



PROJETO, FABRICAÇÃO E ENSAIO DE DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO PARA
SEPARAÇÃO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS BASEADO NO EFEITO
ZWEIFACH-FUNG

Jordana Colman

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Mecânica, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica.

Orientadora: Carolina Palma Naveira Cotta

Rio de Janeiro
Outubro de 2017

PROJETO, FABRICAÇÃO E ENSAIO DE DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO PARA
SEPARAÇÃO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS BASEADO NO EFEITO
ZWEIFACH-FUNG

Jordana Colman

TESE 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 DOUTOR EM CIÊNCIAS EM
ENGENHARIA MECÂNICA.

Examinada por:

Profa. Carolina Palma Naveira Cotta, D.Sc.

Prof. Renato Machado Cotta, Ph.D.

Prof. Fernando Pereira Duda, D.Sc.

Profa. Luciana Pizzatti Barboza, Ph.D.

Prof. Tiago Albertini Balbino, D.Sc.

Profa. Ana Rosa Lopes Pereira Ribeiro, Ph.D.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

OUTUBRO DE 2017

Colman, Jordana

Projeto, fabricação e ensaio de dispositivo microfluídico para separação de células sanguíneas baseado no efeito Zweifach-Fung/ Jordana Colman. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2017.

XXIV, 176 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadora: Carolina Palma Naveira Cotta

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Mecânica, 2017.

Referências Bibliográficas: p. 170-174.

1. Microseparadores. 2. Fotolitografia. 3. Efeito Zweifach-Fung. 4. PDMS. I. Cotta, Carolina Palma Naveira II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Mecânica. III. Título.

"Posso pegar meu telescópio e ver milhões de quilômetros de distância no espaço; mas também posso pôr meu telescópio de lado, ir para o meu quarto, fechar a porta e, em oração fervorosa, ver mais do Céu e me aproximar mais de DEUS do que quando estou equipado com todos os telescópios e instrumentos do mundo."

(Isaac Newton)

"Existem apenas dois modos de viver a vida: um é como se nada fosse milagre; o outro é como se tudo fosse um milagre. Eu acredito no último."

(Albert Einstein)

A Deus e a minha família.

Agradecimentos

Estas poucas linhas jamais expressarão toda a gratidão que tenho em meu coração, assim como todas as dificuldades que passei, pessoas que deixei de conviver para ir em busca de um sonho e que sempre estiveram ao meu lado e aquelas que sempre me ajudaram e apoiaram de alguma forma, seja através de um abraço, entendendo a minha ausência ou uma simples conversa de desabafo.

A memória infelizmente é falha, portanto, desde já peço desculpas àquelas que não estão presentes entre essas linhas, mas elas podem estar certas que fazem parte desse trabalho e da minha gratidão.

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.

Agradeço à Profa. Dra. Carolina Palma Naveira Cotta, sem a qual esse trabalho não seria possível, por sua dedicação, carinho, compreensão e palavras de apoio e direcionamento.

Agradeço aos professores: Prof. Dr. Renato Machado Cotta, à Profa. Dra. Mila Rosendal Avelino, ao Dr. Christopher Peter Tostado, Prof. Dr. Fernando Pereira Duda e Prof. Dr. Jair Koiller pela participação na banca de qualificação e por suas inúmeras cooperações.

Agradeço ao Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD), o qual é associado ao Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC), vinculado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IQ – UFRJ), pela colaboração, doação de amostras e também leitura dos resultados obtidos neste trabalho. Dentre as pessoas deste laboratório, agradeço especialmente a Profa. Dra. Luciana Pizzatti Barboza pela colaboração, ajuda em experimentos e também suas amadas alunas, Gabriella Poralla, Nicole Woldmar e Letícia Giacomini. Agradeço também a colaboração da Profa. Gracy Canto Gomes Marcello pela colaboração em conseguir amostras de sangue canino para a análise da eficiência do microseparador aplicado a animais.

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! Sempre estiveram ao meu lado e como ninguém mais entenderam o que se passava naquele momento e auxiliaram, sejam com palavras ou direcionamentos: Kelvin, Martim, Daduí,

Mylena, Gabriel, Vinícuís, Diego, Carlos Eduardo, Chris, Ivana, Douglas e Ivana Gabriela.

Aos funcionários da UFRJ: Vera, Paulo Cezar e Paulo Veiga por ajudas diversas.

