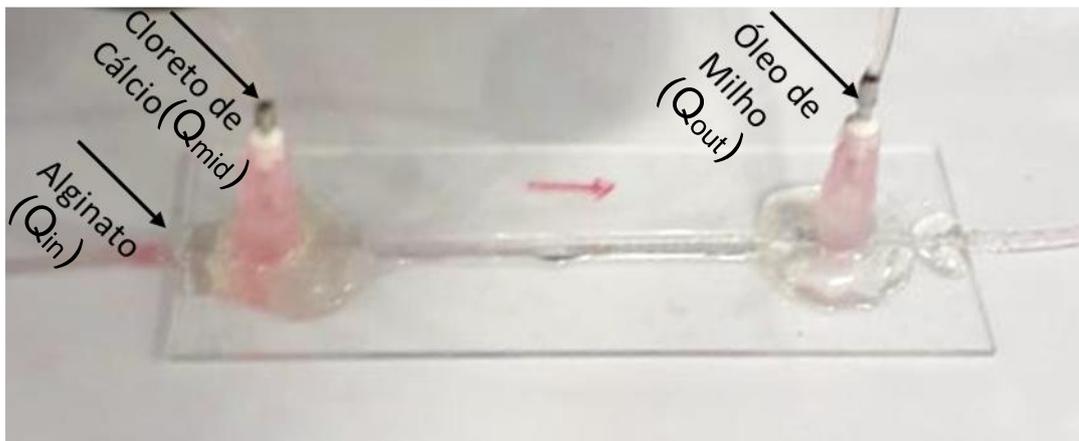


Figura 6. 6– Design dos sistemas microfluídicos para formação de gotas, sistema por focalização hidrodinâmica e co-fluxo.

Na Figura 6. 7 , nota-se que nas condições iniciais deste estudo, onde não há utilização de surfactante, a formação de gotas se iniciou quando o somatório das vazões das fases contínuas se igualou ou superou a dispersa $\Sigma Q_D > Q_C$, sendo geradas gotas

estáveis (*dripping*). Entretanto, quando a vazão da fase contínua (Q_{out}) está entre 7 e 15 mLh^{-1} e sua razão é inferior a 1, são geradas gotas de tamanhos maiores e instáveis (*squeezing*), conforme Figura 6. 8. À medida que houve o aumento da vazão da fase contínua, o sistema gerou gotas estáveis (*dripping*). Além disso, numa condição de $QC \gg QD$ ou $QD \gg QC$ são obtidos valores extremos de razões, $R < 0,5$ e $R \geq 2$, e não ocorre o processo de quebra de gotas. Após o estudo dos diversos arranjos apresentados na Figura 6.4, serão analisados seis casos onde foi encontrado o regime de gotejamento, os resultados serão resumidos a seguir na Tabela 6.3. Os tamanhos das gotas foram caracterizados a partir da avaliação do tamanho das gotas geradas, no qual seus diâmetros foram mensurados através do microscópio óptico 3D Hirox, onde foi avaliado um espaço amostral de 120 microgotas para cada relação obtida entre as correntes interna, intermediária e externa aferidas.

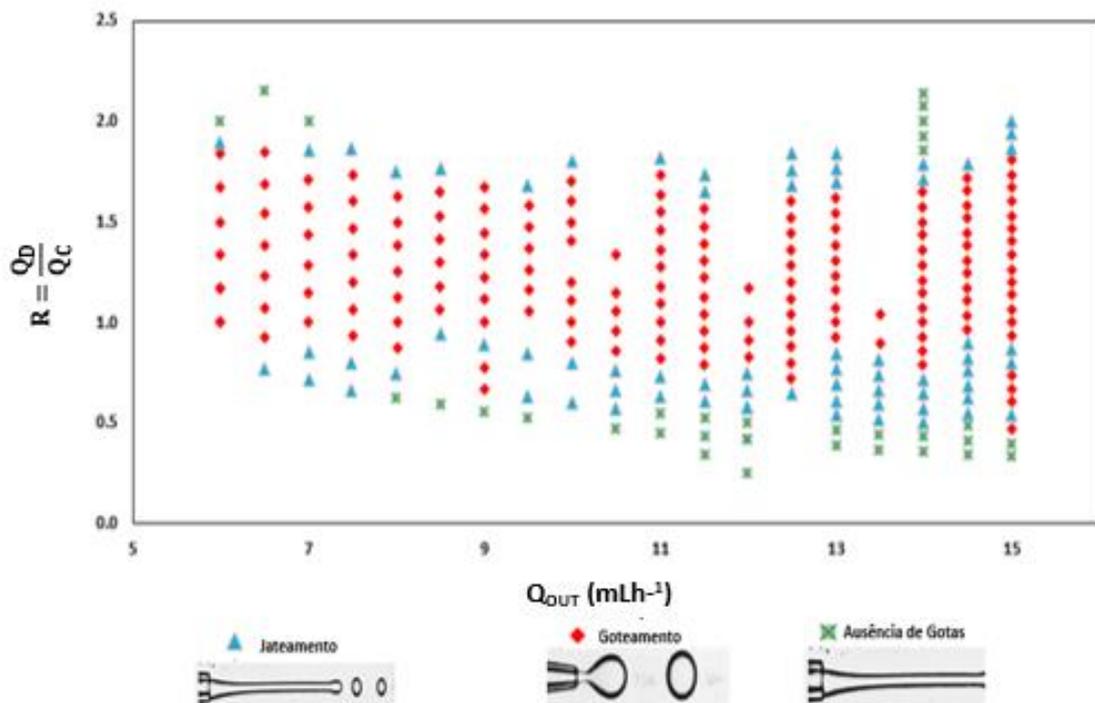


Figura 6. 7 – Formação de gotas em função da razão de taxas de fluxo ($R = Q_C/Q_D$) e da vazão da fase contínua (Q_{OUT}). Na fase contínua foi usado óleo de milho e na dispersa, soluções aquosa de alginato e cloreto de cálcio originando um hidrogel.

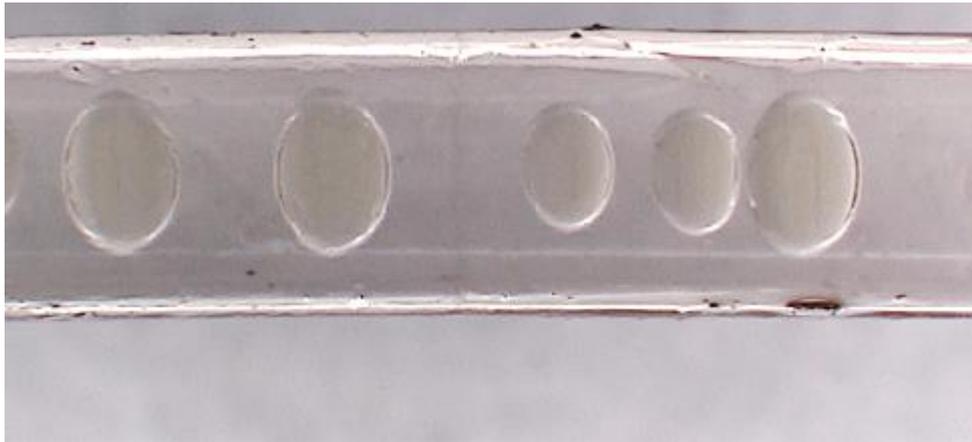


Figura 6. 8 - Gotas de tamanhos maiores e instáveis.

Os mecanismos de gotejamento e jateamento estão intimamente relacionados, e a transição entre eles é induzida pela variação da vazão do fluido externo Q_{out} . A figura Figura 6. 9 mostra a relação entre a razão do raio da gota gerada, R_{drop} , pelo raio do capilar de injeção, $R_{cap\ inj}$, e a razão da fases dispersas (Q_D) pela fase contínua (Q_C). O raio das gotas, R_{drop} , diminui linearmente com Q_{out} (Figura 6. 9, losangos azuis). No entanto, aumentar a Q_{out} faz com que o jato aumente abruptamente, significando a transição para o regime de jateamento; isso resulta em uma descontinuidade na $R_{drop}/R_{cap\ inj}$ (Figura 6. 9 , círculos laranjas).

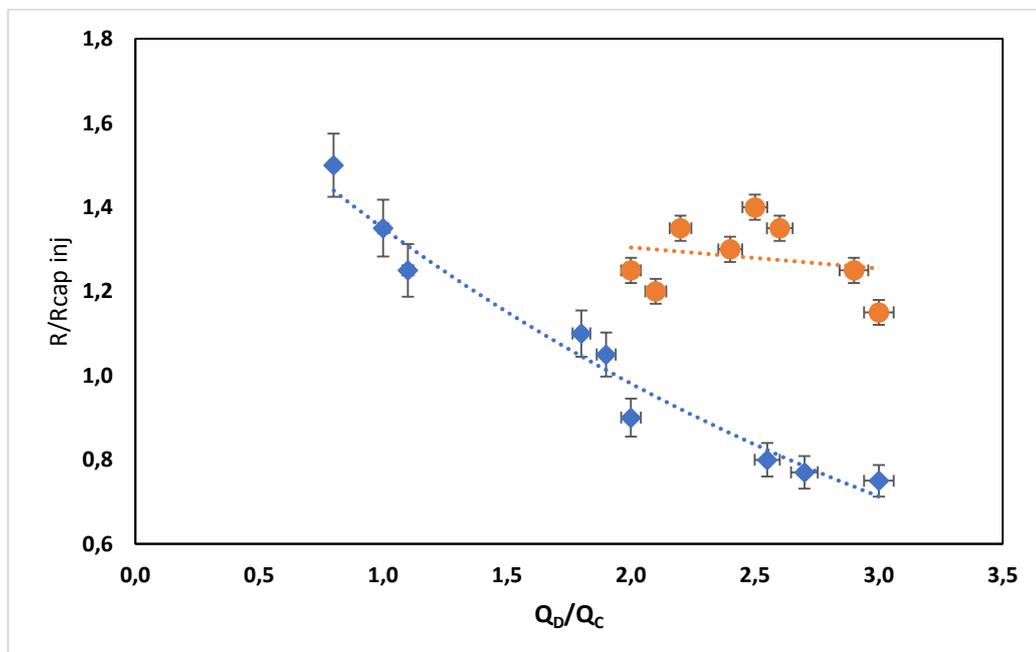


Figura 6. 9 – Razão entre raio da gota pelo raio do capilar de injeção versus a razão das fases de fluxo. Os losangos azuis representam o diâmetro da gota no regime de gotejamento. Círculos laranjas representam o diâmetro da gota no regime de jateamento. A linha tracejada azul representa a linha de

tendência do tamanho da gota no regime de gotejamento, e a linha tracejada laranja o tamanho da gota no regime de jateamento.

Tabela 6. 3 – Casos estudados para avaliação entre as fases dispersa (Q_{out}) e contínuas (Q_{in} e Q_{mid}) correlacionando com o tamanho médio da gota gerada.

Casos	Corrente interna (Q_{in}) – mL/h	Corrente intermediária (Q_{mid}) – mL/h	Fase dispersa (Q_{out}) – mL/h	Razão entre fases $\frac{(Q_{in}+Q_{mid})}{Q_{out}}$	Tamanho médio da gota (μm)	Coefficiente de Variação (CV)
1	3.5	3.5	6.5	1.1	404.18	13.70%
2	3.5	3.5	7	1.0	384.55	15.50%
3	4	4	6	1.3	413.7	17.80%
4	4	4	6.5	1.2	344.6	9.0%
5	4	4	8	1.0	562.72	14.90%
6	3.5	4.5	6	1.3	356.86	8.80%

Como mostrado na Tabela 6.3 e na Figura 6. 10, o coeficiente de variação aumenta com a diminuição razão entre as fases dispersas e contínua. Além disso, quando comparamos casos que possuem as mesmas vazões nas fases dispersas é visto que o aumento da taxa de fluxo da fase contínua (Q_{out}) diminui o tamanho da gota, Casos 1 e 2. O tamanho da gota aumenta com o aumento da taxa de fluxo da fase dispersa e diminui com a aumento da taxa de fluxo da fase contínua.