A todos os familiares, em especial à minha mãe, Cecília, ao meu pai Osmir, aos meus irmãos Junior e Joelmir, a minha afilhada Nicole, minha sobrinha Jéssica, minha cunhada Sandra, todos os meus tios, tias e primos que sempre demonstraram preocupação e zelo.

Ao meu marido Maxwell que sempre esteve ao meu lado, com carinho, admiração, apoio e principalmente paciência, entendendo e auxiliando nessa caminhada.

Às amigas e amigos cariocas, paranaenses, paraenses, de todos os cantos do Brasil e exterior, que por sua amizade, apoio, entendendo a minha ausência e estando ao meu lado sempre. A amizade é o amor que nunca morre.

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

À CAPES pelo auxílio financeiro.

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

PROJETO, FABRICAÇÃO E ENSAIO DE DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO PARA
SEPARAÇÃO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS BASEADO NO EFEITO
ZWEIFACH-FUNG

Jordana Colman

Outubro/2017

Orientadora: Carolina Palma Naveira Cotta

Programa: Engenharia Mecânica

A separação e classificação de células sanguíneas são utilizadas de uma forma abrangente dentro da medicina: diagnóstico, terapêutica e biologia celular. O sangue, por ser um tecido de fácil acesso e rico em informações, é o material mais utilizado. No entanto, sua mistura é complexa, e a sua separação é necessária para uma análise mais precisa. Existem várias técnicas convencionais para separação de células, todavia estas técnicas são frequentemente trabalhosas e exigem vários passos e rotulações para identificar células e pacientes. Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo apresentar e contribuir com a fabricação de baixo custo de microseparadores de células baseados na lei de bifurcação (ou Efeito de Zweifach-Fung). Os moldes dos dispositivos foram fabricados em acrílico sem a necessidade de uma sala limpa e os microseparadores foram moldados em dois diferentes polímeros: Uretana-Acrltato (UA) e polidimetilsiloxano (PDMS). Simulações foram realizadas na caracterização do microseparador: ângulos entre as bifurcações, velocidades médias de entrada e quantidade de partículas presente no escoamento. Verificando o modelo computacional adotado com resultados experimentais com perfil de velocidade adquirido por meio de micro-PIV, balanço de massa e casos reais fazendo uso de sangue humano e animal. Comparando os resultados apresentados pela literatura, estudos teóricos e experimentais, verificou-se que a eficiência de separação tem valores próximos e assim os métodos adotados no presente estudo foram pertinentes.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

DESIGN, MANUFACTURE AND TESTING OF A MICROFLUIDAL DEVICE FOR SEPARATION OF BLOOD CELLS BASED ON THE ZWEIFACH-FUNG EFFECT

Jordana Colman

October/2017

Advisor: Carolina Palma Naveira Cotta

Department: Mechanical Engineering

The separation and classification of blood cells are used in a comprehensive way within medicine: diagnosis, therapy and cell biology. Blood, being an easily accessible and information-rich tissue, is the most widely used material. However, its mixing is complex, and their separation is necessary for a more accurate analysis. There are several conventional techniques for cell separation, however these techniques are often laborious and require several steps and labeling to identify cells and patients. In this context, the present work aims to present and contribute to a low-cost manufacture of cell microseparation based on the bifurcation law (or Zweifach-Fung Effect). The molds of the devices were manufactured in acrylic without the necessity of a clean-room and the microseparations were molded in two different polymers: Urethane-Acrlitato (UA) and polydimethylsiloxane (PDMS). Simulations were carried out in the characterization of the microseparator: angles between the bifurcations, mean velocities of entry and quantity of particles present in the flow. Verifying the computational model adopted with experimental results with speed profile acquired through micro-PIV, mass balance and real cases using human and animal blood. Comparing the results presented by the literature, theoretical and experimental studies, it was verified that the separation efficiency has close values and thus the methods adopted in the present study were pertinent.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Motivação e objetivos	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 Métodos de microseparação.....	10
2.1.1 Separação por técnicas passivas	14
2.1.1.1 Fracionamento de fluido por compressão	14
2.1.1.2 Fracionamento de fluido por inércia.....	16
2.1.1.3 Manipulação de microvortex.....	18
2.1.1.4 Deslocamento lateral determinístico – DLD	19
2.1.1.5 Filtração.....	21
2.1.1.6 Filtração hidrodinâmica.....	22
2.1.1.7 Microhidrociclone.....	23
2.1.1.8 Efeito Zweifach-Fung – Lei da Bifurcação.....	25
3. PROJETO DO MICROSSEPARADOR	36
3.1 Fundamentos teóricos de microseparação com bifurcação.....	37
3.2 As equações do movimento.....	38
3.3 Parâmetros construtivos do projeto para o microdispositivo	40
3.4 Microdispositivos projetado com base nos resultados dos parâmetros construtivos.....	43
4. ANÁLISE TEÓRICA.....	50
4.1 Modelo Físico e Matemático	50
4.1.1 Modelo Físico	51
4.1.2 Modelo Matemático.....	52
4.2 Método de solução e implementação computacional.....	53
4.3 Verificação computacional	62
5. FABRICAÇÃO DOS MICROSSEPARADORES.....	73