Desta forma, a geometria de capilares de vidro possui uma razão mais próxima de 1 entre as vazões das fases contínua e dispersa, estabilizando seu fluxo, e apresentando um perfil de geração de gotas mais estável. Após a análise dos ensaios, exibidas na Figura 6. 7, foi possível observar que a região de formação de gotas estáveis possui valores da razão entre as fase contínuas e dispersas no intervalo entre 1.1 e 1.7. E analisando os principais casos estudados que estão expostos na Figura 6. 10, é possível visualizar e admitir que os casos 4 e 6 respectivamente, por possuírem vazões das correntes interna (4 / 3.5 mL/h), intermediária (4 / 4.5 mL/h) e externa (6.5 / 6 mL/h) e razão entre fases (1.2 / 1.3) aproximadamente semelhantes, são casos ótimos para seguir com o estudo. Uma característica importante de ressaltar também nesta análise é a menor polidispersidade dos casos 4 e 6 quando comparados aos demais casos, sendo gerado gotas com tamanho médio 344.6 e $356.86 \pm 3.97 \mu\text{m}$ com polidispersidade maior do que a esperada (mas ainda inferior a 5%), indicados por um coeficiente de variação (CV) igual a 9,0 e 8,84%, como mostra a Figura 6. 11 (A).

Embora os casos 4 e 6 sejam semelhantes, para seguir com o estudo foi adotado o caso 4, por possuir numericamente valores de tamanho de gota menor do que os outros casos.

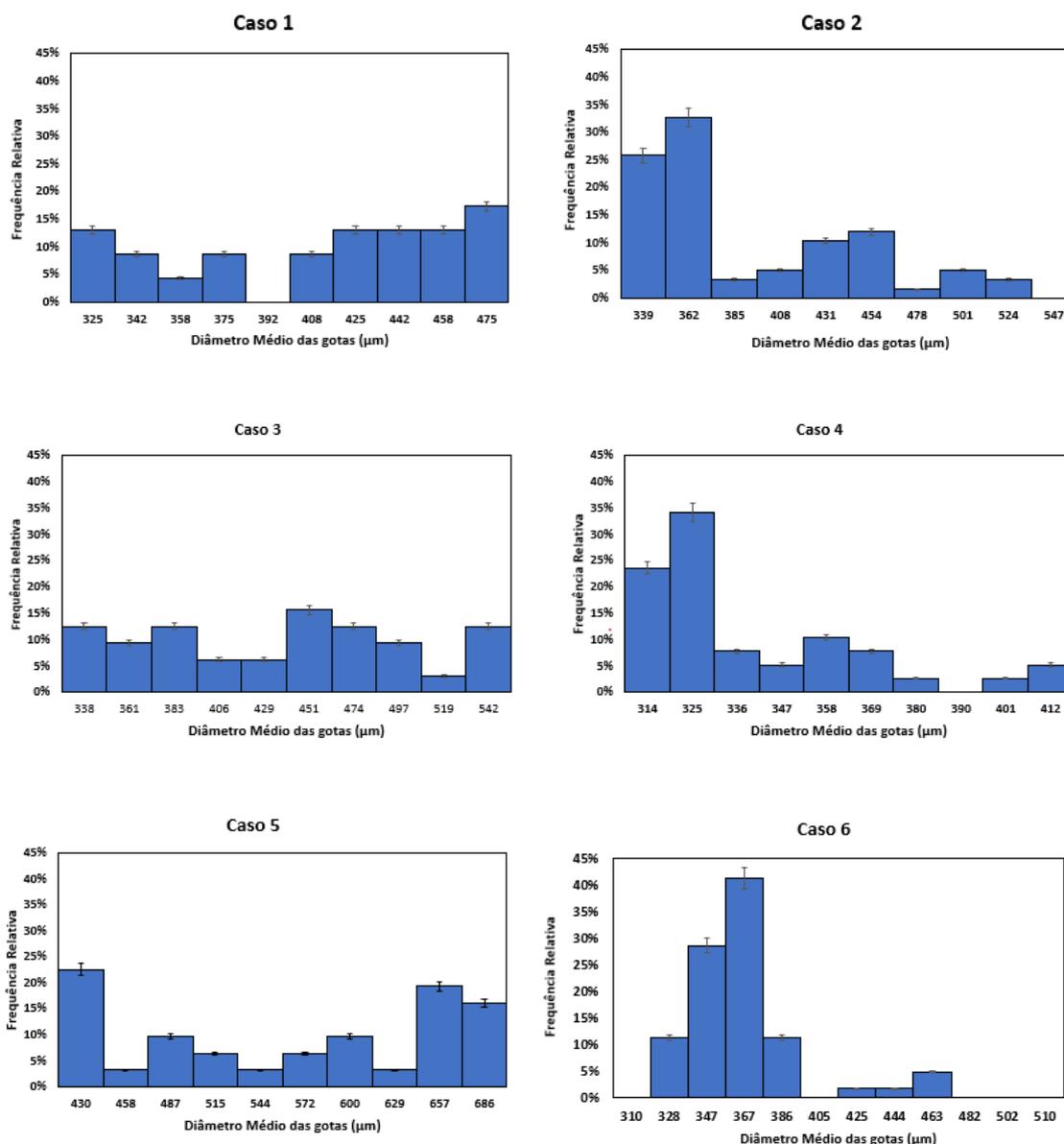


Figura 6. 10 – Distribuição de tamanho das microgotas para cada um dos casos apresentados na Tabela 6.1.

Um fator que possibilita essa polidispersidade alta é flutuação das vazões, causada pela bomba da seringa e também, a utilização de seringas de plástico, devido o seu material, elas possuem uma aderencia maior, fazendo com que a pressão interna desta varie, apresentando uma ocorrencia constante desta variação. Por este motivo, durante a geração de gotas, é observado que há gotas com tamanhos diferentes da média (valores entre 424.5 μm e 463.1 μm) e que devem ser depurados desta análise. Assim sendo,

expurgando estes dados, é possível ter uma polidispersidade baixa, nas quais as gotas geradas possuem um diâmetro médio de $349.09 \pm 1.45 \mu\text{m}$, e um $\text{CV} = 3.17\%$, como mostra a Figura 6. 11 (B).

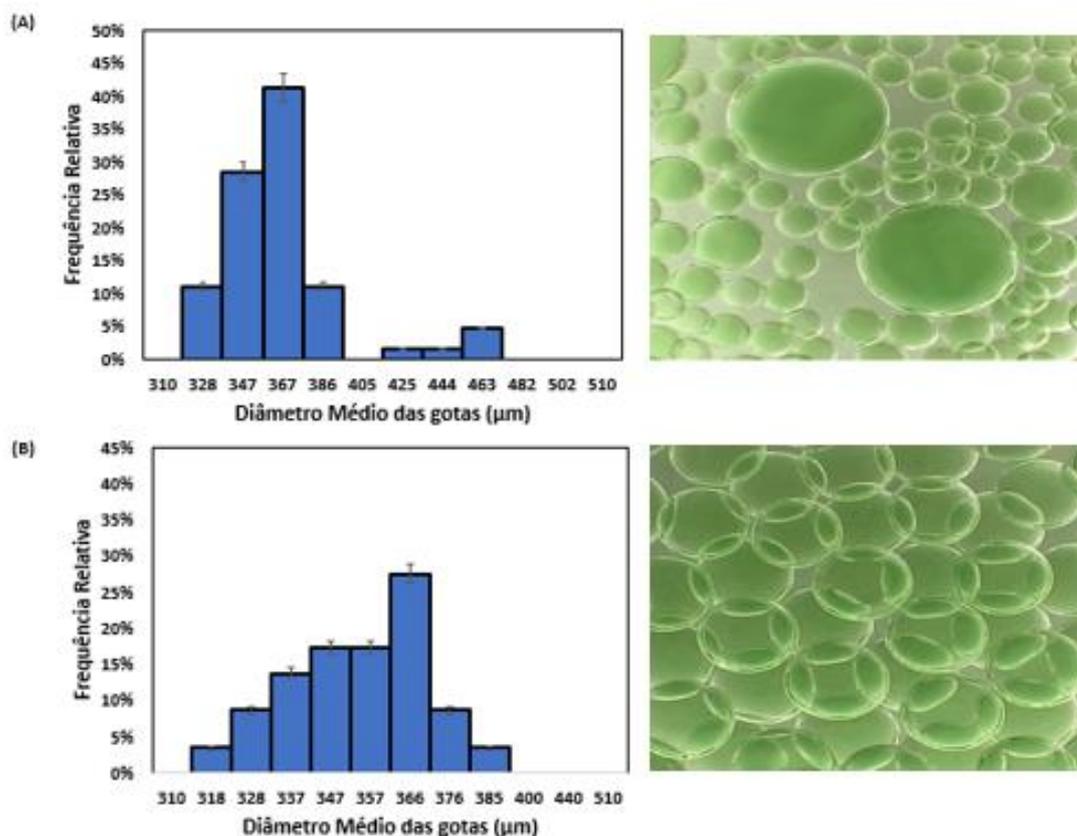


Figura 6. 11 – (A) distribuição de tamanhos e visualização das gotas produzidas nestas condições de vazões com geração de gotas que variam o tamanho e (B) distribuição de tamanhos e visualização das gotas produzidas nestas condições de vazões sem geração de gotas que variam o tamanho.

6.3 PROCESSO DE GELIFICAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO

Em canais microfluídicos, a cinética de gelificação de alginato tem um papel importante para produção de micropartículas, uma vez que pode afetar a formação destas [171], [172]. A gelificação de alginato ocorre pela ligação de um cátion divalente, como Ca^{+2} , ao grupo carboxílico presente na estrutura química do alginato [173]. Tal ligação pode ser de forma rápida ou lenta, dependendo do método de reticulação que pode ser na forma externa ou interna.

Diante disso, nós exploramos a geração de micropartículas de gotas por gelificação do tipo externa. O método de gelificação do tipo externa ocorre quando um íon ativo, tal

como uma solução de CaCl_2 , que fornece íons Ca^{2+} livres e permite sua ligação de forma instantânea ao grupo carboxílico do alginato. Neste caso, os íons de cálcio difundem-se para o interior da matriz polimérica até atingir a completa gelificação do alginato [173], [174]. Desta forma, a gelificação é direta e rápida, gerando um perfil de estrutura menos uniforme. Em microfluídica, o processo de formação das gotas de alginato ocorrem por emulsificação. Para a formação de micropartículas de alginato por gelificação do tipo externa, a reticulação pode ocorrer após a formação das gotas sendo despejadas num reservatório contendo solução gelificante [175] ou as soluções de alginato e reticulante podem ser misturadas numa mesma gota, sendo assim a gelificação ocorre dentro da própria gota [176], [177]. Na Figura 6. 12, é verificado o momento que ocorre a gelificação do tipo externa dentro da gota, as correntes interna (fluxo na cor verde) e intermediária (fluxo na cor vermelha) quando a gota é formada inicia-se a mistura dos fluidos, decorrendo assim a gelificação e consequentemente formando o hidrogel.

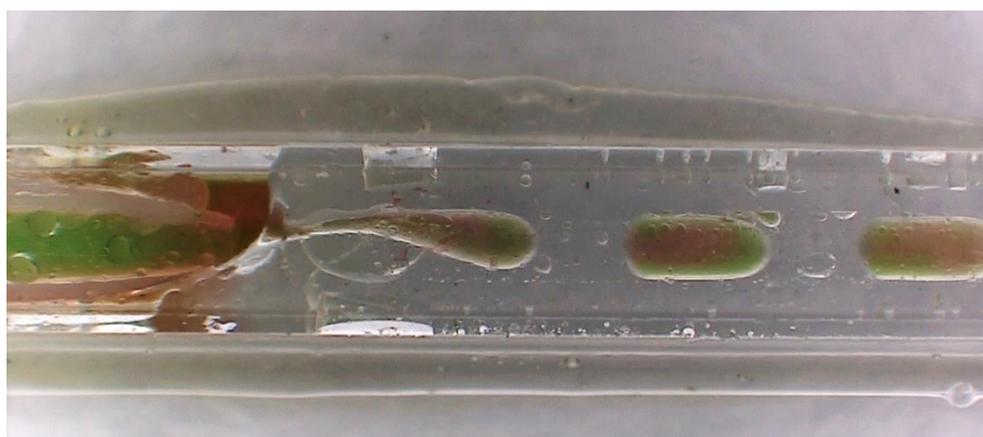


Figura 6. 12 – Gelificação ocorre dentro da própria gota, as correntes aquosas de Alginato (cor verde) e Cloreto de Cálcio (cor vermelha) podem ser misturadas numa mesma gota através da gelificação externa.

Como a gelificação externa apresenta uma reticulação direta por íon Ca^{2+} ativo que se difunde gradualmente para o interior da matriz polimérica, isso resulta na formação instantânea do hidrogel de alginato e uma gelificação não uniforme [173]. Com a gelificação ocorrendo dentro da gota, com uma corrente central aquosa para minimizar a difusão, houve a formação de micropartículas uniformes (Figura 6. 13).