5.1	Molde em polimetilmetacrilato (PMMA).....	73
5.1.1	Fabricação do molde em PMMA	73
5.1.2	Caracterização do molde fabricado em PMMA.....	82
5.2	Microdispositivos em Uretana-Acrilato (UA).....	87
5.2.1	Fabricação em UA.....	87
5.2.2	Caracterização do microdispositivo em UA	93
5.2.3	Selagem do microdispositivo em UA	96
5.3	Microdispositivo em polidimetilsiloxano (PDMS)	102
5.3.1	Fabricação em PDMS	102
5.3.2	Caracterização do microdispositivo em PDMS	109
5.3.3	Selagem dos microseparadores em PDMS	112
6.	ANÁLISE EXPERIMENTAL	120
6.1	Montagem da bancada experimental para o balanço de massa dos microseparadores fabricados em UA e PDMS.....	120
6.2	Micro-PIV.....	123
6.3	Verificação com material biológico.....	127
6.3.1	Coleta e preparação de material biológico	127
6.4	Uso do microdispositivo em sangue canino	131
7.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	135
7.1	Resultado Teórico.....	135
7.2	Resultados da Fabricação dos Microcanais.....	142
7.2.1	Molde em PMMA.....	142
7.2.2	Microdispositivo fabricado em UA	144
7.2.3	Microdispositivo fabricado em PDMS	147
7.3	Resultados Experimentais	154
7.3.2	Balanço de massa para os microseparadores fabricados com os polímeros UA e PDMS.....	156
7.3.3	Verificação com sangue humano	159
7.3.4	Análise de microseparação em sangue canino.....	164
8.	CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS	167

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	170
APÊNDICE 1	175

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Perfil de velocidade sanguínea (Lima R. I., 2012).....	9
Figura 2.2: Classificação de vários métodos de triagem e separação aplicados em microfluidica, adaptado de (Sajeesh, P., et al., 2014).	13
Figura 2.3: Design do microseparador para aplicar a técnica de separação passiva de fracionamento de fluido por compressão (Sajeesh, P., et al., 2014).....	16
Figura 2.4: Separação inercial: (a) fluxo entre um par de contração-dilatação numa matriz em um canal em linha reta. (b) Caminho de partículas com trocas de momentum entre partículas e do fluido, adaptado de (Sajeesh, P., et al., 2014).	18
Figura 2.5: Posição das partículas na técnica de separação passiva de microvortex, adaptado de (Sajeesh, P., et al., 2014).....	19
Figura 2.6: (a) Um esquema de um elemento de deslocamento lateral determinístico com uma coluna colocado em um ângulo com a direção do fluxo. (b) Arranjo de matriz retangulares rodeadas de colunas. (c) Colunas de postes romboédricos, onde λ é a distância entre os centros das colunas, adaptado de (Sajeesh, P., et al., 2014).....	20
Figura 2.7: Diagramas esquemáticos de projetos microfiltro: (a) uma vista lateral do filtro <i>weir</i> ; (b) visão de cima do filtro pilar; (c) visão de cima do filtro <i>cross-flow</i> ;.....	21
Figura 2.8: (a-c) Comportamento de partículas para várias vazões no canal lateral (Sajeesh, P., et al., 2014).	23
Figura 2.9: (a) Desenho do dispositivo de microfluidos com um microhidrociclone para separação de partículas de líquido, (b) câmara de microhidrociclone (Sajeesh, P., et al., 2014).	25
Figura 2.10: (a) Bifurcação com diferentes gradientes de pressão e tensão de cisalhamento na partícula, (b) ponto de estagnação que ocorre na bifurcação, adaptado de (Sajeesh, P., et al., 2014).....	27
Figura 2.11: (a) Chip de marginação para a remoção do agente patogénico a partir do sangue (b) Vista em corte transversal na entrada e na saída de microcanais (Kersaudy-Kerhoas, 2010).	30
Figura 2.12: Efeito Fahraeus-Lindqvist. A viscosidade relativa aparente do sangue diminui com o diâmetro do canal até quase ao nível da viscosidade plástica (linha preenchida). A parte da curva tracejada representa o fenômeno de inversão, em que a viscosidade aparente aumenta substancialmente quando o diâmetro do canal atinge valores equivalentes aos diâmetros dos eritrócitos (Silva J. A., 1984).	31
Figura 2.13: Distribuição da velocidade através de um vaso sanguíneo, resultante das forças de pressão na corrente laminar. Em (i) a velocidade de deslocação nas	

proximidades da parede do canal é inferior à verificada no eixo, em que atinge valores máximos. Como consequência os eritrócitos deslocam-se preferencialmente para as camadas axiais, orientando-se em elipsoides (ii). À medida que o diâmetro vascular diminui acentua-se a deformação dos eritrócitos que, migrando mais rapidamente ao longo do eixo do tubo, ocasionam a redução do hematócrito (Efeito Fahraeus). Paralelamente, forma-se uma camada envolvente de plasma que se desloca mais lentamente que os eritrócitos (Silva J. A., 1984).	31
Figura 2.14: (a) Separação do plasma em um canal em linha reta, (b) células dentro microcanal livre de plasma (c-e) desnatação plasmática em um microcanal com estruturas de cavidade, expansão constrição e alargamento, respectivamente (Sajeesh, P., et al., 2014).	33
Figura 2.15: Microseparadores com múltiplas bifurcações juntamente com o canal de entrada para aumentar o rendimento (Sajeesh & Sen, 2014) (Kersaudy-Kerhoas, 2010).	33
Figura 2.16: (a) Estrutura do difusor de Nozzle conectado a um canal em espiral e (b) combinação do Efeito Zweifach–Fung e efeito de força centrífuga (Sajeesh & Sen, 2014) (Zhaoxin Geng et al., 2011).	34
Figura 3.1: Esquema da estrutura de separação baseado no Efeito	38
Figura 3.2: (a) Sistema de coordenadas adotado para representação do microcanal. A direção x representa a largura, a direção z representa a altura e a direção y é a direção principal do escoamento do fluido. (b) Perfil do microcanal com destaque para a direção do escoamento do fluido.	39
Figura 3.3: Similaridade física entre vazão elétrica e vazão de um fluido. (a) Fluido de Poiseuille em um duto circular, (b) a resistência hidráulica em um canal circular, (c) símbolo de um resistor como se fosse uma resistência hidráulica do fluido da Lei de Hagen-Poiseuille em analogia com a Lei de Ohm, (d) resistor elétrico, (e) resistência elétrica e (e) símbolo de um circuito com resistor elétrico e Lei de Ohm (Kwang W. Oh, et al., 2012).	41
Figura 3.4: Microdispositivo projetado com largura de entrada de 400 μm e comprimento de 10 mm, bifurcação maior com largura de 400 μm e comprimento de 2 mm e bifurcação menor com 100 μm e 20 mm, com angulo entre as bifurcações de 90° e altura padrão de 50 μm	44
Figura 3.5: Gráfico ilustrativo da Tabela 3.5 o que apresenta que quanto menor a vazão de entrada e no canal do plasma, maior será a porcentagem de eficiência de separação entre as partículas, adaptado de (Zhaoxin Geng et al., 2011).	47