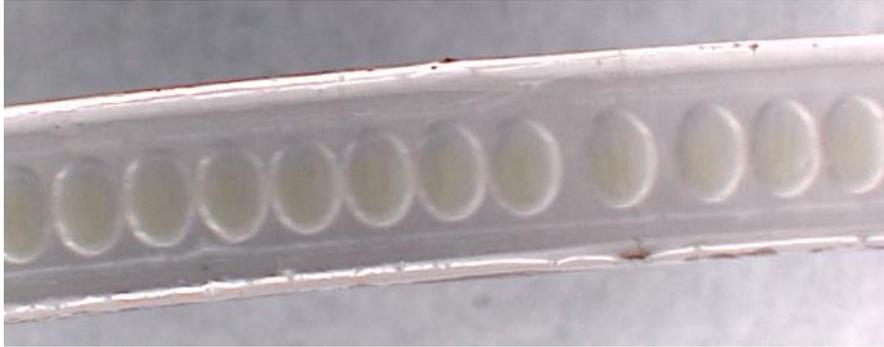


Figura 6. 13 - Formação de micropartículas uniformes devido a gelificação das corrente aquosas de alginato e cloreto de cálcio dentro da gota.

As concentrações de Alginato (2% - m/v) e Cloreto de Cálcio (30mM) utilizadas no início do estudo, ao longo do contato entre essas soluções na junção do microcanal, levavam após um pequeno tempo de utilização do dispositivo à formação de gel antes da quebra de gotas e isso provocou obstrução de microcanais, causando o bloqueio do dispositivo, conforme visto na Figura 6. 14.

Para amenizar esta dificuldade, na literatura há algumas estratégias, uma delas é de inserir a solução de reticulante separadamente da gota de alginato[142]. Em outro estudo, foi usada uma concentração inicial de alginato de apenas 1% (m/v) com uma baixa viscosidade, sendo apresentada a formação de alginato em geometrias com e sem corrente central aquosa [176].

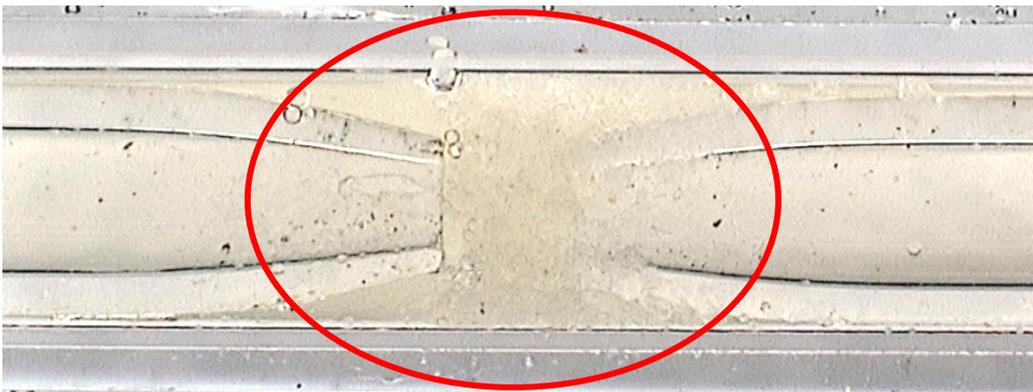


Figura 6. 14 – Obstrução do Canal devido altas concentrações das correntes aquosas de alginato 2% (m/v) e cloreto de cálcio (30mM).

Portanto, para a produção e encapsulação de células posteriores em micropartículas de alginato usando o dispositivo de microfluídica de capilares de vidro, utilizamos a gelificação do tipo externo com modificações feitas de acordo com nossa aplicação. Neste

caso, utilizamos soluções contendo alginato com concentração de 1%(m/v) e Cloreto de Cálcio de 15 mM, para produzir micropartículas de alginato.

6.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO SURFACTANTES

Primeiro, para examinar o efeito da tensão interfacial exercida pelo fluido contínuo no processo de separação, medimos o tamanho das microgotas produzidas em função de Q_c (Q_{out}), de acordo com as diferentes concentrações de surfactante (Span 80) na fase contínua. (óleo de milho). Na ausência de um surfactante, é possível notar que as gotas geradas coalescem em uma frequência alta, quase que instantaneamente.

Adicionou-se um surfactante não iônico, monooleato de sorbitano (span 80), à fase contínua para reduzir a tensão interfacial entre ambas as fases, o que facilitou a formação de microgotas e evitou a coalescência subsequente antes da gelificação. Como esperado, o diâmetro das microgotas diminuiu com uma diminuição na tensão interfacial, porque a tensão interfacial diminuiu com o aumento da concentração de surfactante na fase contínua (Figura 6. 15). Assim, o tamanho das microgotas é criticamente dependente da concentração de surfactante adicionada ao óleo de milho.

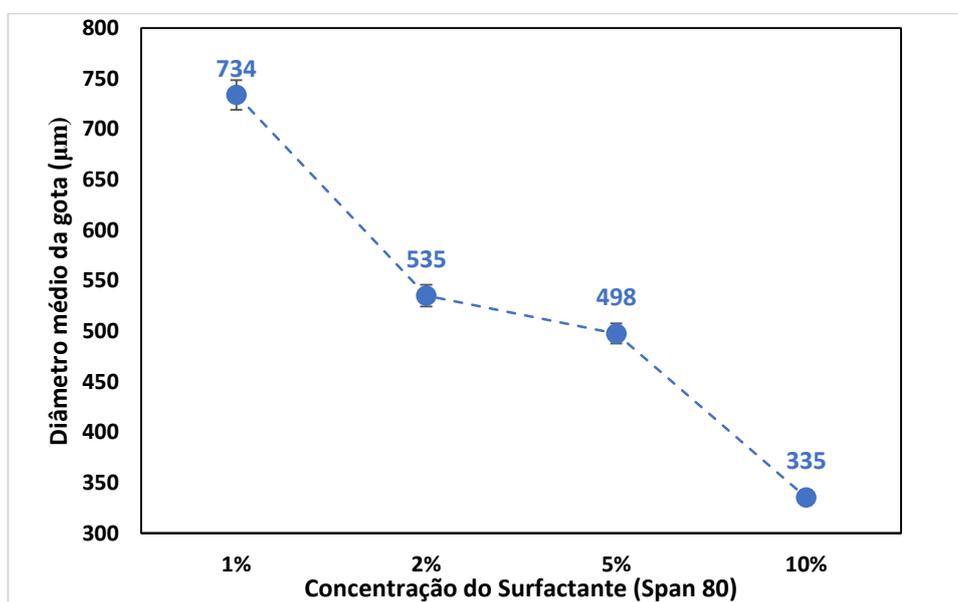


Figura 6. 15 – Dependência do tamanho das microgotas produzidas no dispositivo microfluídico na taxa da fase contínua (Q_c) – $6.0 \mu Lh^{-1}$ com a adição de diferentes concentrações de surfactante (span80).

O surfactante não-iônico, monooleato de sorbitano (span 80), foi adicionado à fase contínua para reduzir a tensão interfacial entre ambas as fases, o que facilitou a formação de microgotas e preveniu a coalescência subsequente antes da gelificação. Como esperado, o diâmetro das microgotas diminuiu com uma diminuição na tensão interfacial, porque a tensão interfacial diminui com o aumento da concentração de surfactante na fase contínua. Assim, o tamanho das microgotas é criticamente dependente da concentração de surfactante adicionado ao óleo de milho.

A Figura 6. 15 mostra o efeito da tensão interfacial e a taxa de fluxo diferente da fase contínua, ambos a uma vazão da fase continua fixa (6,0 μ l/h) da fase aquosa e uma concentração que varia entre 1 a 10 % de surfactante no tamanho da microesferas produzidas. O tamanho médio das microesferas foi dependente da tensão interfacial, que variou de 335 ± 1 a 733 ± 15 μ m, respectivamente para uma variação do Span 80 de 1 e 10%. Portanto, o tamanho das microgotas foi controlado variando-se a tensão interfacial pela adição de um surfactante à fase contínua, e baseado na Figura 6. 15 será utilizada a concentração de 10% de Span 80, pois foi o melhor evento realizado onde obtivemos o menor diâmetro médio de gota.

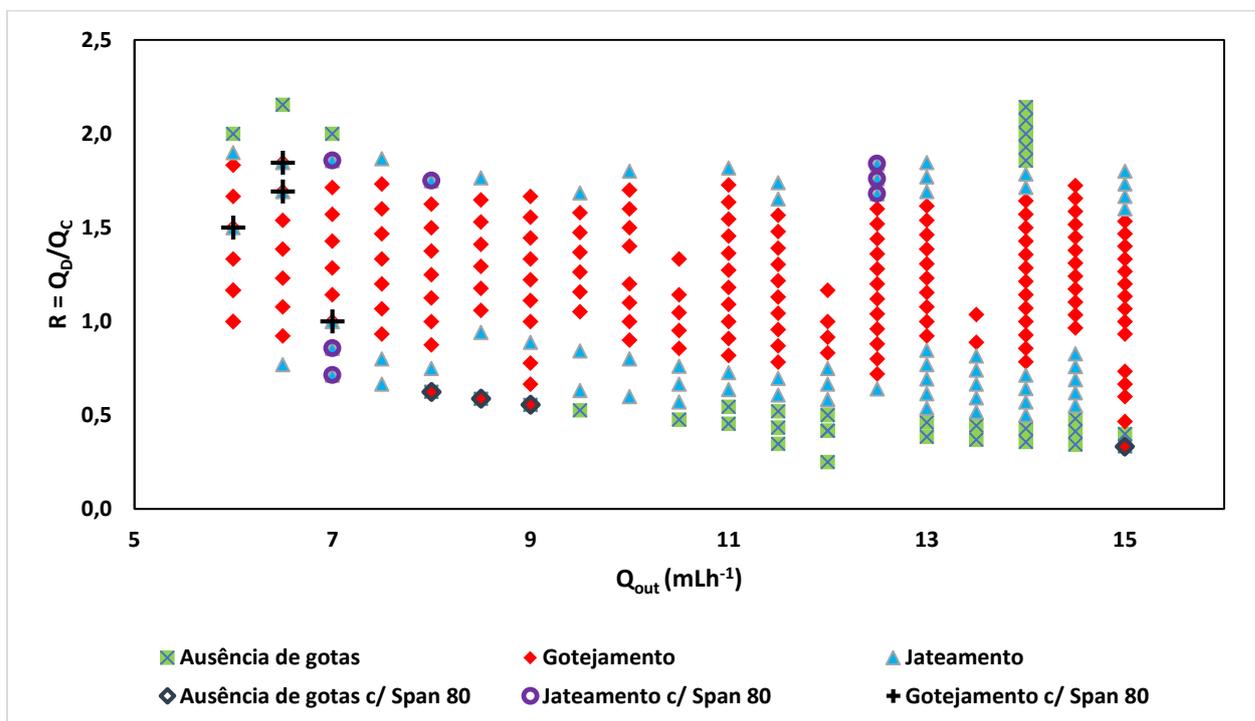


Figura 6. 16 - Formação de gotas em função da razão de taxas de fluxo ($R = Q_D/Q_C$) e da vazão da fase contínua (Q_{OUT}). Na fase contínua foi usado óleo de milho com adição de 10% de Span 80.

É importante ressaltar que diferente da dependência encontrada na concentração do surfactante em relação ao tamanho da gota, o tipo de regime de escoamento permanece inalterado, ou seja, se por exemplo ao considerarmos um sistema com as mesmas vazões sem a utilização do surfactante e o regime preponderante era de jateamento ao acrescentarmos o surfactante a fase contínua, este regime permanecerá de jateamento conforme pode ser visto na Figura 6. 16.

6.5 EFEITO DA VISCOSIDADE NA FASE AQUOSA

Para caracterizar o efeito da viscosidade da fase aquosa, as microgotas produzidas foram medidas em função de Q_c a diferentes concentrações de alginato, porque uma alteração na concentração de alginato afeta a viscosidade da fase aquosa.

A Figura 6. 17 mostra o efeito da viscosidade do alginato no tamanho médio das microgotas para várias concentrações de soluções de alginato. A vazão da fase contínua variou de 1,7 a 5 $\mu\text{L} / \text{min}$. Para uma vazão da fase contínua de 1,7 $\mu\text{L}/\text{h}$, as maiores microgotas foram obtidas a partir da solução de alginato (diâmetro médio de $860.46 \pm 5.22 \mu\text{m}$).