Figura 3.6: Desenho do microseparador fabricado para testar a relação entre as vazões entre as bifurcações.....	48
Figura 3.7: Sequência do fluido escoando pelo microdispositivo saindo pela saída menor.	49
Figura 4.1: Dimensões do microseparador estudado, medidas em μm e mm	51
Figura 4.2: Sistemas de coordenadas na base do microseparador para facilitar os estudos.....	52
Figura 4.3: Interface do COMSOL <i>Multiphysics</i> 5.2 para implementação do problema.	54
Figura 4.4: Detalhes da janela construtor de modelo.	56
Figura 4.5: Comando extrude, o qual é responsável por dar a altura desejada ao microseparador com altura de 0,05 mm.	57
Figura 4.6: Microseparador “extrudado” para 0,05 mm de altura.....	57
Figura 4.7: Ângulos simulados entre as bifurcações para verificar a influência deste sobre sua eficiência de separação.....	58
Figura 4.8: Comando <i>Laminar Flow</i> , onde pode-se escolher a posição da entrada do fluido e hipóteses de escoamento.....	60
Figura 4.9: Aba <i>mesh</i> a qual é possível controlar os parâmetros de malha.	61
Figura 4.10: Comparativo entre as malhas estudadas com os valores de geometria projetados no início do estudo. Percebe-se que o padrão de formação muda na região de bifurcação, havendo mudança significativa entre as malhas 1 e 6.	64
Figura 4.11: Desenho esquemático usado para a verificação da distribuição de pressão, para as geometrias projetadas inicialmente.	65
Figura 4.12: Imagens das posições selecionadas para a análise do perfil de velocidades.	66
Figura 4.13: Gráfico com o perfil de velocidade apresentando convergência para número de distribuição fixa, medido no ponto 1 apresentado na Figura 4.12.....	67
Figura 4.14: Gráfico com o perfil de velocidade apresentando convergência para número de distribuição fixo, medido no ponto 2 apresentado na Figura 4.12.....	67
Figura 4.15: Gráfico com o perfil de velocidade apresentando convergência para número de distribuição fixo, medido no ponto 3 apresentado na Figura 4.12.....	67
Figura 4.16: Gráfico do erro relativo entre malhas 1 a 5 com a malha 6.	69
Figura 4.17: Comando <i>Particle tracing for fluid flow e studys</i> 1 e 2.	71
Figura 5.1: Estrutura química do polimetilmetacrilato (PMMA), (a) espacial e (b) plana.	74
Figura 5.2: Vista superior do microseparador que foram fabricado em PMMA utilizando a microfresadora CNC- <i>Minitech Machinery</i>	75

Figura 5.3: Detalhes das dimensões do microdispositivo com profundidade de 0,05, escala em mm, relacionado com a Figura 5.2.....	76
Figura 5.4: (a) Bancada de microfresamento CNC - <i>Minitech Machinery</i> e (b) detalhe da microfresadora.....	77
Figura 5.5: Fresa de 3000 μm de diâmetro usada para o rebaixamento, (a) vista do topo e (b) vista de perfil.	78
Figura 5.6: Fresa de 500 μm de diâmetro usada para o um primeiro refinamento dos microcanais, (a) vista do topo e (b) vista de perfil.	78
Figura 5.7: Fresa de 50 μm de diâmetro usada para o refinamento dos contornos dos microcanais, (a) vista de topo e (b) vista de perfil.	79
Figura 5.8: Etapas do processo de fabricação do molde em PMMA utilizando as fresas apresentadas na Tabela 5.1.	79
Figura 5.9: Detalhe da fabricação do molde em PMMA na microfresadora de controle numérico computadorizado (CNC) da empresa “ <i>Minitech Machinery</i> ”.	80
Figura 5.10: Interface gráfica do software “ <i>MecSoft VisualCad 2012</i> ”.	81
Figura 5.11: Desenho esquemático do molde fabricado em PMMA.	81
Figura 5.12: Molde em PMMA confeccionado pela microfresa.....	82
Figura 5.13: Microscópio digital <i>Hirox Digital Microscope</i> modelo <i>KH.8700</i> efetuando a caracterização do microseparador.	83
Figura 5.14: Posição de onde foram realizadas as medidas de altura, largura e profundidade, de 3 a 5 medidas em cada ponto.	83
Figura 5.15: Visualização do molde em PMMA para a fabricação do microseparador em UA, com altura de 50 μm como projetado e apresentado na Tabela 5.2.	84
Figura 5.16: Medidas de largura (seta da horizontal) e profundidade (seta da vertical) no microcanal de entrada próximo a região de bifurcação no molde em PMMA fabricado pela microfresa.	85
Figura 5.17: Medidas de largura (seta da horizontal) e profundidade (seta da vertical) no microcanal da bif. maior próximo a região de bifurcação no molde em PMMA fabricado pela microfresa.	85
Figura 5.18: Medidas de largura (seta da horizontal) e profundidade (seta da vertical) no microcanal da bif. menor próximo a região de bifurcação no molde em PMMA fabricado pela microfresa.	86
Figura 5.19: Fluxograma de fabricação do molde em PMMA para confecção de microdispositivos.	87
Figura 5.20: Estrutura típica de um oligômero Uretana-Acrilato, (a) espacial e (b) plana.	88