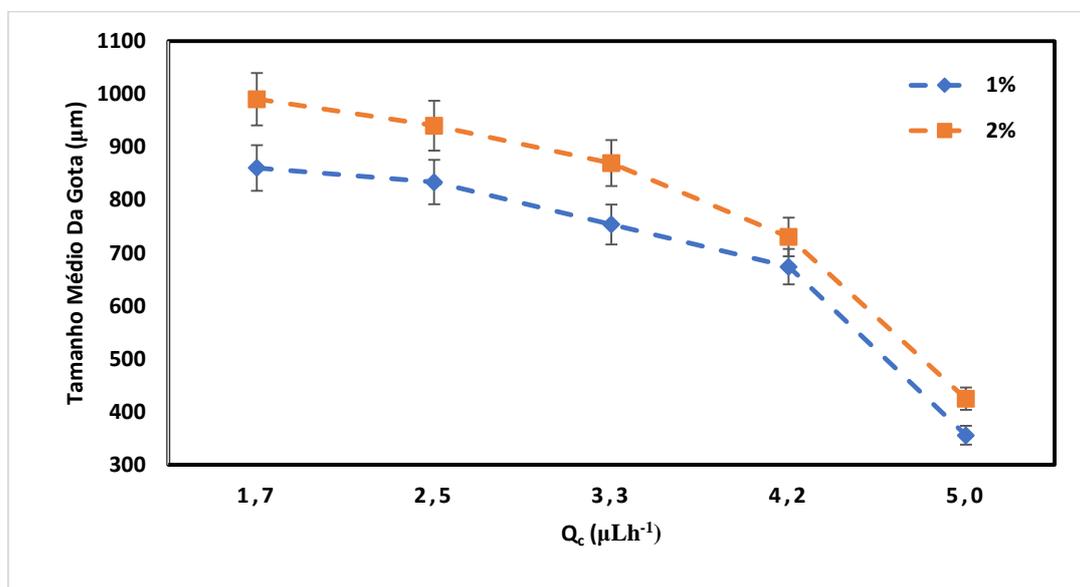


Figura 6. 17 – Tamanho das Microgotas em função da variação da vazão da fase contínua para duas soluções aquosas com diferentes concentração de alginato (1% e 2%).

Como esperado, um aumento na concentração de alginato (maior viscosidade) resultou em microgotas de alginato menores. Assim, o tamanho das microgotas pode ser controlado alterando a viscosidade da fase dispersa, que foi bem combinada com dados

sobre o processo de formação de gotas de outros dispositivos microfluídicos [178], [179]. Na literatura para soluções de alginato mais viscosas (de 2,5 a 5,0%), foi produzido tampões alongados em vez de microgotas esféricas, ou nenhuma gota foi obtida nos canais microfluídicos devido à separação zero na junção[141].

De acordo com a Figura 6. 17, a concentração de 1% de alginato é mais vantajosa em relação ao tamanho médio da gota, devido ao fato de desejarmos gotas com diâmetros próximos ao tamanho dos esferoides (valores entre 300 a 400 μm), estes esferoides são vistos na Figura 6. 18. Além do que, como relatado anteriormente, a solução de alginato a 2% mesmo gerando gotas durante um certo tempo não é tão viável devido o fato de obstruir o dispositivo e conseqüentemente, torná-lo inoperante. É importante saber que também foi utilizado para esta análise a concentração de 1,5% de Alginato, com tudo a obstrução do canal permaneceu ocorrendo assim como utilizando as concentrações de 2%, a principal diferença foi o tempo para a obstrução do microcanal que segue uma relação direta: quanto maior a concentração de Alginato, menor é o tempo para obstruir o microcanal.

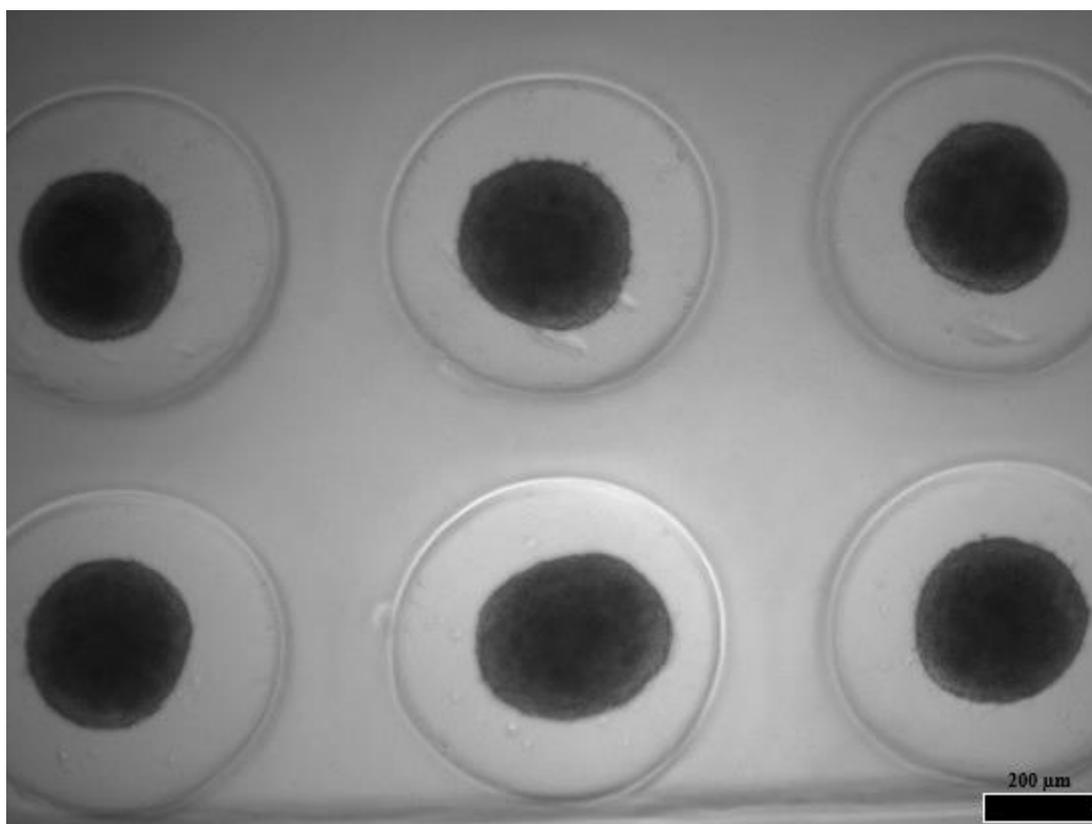


Figura 6. 18 – Esferoides utilizados nos experimentos. Os tamanhos médios variam entre 300 μm e 400 μm .

6.6 ESTABILIDADE DAS GOTAS PRODUZIDAS POR MICROFLUÍDICA

As propriedades mecânicas dos biopolímeros, como a força de cisalhamento que é afetada pela concentração do agente de reticulação, controlam expressivamente a estabilidade do alginato e a dinâmica das células encapsuladas em micropartículas de alginato [126], [180]. Desta forma, as microgotas de alginato, foram mantidas no mesmo meio de cultura que foram geradas, composto por óleo de milho e surfactante (Span 80). Estas microgotas foram observadas e avaliadas durante o período antecedente a coalescência, ou seja, a união de duas ou mais gotas formando partículas maiores. Esse fenômeno ocorre após a descarga das gotas no recipiente de coleta, e pode variar de acordo com a concentração de surfactante utilizado. Neste trabalho, para as concentrações de 1%, 2% e 5% a coalescência ocorreu em menos de 1 minuto, enquanto que na concentração de 10% a coalescência ocorreu em mais de dois minutos, conforme visto na Figura 6. 19.

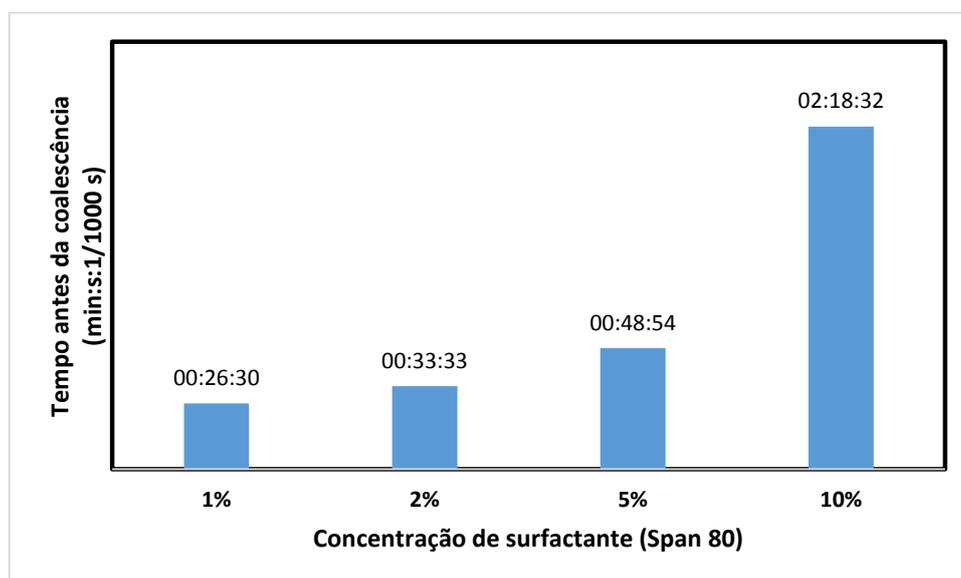


Figura 6. 19 – Estabilidade física das microgotas de alginato em diferentes condições.

Sendo assim, a presença do surfactante desacelera a aglutinação das microgotas de hidrogel. Na qual, durante o período médio para as concentrações de 10%, 5%, 2% e 1%, observado na Figura 6. 19, foram de 02min18s, 48s, 33s e 26s, respectivamente. Contudo, as gotas mantiveram-se íntegras e o aumento da concentração do surfactante leva a

diminuição do diâmetro e o aumento do tempo antes de se aderirem. É importante ilustrar que com a ausência do surfactante, foi possível observar a ocorrência do fenômeno da coalescência no transporte das gotas ao longo do dispositivo, chegando no recipiente de coleta gotas aglutinadas.

Não foi objeto de estudo deste trabalho, porém pelo comportamento observado do período médio de coalescência no recipiente de coleta, espera-se que com a utilização de surfactantes seja possível manipular os esferóides após o seu encapsulamento no recipiente de coleta.

6.7 ENCAPSULAMENTO DE ESFEROIDES DE CÉLULAS-TRONCO

A densidade celular, isto é, a razão entre a quantidade de esferóides pelo volume do fluido, é ajustada ao valor desejado, que depende da densidade média por gota e do tamanho da gota. Os esferóides têm diâmetro de $\sim 300 \mu\text{m}$ e o volume total de meio disponível para cada célula é muitas vezes o seu próprio volume. Utiliza-se óleo de milho para transportar os esferóides encapsulados. Vale lembrar que a solução aquosa de alginato está presente na corrente interna que é um dos fluidos que compõe a fase dispersa, e os esferóides fazem parte desta solução. Para estabilizar as gotas adiciona-se um surfactante Span 80 ao óleo de suspensão a uma concentração de 10% (p/p). Este surfactante proporciona excelente estabilidade contra a coalescência, garantindo boa biocompatibilidade da interface interna da gota.

A corrente interna contém a suspensão de esferóides e alginato (Figura 6. 20), enquanto as correntes intermediária e externa, possuem cloreto de cálcio e óleo de milho, respectivamente. O volume da gota pode variar facilmente entre 0,15 nL e 0,35 nL, correspondendo a gotas esféricas de $300 \mu\text{m}$ a $400 \mu\text{m}$. Isto é conseguido combinando o tamanho do capilar de injeção com o diâmetro da gota e operando o dispositivo no regime de gotejamento.

Um das características dos esferóides fixados é sua capacidade de deformação elástica, pois como é visto na Figura 6. 20, o tamanho do esferóide era maior do que o esperado (dentro do intervalo de $300 - 400 \mu\text{m}$) e sendo o capilar de injeção com diâmetro menor do que o esferóide, conseqüentemente, ocorre o achatamento momentâneo do esferóide. Optando por utilizar um esferóide vivo, esta característica de deformação elástica não existiria.

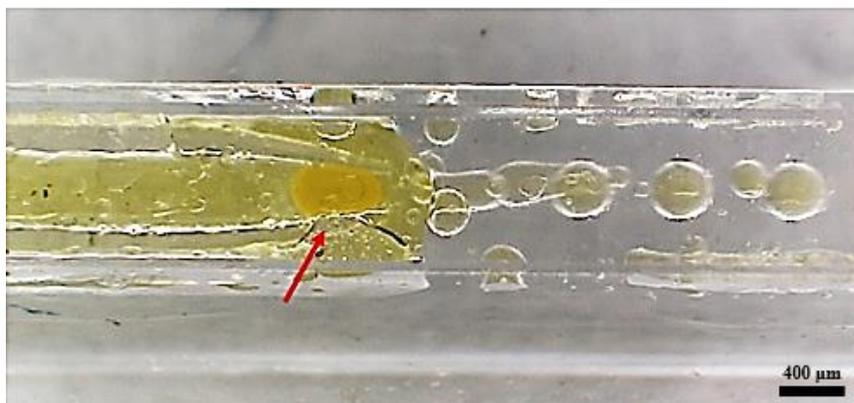


Figura 6. 20 – Momento no qual o esferoide será encapsulado, indicado pela seta vermelha. A corrente em que o esferoide está (Q_{in}) é composta da solução aquosa de alginato e os próprios esferoides.

Bombas individuais de seringa são usadas para controlar o fluxo do óleo e a suspensão celular. Aqui nos concentramos exclusivamente em esferoides em suspensão; no entanto, os esferoides aderentes também podem ser estudados cultivando primeiro em pequenas gotas e depois encapsulando os esferoides. Para evitar o assentamento dos esferoides e manter a densidade desejada, agitamos constantemente a suspensão. Normalmente usamos uma seringa de 5 mL contendo 2 mL de suspensão de células, garantindo que a profundidade do volume seja comparável à sua altura.. Um meio conveniente de mexer a amostra, evitando o entupimento da seringa, é mantê-la a um ângulo de 45 °.

Estudos de esferoide único requerem que virtualmente todas as gotas contenham no máximo um esferoide, de modo que a maioria das gotas não contenha nenhum esferoide (Figura 6. 20), uma vez que o processo de encapsulamento segue a estatística de Poisson. A produção de gotas encapsulando esferóides individuais é mostrada na Figura 6. 21 A, onde as vazões das correntes interna, intermediária e externa são 3,5, 4,5 e 6,0 mL/h, respectivamente. Após o encapsulamento, as gotas foram direcionadas para um micromolde de poliácido láctico (PLA) com o intuito de investigar a acomodação dos esferoides através da trama do micromolde, conforme é visto na Figura 6. 21 B. É importante ressaltar, que os esferoides tem como característica absorver o corante utilizado nas soluções, por isso os esferoides estão com as cores amarelo e verde, pois foram as cores utilizadas no experimento.

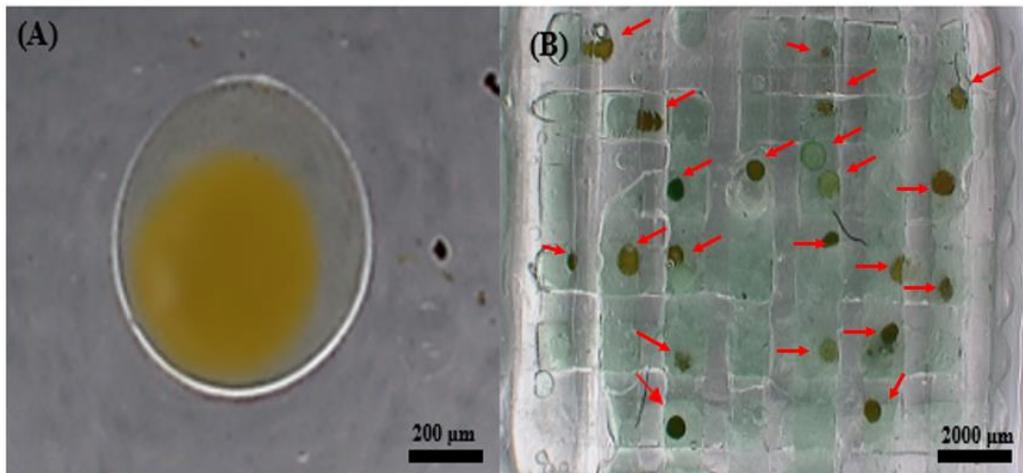


Figura 6. 21 – (A) Encapsulamento de esferoide individual realizado com as vazões das correntes interna, intermediária e externa são 3,5 mL/h, 4,5 mL/h e 6,0 mL/h, respectivamente. (B) Esferoides encapsulados (nas cores verde e amarelo) acomodados no micromolde indicado pelas setas vermelhas.

Analisando o efeito do surfactante nos esferoides encapsulados, foi percebido que as gotas com esferoides permaneceram estáveis pelo mesmo tempo das gotas vazias anteriormente descrito. Após o período de estabilidade, a aglutinação das gotas com esferoides ocorreu (Figura 6.22), onde a gota da esquerda ocorreu a aglutinação de gotas sem esferoides e 3 gotas com esferoides únicos (em amarelo) e a gota da direita, a aglutinação de gotas sem esferoides e 2 gotas com esferoides únicos (em amarelo).



Figura 6. 22 – Aglutinação das gotas após a período de estabilidade causado pela adição de surfactante.

Em resumo, foi apresentado a análise experimental do encapsulamento de esferoides através de dispositivos microfluídicos de capilares de vidro, demonstrando o

potencial de aplicação desses dispositivos desenvolvidos nesta pesquisa. Foram conduzidos experimentos para caracterização do tamanho e morfologia da gota, com o estudo das vazões das fases contínua e dispersa, inserção de surfactante e variação das concentrações das substâncias formadoras do hidrogel e experimentos para avaliação do encapsulamento dos esferoides, sendo priorizado o encapsulamento de esferoides únicos.

Para se obter as avaliações experimentais em melhor concordância com o estudo, seria necessário a utilização de esferoides vivos e a sua manipulação para a avaliação da viabilidade e da citotoxicidade do encapsulamento. Ressalta-se o bom desempenho do experimento, mesmo adotando esferoides fixados com meio de cultura para o encapsulamento e análise dos dados, este estudo pode ser usado com benefícios na análise experimental de esferoides vivos.

CONCLUSÕES

No presente trabalho, foram estabelecidas as bases fundamentais e construídas ferramentas para o encapsulamento de esferoides de células-tronco em alginato através de dispositivos microfluídicos de capilares de vidro. Esse procedimento foi detalhadamente desenvolvido para uma série de casos particulares, adotando numerosas vazões para as fases dispersa e contínua, a fim de alcançar um caso ótimo para o estudo. Iniciou-se o estudo através de um caso simples em que os estudos foram feitos somente com água e óleo, para permitir a visualização da formação de gotas. Também foram ilustrados casos envolvendo a variação da concentração das substâncias que compõem a fase dispersa (Alginato e Cloreto de cálcio), depois este caso foi aperfeiçoado com a inserção de surfactante na fase contínua e, finalmente o caso no qual ocorre o encapsulamento de esferoides.

Diante dos estudos realizados com os sistemas microfluídicos para formação de gotas, notamos que os sistemas operados com óleo de milho apresentaram um perfil de geração de gotas estável e com gotas mais uniformes. No processo de formação de microgotas de alginato em sistemas microfluídicos, observamos que o método de gelificação do tipo externa apresenta uma cinética de reticulação mais rápida, gerando microgotas homogêneas e sem causar entupimentos dos capilares após a diminuição da concentração de alginato.

Além disso, as configurações dos capilares também tiveram influência na geração de microgotas monodispersas. A formação de micropartículas de alginato em microfluídica usando o método de gelificação externa, mostrou-se estável nas condições as quais foram submetidas para o encapsulamento de células mesenquimais. Porém tal estabilidade foi possível apenas quando a inserção de surfactante (Span 80) na fase contínua com a concentração de 10%.

O tamanho médio das gotas variou de 335 a 734 μm , sendo afetado pelas características do surfactante e pelas viscosidades das fases oleosa e aquosa. O tamanho médio das gotas diminuiu à medida que a viscosidade da fase dispersa aumentava. Como prova de conceito, microgotas de alginato monodispersas foram produzidas no dispositivo microfluídico e o tamanho das microgotas foi modulado pela variação das vazões.

Além disso, neste método de encapsulação de esferóides em alginato usando microfluídica, concluímos que trata-se de um protocolo que garante uma eficiência de encapsulação, na ordem de 8%. Que mesmo aparentemente se reflete em um nível de rendimento baixo, é considerado um nível de rendimento satisfatório quando comparado a métodos convencionais (“batelada”).

O encapsulamento de esferóides em hidrogéis de alginato fornece uma ferramenta não tóxica, não agressiva, simples e rápida para preparar microgotas para sistemas relacionados a medicina regenerativa. Assim, ao garantir a estabilidade mecânica das microgotas num eficiente processo de encapsulação, as células encapsuladas em alginato tornam-se viável para a sua utilização.

A metodologia desenvolvida no presente trabalho para o encapsulamento celular através de um dispositivo microfluídico de capilar de vidro foi realizada com, onde os resultados obtidos revelaram que a abordagem de análise desenvolvida é robusta, apresentando bons resultados mesmo nos casos mais complexos. No entanto, a funcionalidade completa requer um dispositivo para encapsular esferóides, incubar e analisa-los. Apesar de não ter sido alvo deste trabalho, a literatura nos indica que com estes dispositivos será possível manter a viabilidade celular e o metabolismo saudável dos esferóides, seguindo como sugestão para análise e conferência em trabalhos futuros, como podemos visualizar na seção a seguir.

PROPOSTAS FUTURAS

Como propostas de trabalhos futuros podemos investigar o comportamento de esferoides mesenquimais vivos encapsulados em microgotas de alginato através dos métodos de gelificação do tipo interno e do tipo externo, bem como o estudo da viabilidade celular, no tocante a sobrevivência, atividade metabólica, entre outros, e o desenvolvimento de sistema microfluídico de gotas para amplificação de escala da produção de partículas.

Podemos incluir também, o estudo de estratégias alternativas de geometrias e distanciamento entre capilares para aumentar a produção de gotas em sistema microfluídico, com ganho de produção em escala, considerando a síntese e caracterização de esferoides vivos e a utilização de outros óleos como fase continua para avaliar se há ganhos ou otimizações no processo para coleta de gotas, em prol da medicina regenerativa.

Não podemos deixar de elencar também como propostas futuras a validação de princípios de detecção aplicados aos esferoides dentro das gotas para análise da absorção de nutrientes e testes toxicológicos para viabilidade celular, este último com o objetivo de observar a manutenção das características originais das células após o encapsulamento. É importante registrar a necessidade do estudo das propriedades mecânicas dos esferoides encapsulados para aperfeiçoamento de sua morfologia, desta maneira espera-se o aumento da eficiência de gotas encapsuladas ao longo do processo.

E por último, podemos sugerir como trabalhos futuros avaliar a possibilidade de se aumentar a concentração de surfactantes, de modo que se consiga um maior tempo de coalescência, evitando assim o entupimento, no caso da aplicação de bioimpressoras, e a avaliação da toxicidade para maiores concentrações.

REFERÊNCIAS

- [1] G. F. Christopher and S. L. Anna, “Microfluidic methods for generating continuous droplet streams,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 40, no. 19, pp. R319–R336, Oct. 2007.
- [2] M. M. Smoak, H. A. Pearce, and A. G. Mikos, “Microfluidic devices for disease modeling in muscle tissue,” *Biomaterials*, Aug. 2018.
- [3] B. Zhang, Y. Xiao, A. Hsieh, N. Thavandiran, and M. Radisic, “Micro- and nanotechnology in cardiovascular tissue engineering,” *Nanotechnology*, vol. 22, no. 49, p. 494003, Dec. 2011.
- [4] G. M. Whitesides, “The origins and the future of microfluidics,” *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368–373, 2006.
- [5] A. van den Berg and T. S. J. Lammerink, “Micro Total Analysis Systems: Microfluidic Aspects, Integration Concept and Applications,” Springer, Berlin, Heidelberg, 1998, pp. 21–49.
- [6] P. Griss and G. Stemme, “Novel, side opened out-of-plane microneedles for microfluidic transdermal interfacing,” in *Technical Digest. MEMS 2002 IEEE International Conference. Fifteenth IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (Cat. No.02CH37266)*, pp. 467–470.
- [7] G. D. Nicodemus and S. J. Bryant, “Cell Encapsulation in Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications.”
- [8] L. Shang, Y. Cheng, and Y. Zhao, “Emerging Droplet Microfluidics,” *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 12, pp. 7964–8040, Jun. 2017.
- [9] C. P. Barnes, S. A. Sell, E. D. Boland, D. G. Simpson, and G. L. Bowlin, “Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 14, pp. 1413–1433, Dec. 2007.
- [10] I. R. LEMISCHKA, “Stem Cell Biology: A View toward the Future,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1044, no. 1, pp. 132–138, Jun. 2005.
- [11] H. M. Blau, T. R. Brazelton, and J. M. Weimann, “The evolving concept of a stem cell: entity or function?,” *Cell*, vol. 105, no. 7, pp. 829–41, Jun. 2001.
- [12] B. Heidari *et al.*, “Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of sheep mesenchymal stem cells derived from bone marrow, liver, and adipose tissue.,” *Avicenna J. Med. Biotechnol.*, vol. 5, no. 2, pp. 104–17, Apr.

- 2013.
- [13] R. Matsumoto *et al.*, “Vascular Endothelial Growth Factor–Expressing Mesenchymal Stem Cell Transplantation for the Treatment of Acute Myocardial Infarction,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, no. 6, pp. 1168–1173, Jun. 2005.
- [14] E. A. McCulloch and J. E. Till, “The Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells, Determined by Quantitative Marrow Transplantation into Irradiated Mice,” *Radiat. Res.*, vol. 13, no. 1, p. 115, Jul. 1960.
- [15] P. S. in ’t Anker *et al.*, “Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta,” *Stem Cells*, vol. 22, no. 7, pp. 1338–1345, Dec. 2004.
- [16] F. M. Wodajo and A. E. Jakus, “Nanopatterning and Bioprinting in Orthopedic Surgery,” *Orthop. Clin. North Am.*, vol. 50, no. 1, pp. 21–33, Jan. 2019.
- [17] P. Datta, A. Barui, Y. Wu, V. Ozbolat, K. K. Moncal, and I. T. Ozbolat, “Essential steps in bioprinting: From pre- to post-bioprinting,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 36, no. 5, pp. 1481–1504, Sep. 2018.
- [18] F. Xu, B. Sridharan, S. Wang, U. A. Gurkan, B. Syverud, and U. Demirci, “Embryonic stem cell bioprinting for uniform and controlled size embryoid body formation,” *Biomicrofluidics*, vol. 5, no. 2, p. 22207, Jun. 2011.
- [19] D. J. Ravnicek, A. N. Leberfinger, and I. T. Ozbolat, “Bioprinting and Cellular Therapies for Type 1 Diabetes,” *Trends Biotechnol.*, vol. 35, no. 11, pp. 1025–1034, Nov. 2017.
- [20] L. Casteilla *et al.*, “Tissus adipeux, chirurgie plastique et reconstructrice : le retour aux sources,” *Ann. Chir. Plast. Esthétique*, vol. 49, no. 5, pp. 409–418, Oct. 2004.
- [21] M. Ravi, V. Paramesh, S. R. Kaviya, E. Anuradha, and F. D. P. Solomon, “3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 230, no. 1, pp. 16–26, Jan. 2015.
- [22] S. R. Caliari and J. A. Burdick, “A practical guide to hydrogels for cell culture,” *Nat. Methods*, vol. 13, no. 5, pp. 405–414, May 2016.
- [23] C. S. Chen, “3D Biomimetic Cultures: The Next Platform for Cell Biology,” *Trends Cell Biol.*, vol. 26, no. 11, pp. 798–800, Nov. 2016.
- [24] F. Pampaloni, E. G. Reynaud, and E. H. K. Stelzer, “The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no.

- 10, pp. 839–845, Oct. 2007.
- [25] S. S. Ho, K. C. Murphy, B. Y. K. Binder, C. B. Vissers, and J. K. Leach, “Increased Survival and Function of Mesenchymal Stem Cell Spheroids Entrapped in Instructive Alginate Hydrogels,” *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 5, no. 6, pp. 773–781, Jun. 2016.
- [26] R. Xiong, Z. Zhang, W. Chai, D. B. Chrisey, and Y. Huang, “Study of gelatin as an effective energy absorbing layer for laser bioprinting,” *Biofabrication*, vol. 9, no. 2, p. 024103, Jun. 2017.
- [27] T.-M. Achilli, J. Meyer, and J. R. Morgan, “Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids,” *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 12, no. 10, pp. 1347–1360, Oct. 2012.
- [28] L. Aust *et al.*, “Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates,” *Cytotherapy*, vol. 6, no. 1, pp. 7–14, Jan. 2004.
- [29] L. Charelli, “Modulação do perfil secretório de células tronco humanas de tecido adiposo através da exposição a nanopartículas de prata.,” UFRJ, 2017.
- [30] L. Gasperini, J. F. Mano, and R. L. Reis, “Natural polymers for the microencapsulation of cells.,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 11, no. 100, p. 20140817, Nov. 2014.
- [31] M. Ahearne and D. J. Kelly, “A comparison of fibrin, agarose and gellan gum hydrogels as carriers of stem cells and growth factor delivery microspheres for cartilage regeneration,” *Biomed. Mater.*, vol. 8, no. 3, p. 035004, Mar. 2013.
- [32] J. W. Lee *et al.*, “Development of a 3D cell printed construct considering angiogenesis for liver tissue engineering,” *Biofabrication*, vol. 8, no. 1, p. 015007, Jan. 2016.
- [33] S. K. Kapur *et al.*, “Human adipose stem cells maintain proliferative, synthetic and multipotential properties when suspension cultured as self-assembling spheroids,” *Biofabrication*, vol. 4, no. 2, p. 025004, Jun. 2012.
- [34] E. Cukierman, R. Pankov, and K. M. Yamada, “Cell interactions with three-dimensional matrices,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 14, no. 5, pp. 633–640, Oct. 2002.
- [35] D. B. Edelman and E. W. Keefer, “A cultural renaissance: in vitro cell biology embraces three-dimensional context,” *Exp. Neurol.*, vol. 192, no. 1, pp. 1–6, Mar. 2005.
- [36] R. Landers, A. Pfister, U. Hübner, H. John, R. Schmelzeisen, and R. Mülhaupt,

- “Fabrication of soft tissue engineering scaffolds by means of rapid prototyping techniques,” *J. Mater. Sci.*, vol. 37, no. 15, pp. 3107–3116, 2002.
- [37] Z. Wang, R. Samanipour, and K. Kim, “Organ-on-a-Chip Platforms for Drug Screening and Tissue Engineering,” Springer, Cham, 2016, pp. 209–233.
- [38] A. G. Mikos *et al.*, “Engineering Complex Tissues,” *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 12, pp. 3307–3339, Dec. 2006.
- [39] Y. Xu, G. Balooch, M. Chiou, E. Bekerman, R. O. Ritchie, and M. T. Longaker, “Analysis of the material properties of early chondrogenic differentiated adipose-derived stromal cells (ASC) using an in vitro three-dimensional micromass culture system,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 359, no. 2, pp. 311–316, Jul. 2007.
- [40] E. Cimetta *et al.*, “Enhancement of Viability of Muscle Precursor Cells on 3D Scaffold in a Perfusion Bioreactor,” *Int. J. Artif. Organs*, vol. 30, no. 5, pp. 415–428, May 2007.
- [41] R. Dai, Z. Wang, R. Samanipour, K. Koo, and K. Kim, “Adipose-Derived Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications,” *Stem Cells Int.*, vol. 2016, pp. 1–19, Feb. 2016.
- [42] A. Sterodimas, J. de Faria, B. Nicaretta, and I. Pitanguy, “Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): Current and future applications,” *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.*, vol. 63, no. 11, pp. 1886–1892, Nov. 2010.
- [43] P. J. O’Brien, Fergal J.; Harley, Brendan A.; Waller, Mary A. Yannas, Ioannis V.; Gibson, Lorna J.; Prendergast, “The effect of pore size on permeability and cell attachment in collagen scaffolds for tissue engineering,” *Technology and Health Care*, vol. 15, no. 1, Elsevier, pp. 3–17, 01-Jan-1993.
- [44] K. Jakab, C. Norotte, F. Marga, K. Murphy, G. Vunjak-Novakovic, and G. Forgacs, “Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells,” *Biofabrication*, vol. 2, no. 2, p. 022001, Jun. 2010.
- [45] Y. S. Choi *et al.*, “The alignment and fusion assembly of adipose-derived stem cells on mechanically patterned matrices,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 29, pp. 6943–6951, Oct. 2012.
- [46] Z. Wang, R. Samanipour, K.-I. Koo, and K. Kim, “Organ-on-a-Chip Platforms for Drug Delivery and Cell Characterization: A Review,” *Sensors Mater.*, vol. 27, no. 6, pp. 487–506, 2015.
- [47] C. Nie, D. Yang, and S. F. Morris, “Local delivery of adipose-derived stem cells

- via acellular dermal matrix as a scaffold: A new promising strategy to accelerate wound healing,” *Med. Hypotheses*, vol. 72, no. 6, pp. 679–682, Jun. 2009.
- [48] S. Heydarkhan-Hagvall *et al.*, “Human Adipose Stem Cells: A Potential Cell Source for Cardiovascular Tissue Engineering,” *Cells Tissues Organs*, vol. 187, no. 4, pp. 263–274, 2008.
- [49] H. Tapp, E. N. Hanley, J. C. Patt, and H. E. Gruber, “Adipose-Derived Stem Cells: Characterization and Current Application in Orthopaedic Tissue Repair,” *Exp. Biol. Med.*, vol. 234, no. 1, pp. 1–9, Jan. 2009.
- [50] A. Alhadlaq, M. Tang, and J. J. Mao, “Engineered Adipose Tissue from Human Mesenchymal Stem Cells Maintains Predefined Shape and Dimension: Implications in Soft Tissue Augmentation and Reconstruction,” *Tissue Eng.*, vol. 11, no. 3–4, pp. 556–566, Mar. 2005.
- [51] S. F. Collins, “Bioprinting Is Changing Regenerative Medicine Forever,” *Stem Cells Dev.*, vol. 23, no. S1, pp. 79–82, Dec. 2014.
- [52] S. Derakhshanfar, R. Mbeleck, K. Xu, X. Zhang, W. Zhong, and M. Xing, “3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances,” *Bioact. Mater.*, vol. 3, no. 2, pp. 144–156, Jun. 2018.
- [53] M. Kesti *et al.*, “Bioprinting Complex Cartilaginous Structures with Clinically Compliant Biomaterials,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 25, no. 48, pp. 7406–7417, Dec. 2015.
- [54] A. C. Daly, G. M. Cunniffe, B. N. Sathy, O. Jeon, E. Alsberg, and D. J. Kelly, “3D Bioprinting of Developmentally Inspired Templates for Whole Bone Organ Engineering,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 5, no. 18, pp. 2353–2362, Sep. 2016.
- [55] A. Rees *et al.*, “3D Bioprinting of Carboxymethylated-Periodate Oxidized Nanocellulose Constructs for Wound Dressing Applications,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, p. 925757, May 2015.
- [56] Yin Yu and I. T. Ozbolat, “Tissue strands as ‘bioink’ for scale-up organ printing,” in *2014 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 2014, pp. 1428–1431.
- [57] M. Rodríguez-Salvador, R. M. Rio-Belver, and G. Garechana-Anacabe, “Scientometric and patentometric analyses to determine the knowledge landscape in innovative technologies: The case of 3D bioprinting,” *PLoS One*, vol. 12, no. 6, p. e0180375, Jun. 2017.
- [58] J. Zhu, Y. Wang, P. Chen, H. Su, W. Du, and B.-F. Liu, “Highly efficient

- microfluidic device for cell trapping and pairing towards cell-cell communication analysis,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 283, pp. 685–692, Mar. 2019.
- [59] C. Mandrycky, Z. Wang, K. Kim, and D.-H. Kim, “3D bioprinting for engineering complex tissues,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 34, no. 4, pp. 422–434, Jul. 2016.
- [60] T. Xu, C. Baicu, M. Aho, M. Zile, and T. Boland, “Fabrication and characterization of bio-engineered cardiac pseudo tissues,” *Biofabrication*, vol. 1, no. 3, p. 035001, Sep. 2009.
- [61] B. Hopp *et al.*, “Femtosecond laser printing of living cells using absorbing film-assisted laser-induced forward transfer,” *Opt. Eng.*, vol. 51, no. 1, p. 014302, Jan. 2012.
- [62] R. C. Lo, “Chemical Engineering & Process Techniques Application of Microfluidics in Chemical Engineering,” *Chem Eng Process Tech*, vol. 1, 2013.
- [63] M. J. Madou, *Fundamentals of microfabrication : the science of miniaturization*. CRC Press, 2002.
- [64] O. Skurtys and J. M. Aguilera, “Applications of Microfluidic Devices in Food Engineering,” *Food Biophys.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–15, Mar. 2008.
- [65] K. Ren, J. Zhou, and H. Wu, “Materials for microfluidic chip fabrication,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 46, no. 11, pp. 2396–406, Nov. 2013.
- [66] H. Zhang, E. Tumarkin, R. M. A. Sullan, G. C. Walker, and E. Kumacheva, “Exploring Microfluidic Routes to Microgels of Biological Polymers,” *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 28, no. 5, pp. 527–538, Mar. 2007.
- [67] A. S. Utada, E. Lorenceau, D. R. Link, P. D. Kaplan, H. A. Stone, and D. A. Weitz, “Monodisperse double emulsions generated from a microcapillary device,” *Science*, vol. 308, no. 5721, pp. 537–41, Apr. 2005.
- [68] R. K. S. and D. A. W. Wynter J. Duncanson, Tina Lin, Adam R. Abate, Sebastian Seiffert, “Microfluidic synthesis of advanced microparticles for encapsulation and controlled release,” *LabChip*, vol. 12, pp. 2135–2145, 2012.
- [69] Y. Wang, L. Zhao, C. Tian, C. Ma, and J. Wang, “Geometrically controlled preparation of various cell aggregates by droplet-based microfluidics,” *Anal. Methods*, vol. 7, no. 23, pp. 10040–10051, Nov. 2015.
- [70] K. Alessandri *et al.*, “Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 37, pp. 14843–8, Sep. 2013.

- [71] C. Kim *et al.*, “Generation of core-shell microcapsules with three-dimensional focusing device for efficient formation of cell spheroid,” *Lab Chip*, vol. 11, no. 2, pp. 246–252, Jan. 2011.
- [72] P. Sabhachandani, V. Motwani, N. Cohen, S. Sarkar, V. Torchilin, and T. Konry, “Generation and functional assessment of 3D multicellular spheroids in droplet based microfluidics platform,” *Lab Chip*, vol. 16, no. 3, pp. 497–505, Jan. 2016.
- [73] H. F. Chan, Y. Zhang, Y.-P. Ho, Y.-L. Chiu, Y. Jung, and K. W. Leong, “Rapid formation of multicellular spheroids in double-emulsion droplets with controllable microenvironment,” *Sci. Rep.*, vol. 3, no. 1, p. 3462, Dec. 2013.
- [74] K. S. McMillan, A. G. McCluskey, A. Sorensen, M. Boyd, and M. Zagnoni, “Emulsion technologies for multicellular tumour spheroid radiation assays,” *Analyst*, vol. 141, no. 1, pp. 100–110, Dec. 2016.
- [75] S. Hong, H.-J. Hsu, R. Kaunas, and J. Kameoka, “Collagen microsphere production on a chip,” *Lab Chip*, vol. 12, no. 18, p. 3277, Aug. 2012.
- [76] D. H. Camacho, S. J. Y. Uy, M. J. F. Cabrera, M. O. S. Lobregas, and T. J. M. C. Fajardo, “Encapsulation of folic acid in copper-alginate hydrogels and its slow in vitro release in physiological pH condition,” *Food Res. Int.*, vol. 119, pp. 15–22, May 2019.
- [77] K. Shen, J. Lee, M. L. Yarmush, and B. Parekkadan, “Microcavity substrates casted from self-assembled microsphere monolayers for spheroid cell culture,” *Biomed. Microdevices*, vol. 16, no. 4, pp. 609–615, Aug. 2014.
- [78] W. L. Haisler, D. M. Timm, J. A. Gage, H. Tseng, T. C. Killian, and G. R. Souza, “Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation,” *Nat. Protoc.*, vol. 8, no. 10, pp. 1940–1949, Sep. 2013.
- [79] A. Faulkner-Jones *et al.*, “Bioprinting of human pluripotent stem cells and their directed differentiation into hepatocyte-like cells for the generation of mini-livers in 3D,” *Biofabrication*, vol. 7, no. 4, p. 044102, Oct. 2015.
- [80] E. W. K. Young, “Cells, tissues, and organs on chips: challenges and opportunities for the cancer tumor microenvironment,” *Integr. Biol.*, vol. 5, no. 9, p. 1096, Sep. 2013.
- [81] S. L. Nyberg, J. Hardin, B. Amiot, U. A. Argikar, R. P. Remmel, and P. Rinaldo, “Rapid, large-scale formation of porcine hepatocyte spheroids in a novel spheroid reservoir bioartificial liver,” *Liver Transplant.*, vol. 11, no. 8, pp. 901–910, Aug. 2005.

- [82] V. E. Santo *et al.*, “Adaptable stirred-tank culture strategies for large scale production of multicellular spheroid-based tumor cell models,” *J. Biotechnol.*, vol. 221, pp. 118–129, Mar. 2016.
- [83] N.-T. Nguyen, S. A. M. Shaegh, N. Kashaninejad, and D.-T. Phan, “Design, fabrication and characterization of drug delivery systems based on lab-on-a-chip technology,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 11–12, pp. 1403–1419, Nov. 2013.
- [84] N.-T. Nguyen *et al.*, “Recent Advances and Future Perspectives on Microfluidic Liquid Handling,” *Micromachines*, vol. 8, no. 6, p. 186, Jun. 2017.
- [85] S. M. A. Mortazavi, P. Tirandazi, M. Normandie, and M. S. Saidi, “Efficient batch-mode mixing and flow patterns in a microfluidic centrifugal platform: a numerical and experimental study,” *Microsyst. Technol.*, vol. 23, no. 7, pp. 2767–2779, Jul. 2017.
- [86] S. Ghadami, R. Kowsari-Esfahan, M. S. Saidi, and K. Firoozbakhsh, “Spiral microchannel with stair-like cross section for size-based particle separation,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 21, no. 7, p. 115, Jul. 2017.
- [87] S.-A. Lee, D. Y. No, E. Kang, J. Ju, D.-S. Kim, and S.-H. Lee, “Spheroid-based three-dimensional liver-on-a-chip to investigate hepatocyte–hepatic stellate cell interactions and flow effects,” *Lab Chip*, vol. 13, no. 18, p. 3529, Aug. 2013.
- [88] J. Ruppen *et al.*, “A microfluidic platform for chemoresistive testing of multicellular pleural cancer spheroids,” *Lab Chip*, vol. 14, no. 6, pp. 1198–1205, Feb. 2014.
- [89] C. H. J. Schmitz, A. C. Rowat, S. Köster, and D. A. Weitz, “Dropspots: a picoliter array in a microfluidic device,” *Lab Chip*, vol. 9, no. 1, pp. 44–49, Jan. 2009.
- [90] Y. Wang and J. Wang, “Mixed hydrogel bead-based tumor spheroid formation and anticancer drug testing,” *Analyst*, vol. 139, no. 10, pp. 2449–2458, Apr. 2014.
- [91] S. Mashaghi, A. Abbaspourrad, D. A. Weitz, and A. M. van Oijen, “Droplet microfluidics: A tool for biology, chemistry and nanotechnology,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 82, pp. 118–125, Sep. 2016.
- [92] D. J. Beebe, G. A. Mensing, and G. M. Walker, “Physics and Applications of Microfluidics in Biology,” *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 4, no. 1, pp. 261–286, Aug. 2002.

- [93] E. K. Sackmann, A. L. Fulton, and D. J. Beebe, “The present and future role of microfluidics in biomedical research,” *Nature*, vol. 507, no. 7491, pp. 181–189, Mar. 2014.
- [94] T. M. Squires and S. R. Quake, “Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale,” *Rev. Mod. Phys.*, vol. 77, no. 3, pp. 977–1026, Oct. 2005.
- [95] A. F. Oliveira, A. C. S. N. Pessoa, R. G. Bastos, and L. G. de la Torre, “Microfluidic tools toward industrial biotechnology,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 32, no. 6, pp. 1372–1389, Nov. 2016.
- [96] C.-X. Zhao and A. P. J. Middelberg, “Two-phase microfluidic flows,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 66, no. 7, pp. 1394–1411, Apr. 2011.
- [97] E. Y. Basova and F. Foret, “Droplet microfluidics in (bio)chemical analysis,” *Analyst*, vol. 140, no. 1, pp. 22–38, Dec. 2015.
- [98] N. Vilanova Garcia, “ADVANCED EMULSION FORMULATIONS FOR THE PREPARATION OF ENCAPSULATING SYSTEMS.”
- [99] R. D. Begg, “Dynamics of continuous segmented flow analysis,” *Anal. Chem.*, vol. 43, no. 7, pp. 854–857, Jun. 1971.
- [100] A. Golberg, M. L. Yarmush, and T. Konry, “Picoliter droplet microfluidic immunosorbent platform for point-of-care diagnostics of tetanus,” *Microchim. Acta*, vol. 180, no. 9–10, pp. 855–860, Jul. 2013.
- [101] C. N. Baroud, F. Gallaire, and R. Danga, “Dynamics of microfluidic droplets,” *Lab Chip*, vol. 10, no. 16, p. 2032, Jul. 2010.
- [102] L. L. A. Adams, T. E. Kodger, S.-H. Kim, H. C. Shum, T. Franke, and D. A. Weitz, “Single step emulsification for the generation of multi-component double emulsions,” *Soft Matter*, vol. 8, no. 41, p. 10719, Oct. 2012.
- [103] D. J. Holt, R. J. Payne, W. Y. Chow, and C. Abell, “Fluorosurfactants for microdroplets: Interfacial tension analysis,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 350, no. 1, pp. 205–211, Oct. 2010.
- [104] J.-S. CHEN and J.-H. JIANG, “Droplet Microfluidic Technology: Mirodroplets Formation and Manipulation,” *Chinese J. Anal. Chem.*, vol. 40, no. 8, pp. 1293–1300, Aug. 2012.
- [105] S.-Y. Park, T.-H. Wu, Y. Chen, M. A. Teitell, and P.-Y. Chiou, “High-speed droplet generation on demand driven by pulse laser-induced cavitation,” *Lab Chip*, vol. 11, no. 6, pp. 1010–2, Mar. 2011.
- [106] T. Thorsen, R. W. Roberts, F. H. Arnold, and S. R. Quake, “Dynamic Pattern

- Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 86, no. 18, pp. 4163–4166, Apr. 2001.
- [107] S. Zeng, B. Li, X. Su, J. Qin, and B. Lin, “Microvalve-actuated precise control of individual droplets in microfluidic devices,” *Lab Chip*, vol. 9, no. 10, p. 1340, May 2009.
- [108] C. Cramer, P. Fischer, and E. J. Windhab, “Drop formation in a co-flowing ambient fluid,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 59, no. 15, pp. 3045–3058, 2004.
- [109] and D. A. W. A. S. Utada, A. Fernandez-Nieves, H. A. Stone, “Dripping to Jetting Transitions in Coflowing Liquid Streams,” *Phys. Rev. Lett.* 99, 2007.
- [110] P. Garstecki, H. A. Stone, and G. M. Whitesides, “Mechanism for Flow-Rate Controlled Breakup in Confined Geometries: A Route to Monodisperse Emulsions,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 94, no. 16, p. 164501, Apr. 2005.
- [111] ElveFlow Plug & Play Microfluidics, “MICROFLUÍDICA-GOTA-GOTEJAMENTO-REGIME-T-JUNÇÃO-Elveflow.” [Online]. Available: <https://www.elflow.com/microfluidic-flow-control-products/microfluidic-application-packs/microfluidic-droplet-generator-pack/microfluidics-droplet-dripping-regime-t-junction-2/>. [Accessed: 25-May-2019].
- [112] R. K. Shah *et al.*, “Designer emulsions using microfluidics,” *Mater. Today*, vol. 11, no. 4, pp. 18–27, Apr. 2008.
- [113] S. Derakhshanfar, R. Mbeleck, K. Xu, X. Zhang, W. Zhong, and M. Xing, “3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances,” *Bioact. Mater.*, vol. 3, no. 2, pp. 144–156, Jun. 2018.
- [114] A. Roy, V. Saxena, and L. M. Pandey, “3D printing for cardiovascular tissue engineering: a review,” *Mater. Technol.*, vol. 33, no. 6, pp. 433–442, May 2018.
- [115] I. T. Ozbolat and I. T. Ozbolat, “Introduction,” in *3D Bioprinting*, Elsevier, 2017, pp. 1–12.
- [116] E. Tumarkin and E. Kumacheva, “Microfluidic generation of microgels from synthetic and natural polymers,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 8, p. 2161, Jul. 2009.
- [117] H. Zhang *et al.*, “Microfluidic Production of Biopolymer Microcapsules with Controlled Morphology,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 37, pp. 12205–12210, Sep. 2006.
- [118] V. Breguet, R. Gugerli, M. Perneti, U. von Stockar, and I. W. Marison, “Formation of Microcapsules from Polyelectrolyte and Covalent Interactions,”

- Langmuir*, vol. 21, no. 21, pp. 9764–9772, Oct. 2005.
- [119] A. Dove, “Cell-based therapies go live,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 20, no. 4, pp. 339–343, Apr. 2002.
- [120] Y. Morimoto and S. Takeuchi, “Three-dimensional cell culture based on microfluidic techniques to mimic living tissues,” *Biomater. Sci.*, vol. 1, no. 3, pp. 257–264, Feb. 2013.
- [121] X. Wang, J. A. Kluge, G. G. Leisk, and D. L. Kaplan, “Sonication-induced gelation of silk fibroin for cell encapsulation,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 8, pp. 1054–1064, Mar. 2008.
- [122] B. Baroli, “Photopolymerization of biomaterials: issues and potentialities in drug delivery, tissue engineering, and cell encapsulation applications,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 81, no. 4, pp. 491–499, Apr. 2006.
- [123] S. Sugiura *et al.*, “Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 16, pp. 3327–3331, Jun. 2005.
- [124] W.-H. Tan and S. Takeuchi, “Monodisperse Alginate Hydrogel Microbeads for Cell Encapsulation,” *Adv. Mater.*, vol. 19, no. 18, pp. 2696–2701, Sep. 2007.
- [125] C. J. Martinez *et al.*, “A Microfluidic Approach to Encapsulate Living Cells in Uniform Alginate Hydrogel Microparticles,” *Macromol. Biosci.*, vol. 12, no. 7, pp. 946–951, Jul. 2012.
- [126] K. Y. Lee and D. J. Mooney, “Alginate: Properties and biomedical applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 1, pp. 106–126, Jan. 2012.
- [127] J.-M. Rabanel, X. Banquy, H. Zouaoui, M. Mokhtar, and P. Hildgen, “Progress technology in microencapsulation methods for cell therapy,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 25, no. 4, pp. 946–963, Jul. 2009.
- [128] J. L. Drury and D. J. Mooney, “Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 24, pp. 4337–51, Nov. 2003.
- [129] O. Khanna, J. C. Larson, M. L. Moya, E. C. Opara, and E. M. Brey, “Generation of Alginate Microspheres for Biomedical Applications,” *J. Vis. Exp.*, no. 66, Aug. 2012.
- [130] S. Akbari and T. Pirbodaghi, “Microfluidic encapsulation of cells in alginate particles via an improved internal gelation approach,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 16, no. 4, pp. 773–777, Apr. 2014.

- [131] J. A. Rowley, G. Madlambayan, and D. J. Mooney, "Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials," *Biomaterials*, vol. 20, no. 1, pp. 45–53, Jan. 1999.
- [132] C. K. Kuo and P. X. Ma, "Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties," *Biomaterials*, vol. 22, no. 6, pp. 511–521, Mar. 2001.
- [133] Z. P. Lum, M. Krestow, I. T. Tai, I. Vacek, and A. M. Sun, "Xenografts of rat islets into diabetic mice. An evaluation of new smaller capsules.," *Transplantation*, vol. 53, no. 6, pp. 1180–3, Jun. 1992.
- [134] G. Orive *et al.*, "Cell encapsulation: Promise and progress," *Nat. Med.*, vol. 9, no. 1, pp. 104–107, Jan. 2003.
- [135] W. M. Fritschy, G. H. Wolters, and R. van Schilfgaarde, "Effect of alginate-polylysine-alginate microencapsulation on in vitro insulin release from rat pancreatic islets.," *Diabetes*, vol. 40, no. 1, pp. 37–43, Jan. 1991.
- [136] Y. G. Park, H. Iwata, and Y. Ikada, "Microencapsulation of islets and model beads with a thin alginate-ba²⁺ gel layer using centrifugation," *Polym. Adv. Technol.*, vol. 9, no. 10–11, pp. 734–739, Oct. 1998.
- [137] S. Utech, R. Prodanovic, A. S. Mao, R. Ostafe, D. J. Mooney, and D. A. Weitz, "Microfluidic Generation of Monodisperse, Structurally Homogeneous Alginate Microgels for Cell Encapsulation and 3D Cell Culture," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 4, no. 11, pp. 1628–1633, Aug. 2015.
- [138] P. Gurav, "Ionotropic Gelation and Polyelectrolyte Complexation Technique: Novel approach for Drug Encapsulation," 2016.
- [139] D. J. McClements, "Theoretical Analysis of Factors Affecting the Formation and Stability of Multilayered Colloidal Dispersions," *Langmuir*, vol. 21, no. 21, pp. 9777–9785, Oct. 2005.
- [140] C. Bienaimé, J.-N. Barbotin, and J.-E. Nava-Saucedo, "How to build an adapted and bioactive cell microenvironment? A chemical interaction study of the structure of Ca-alginate matrices and their repercussion on confined cells," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 67A, no. 2, pp. 376–388, Nov. 2003.
- [141] C.-H. Choi, J.-H. Jung, Y. W. Rhee, D.-P. Kim, S.-E. Shim, and C.-S. Lee, "Generation of monodisperse alginate microbeads and in situ encapsulation of cell in microfluidic device," *Biomed. Microdevices*, vol. 9, no. 6, pp. 855–862, Oct. 2007.

- [142] J. L. Madrigal *et al.*, “Microfluidic generation of alginate microgels for the controlled delivery of lentivectors,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, no. 43, pp. 6989–6999, Nov. 2016.
- [143] W. Chen *et al.*, “Microfluidic one-step synthesis of alginate microspheres immobilized with antibodies,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 10, no. 88, pp. 20130566–20130566, Aug. 2013.
- [144] D. C. Bassett, A. G. Håti, T. B. Melø, B. T. Stokke, and P. Sikorski, “Competitive ligand exchange of crosslinking ions for ionotropic hydrogel formation,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, no. 37, pp. 6175–6182, Sep. 2016.
- [145] S. Sugiura *et al.*, “Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 16, pp. 3327–3331, Jun. 2005.
- [146] C. M. Silva, A. J. Ribeiro, I. V. Figueiredo, A. R. Gonçalves, and F. Veiga, “Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability,” *Int. J. Pharm.*, vol. 311, no. 1–2, pp. 1–10, Mar. 2006.
- [147] S. Xu *et al.*, “Generation of Monodisperse Particles by Using Microfluidics: Control over Size, Shape, and Composition,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 44, no. 5, pp. 724–728, Jan. 2005.
- [148] M. Zourob *et al.*, “A micro-reactor for preparing uniform molecularly imprinted polymer beads,” *Lab Chip*, vol. 6, no. 2, p. 296, Feb. 2006.
- [149] D. Saeki, S. Sugiura, T. Kanamori, S. Sato, and S. Ichikawa, “Formation of monodisperse calcium alginate microbeads by rupture of water-in-oil-in-water droplets with an ultra-thin oil phase layer,” *Lab Chip*, vol. 10, no. 17, p. 2292, Sep. 2010.
- [150] H. Zhang *et al.*, “Microfluidic Production of Biopolymer Microcapsules with Controlled Morphology,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 37, pp. 12205–12210, Sep. 2006.
- [151] D. A. W. A. S. Utada, E. Lorenceau, D. R. Link, P. D. Kaplan, H. A. Stone, “Monodisperse Double Emulsions Generated from a Microcapillary Device,” vol. 308, 2005.
- [152] T. P. Lagus and J. F. Edd, “A review of the theory, methods and recent applications of high-throughput single-cell droplet microfluidics,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 46, no. 11, p. 114005, Mar. 2013.
- [153] P. W. Chen, R. M. Erb, and A. R. Studart, “Designer Polymer-Based

- Microcapsules Made Using Microfluidics,” *Langmuir*, vol. 28, no. 1, pp. 144–152, Jan. 2012.
- [154] L. Wu, X. Liu, Y. Zhao, and Y. Chen, “Role of local geometry on droplet formation in axisymmetric microfluidics,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 163, pp. 56–67, 2017.
- [155] G. F. Christopher and S. L. Anna, “Microfluidic methods for generating continuous droplet streams,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 40, no. 19, pp. R319–R336, Oct. 2007.
- [156] R. K. Shah *et al.*, “Designer emulsions using microfluidics,” *Mater. Today*, vol. 11, no. 4, pp. 18–27, Apr. 2008.
- [157] World Precision Instruments, “Microelectrode Puller (PUL-1000).” [Online]. Available: <https://www.wpiBrasil.com.br/microelectrode-puller-pul-1000.html>. [Accessed: 05-May-2019].
- [158] A. S. Chaurasia, F. Jahanzad, and S. Sajjadi, “Flexible microfluidic fabrication of oil-encapsulated alginate microfibers,” *Chem. Eng. J.*, vol. 308, pp. 1090–1097, Jan. 2017.
- [159] H. Liu, M. Nakajima, and T. Kimura, “Production of monodispersed water-in-oil emulsions using polymer microchannels,” *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 81, no. 7, pp. 705–711, Jul. 2004.
- [160] J. Clausell-Tormos *et al.*, “Droplet-Based Microfluidic Platforms for the Encapsulation and Screening of Mammalian Cells and Multicellular Organisms,” *Chem. Biol.*, vol. 15, no. 5, pp. 427–437, May 2008.
- [161] K. C. Lowe, M. R. Davey, and J. B. Power, “Perfluorochemicals: their applications and benefits to cell culture,” *Trends Biotechnol.*, vol. 16, no. 6, pp. 272–7, Jun. 1998.
- [162] R. L. Scott, “The Solubility of Fluorocarbons ¹,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 70, no. 12, pp. 4090–4093, Dec. 1948.
- [163] L. Mazutis, J. Gilbert, W. L. Ung, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, and J. A. Heyman, “Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics,” *Nat. Protoc.*, vol. 8, no. 5, pp. 870–91, May 2013.
- [164] T. Nisisako and T. Torii, “Microfluidic large-scale integration on a chip for mass production of monodisperse droplets and particles,” *Lab Chip*, vol. 8, no. 2, pp. 287–293, Jan. 2008.
- [165] A. F. Oliveira, “Desenvolvimento De Sistemas Microfluídicos Para Produção De

- Lipase Por Bacillus Subtilis Imobilizado Em Micropartículas De Alginato,”
Campinas.
- [166] Z. Nie *et al.*, “Emulsification in a microfluidic flow-focusing device: effect of the viscosities of the liquids,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 5, no. 5, pp. 585–594, Nov. 2008.
- [167] J. D. Wehking, M. Gabany, L. Chew, and R. Kumar, “Effects of viscosity, interfacial tension, and flow geometry on droplet formation in a microfluidic T-junction,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 16, no. 3, pp. 441–453, Mar. 2014.
- [168] A. Dove, “Drug screening—beyond the bottleneck,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 17, no. 9, pp. 859–863, Sep. 1999.
- [169] V. Chokkalingam *et al.*, “Probing cellular heterogeneity in cytokine-secreting immune cells using droplet-based microfluidics,” *Lab Chip*, vol. 13, no. 24, p. 4740, Nov. 2013.
- [170] A. Rakszewska, J. Tel, V. Chokkalingam, and W. T. Huck, “One drop at a time: toward droplet microfluidics as a versatile tool for single-cell analysis,” *NPG Asia Mater.*, vol. 6, no. 10, pp. e133–e133, Oct. 2014.
- [171] A. G. Håti, D. C. Bassett, J. M. Ribe, P. Sikorski, D. A. Weitz, and B. T. Stokke, “Versatile, cell and chip friendly method to gel alginate in microfluidic devices,” *Lab Chip*, vol. 16, no. 19, pp. 3718–3727, Sep. 2016.
- [172] H. Hirama, T. Kambe, K. Aketagawa, T. Ota, H. Moriguchi, and T. Torii, “Hyper Alginate Gel Microbead Formation by Molecular Diffusion at the Hydrogel/Droplet Interface,” *Langmuir*, vol. 29, no. 2, pp. 519–524, Jan. 2013.
- [173] I. Donati and S. Paoletti, “Material Properties of Alginates,” Springer, Berlin, Heidelberg, 2009, pp. 1–53.
- [174] L. W. Chan, H. Y. Lee, and P. W. S. Heng, “Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 63, no. 2, pp. 176–187, Feb. 2006.
- [175] S. Mazzitelli, M. Borgatti, G. Breveglieri, R. Gambari, and C. Nastruzzi, “Encapsulation of eukaryotic cells in alginate microparticles: cell signaling by TNF-alpha through capsular structure of cystic fibrosis cells,” *J. Cell Commun. Signal.*, vol. 5, no. 2, pp. 157–65, Jun. 2011.
- [176] N. W. Choi, M. Cabodi, B. Held, J. P. Gleghorn, L. J. Bonassar, and A. D. Stroock, “Microfluidic scaffolds for tissue engineering,” *Nat. Mater.*, vol. 6, no. 11, pp. 908–915, Nov. 2007.

- [177] L. Mazutis, R. Vasiliauskas, and D. A. Weitz, “Microfluidic Production of Alginate Hydrogel Particles for Antibody Encapsulation and Release,” *Macromol. Biosci.*, vol. 15, no. 12, pp. 1641–1646, Dec. 2015.
- [178] J. D. Tice, A. D. Lyon, and R. F. Ismagilov, “Effects of viscosity on droplet formation and mixing in microfluidic channels,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 507, no. 1, pp. 73–77, Apr. 2004.
- [179] J. H. Xu, S. W. Li, J. Tan, and Y. J. Wang, and G. S. Luo*, “Controllable Preparation of Monodisperse O/W and W/O Emulsions in the Same Microfluidic Device,” 2006.
- [180] E. Kumacheva and P. Garstecki, *Microfluidic reactors for polymer particles*. Wiley, 2011.