Figura 5.21: Banho-maria da fotorresina cujo objetivo é diminuir sua viscosidade, onde em verde é a água aquecida, usada somente para dar um contraste e apresentar melhor a UA que é transparente e está contida dentro do copo de plástico.....	89
Figura 5.22: Sensor utilizado para medir a temperatura da UA após aquecida.....	89
Figura 5.23: Deposição da fotorresina aquecida no molde.	90
Figura 5.24: (a) Bolhas que se formam devido a agitação da fotorresina para homogeneização da temperatura e deposição no molde (b) molde contendo a fotorresina após o ambiente com vácuo.....	90
Figura 5.25: (a) Dessecador com vácuo para a retirada das bolhas e (b) bomba de alto vácuo JB-Platinum, duplo estágio de 5CFM.	91
Figura 5.26: Máquina fotoexpositora (processadora de carimbos), utilizada no presente trabalho.....	92
Figura 5.27: Dispositivo de polímero UA removido do molde de acrílico.	92
Figura 5.28: Banho de ultrassom utilizado no processo de limpeza.	93
Figura 5.29: Visualização do microseparador fabricado em UA.	94
Figura 5.30: Microscopia 3D do microcanal com profundidade de 50 μm (seta da vertical) para a entrada (seta da horizontal) de 400 μm próxima a região de bifurcação e assinalado no canto superior esquerdo, fabricado em UA.	95
Figura 5.31: Microscopia 3D do microcanal com profundidade de 50 μm (seta da vertical) para a bif. maior (seta da horizontal) de 400 μm próxima a região de bifurcação e assinalado no canto superior esquerdo fabricado em UA.	95
Figura 5.32: Microscopia 3D do microcanal com profundidade de 50 μm (seta da vertical) para a bif. menor de 100 μm (seta da horizontal) próxima a região de bifurcação e assinalado no canto superior esquerdo, fabricado em UA.	96
Figura 5.33: <i>Punch</i> dermatológico com diâmetro interno de 1,25mm utilizado para realizar as furações para a conexão das mangueiras com o meio externo.	97
Figura 5.34: Desenho esquemático do microseparador com os furos de entrada e saída dos microcanais antes de sua selagem e sua tampa em UA.	97
Figura 5.35: Esquema do procedimento de selagem. (a) Exposição da resina na fabricação da tampa; (b) tampa de resina com superfície não polimerizada; (c) união da tampa com placa contendo os canais; (d) aplicação do fluxo de argônio gasoso para geração de atmosfera livre de oxigênio; (e) exposição final para selagem irreversível do sistema (Jr, 2012) (Fonseca, 2008).	98
Figura 5.36: Sonda para aspiração traqueal número 04 da Mark Med com diâmetro externo de 1,3mm.....	99
Figura 5.37: Desenho esquemático do microseparador depois de selado com as conexões de entrada e saída dos microcanais.	99

Figura 5.38: Microdispositivo fabricado em UA através de molde em PMMA através de litografia macia e ligado com o meio externo.	100
Figura 5.39: Fluxograma do processo de fabricação do microseparador em UA.....	101
Figura 5.40: Estrutura química do polidimetilsiloxano, (a) espacial e (b) plana.	103
Figura 5.41: PDMS Sylgard 184 da empresa Dow Corning.....	104
Figura 5.42: (a) Pesagem do pré-polímero com o agente de cura e (b) mistura de ambos.	104
Figura 5.43: (a) Bolhas resultantes da mistura entre o pré-polímero e o agente de cura para a formação do PDMS e (b) polímero levado ao vácuo durante 1h para a remoção destas bolhas.....	105
Figura 5.44: Capela de fluxo laminar vertical da marca Filterflux - modelo: flv 656/3, onde foram lavados os materiais e selados os microdispositivos fabricados em PDMS, mostrando a disposição dos equipamentos: chapa quente, frascos, molde em acrílico, vidro e <i>punch</i>	106
Figura 5.45: Uma das etapas de lavagem do (a) molde em acrílico e (b) placa de vidro, dentro da capela de fluxo laminar vertical.	107
Figura 5.46: Placa aquecedora Fisatom utilizada para a secagem do molde e placa de vidro após a lavagem.....	107
Figura 5.47: PDMS sendo depositado sobre o molde de acrílico, o mesmo usado para a fabricação dos microdispositivos em UA, dentro da capela de fluxo laminar vertical, com luvas sem talco.	108
Figura 5.48: (a) PDMS sendo removido do molde após a cura em chapa quente, (b) após ser removido por completo comparado com o molde e (c) detalhe do microcanal fabricado.....	109
Figura 5.49: Visualização do microseparador fabricado em PDMS, cuja entrada possui 400 μm , a bif. maior tem dimensão de 400 μm e a bif. menor tem 100 μm , como projetado e apresentado na Tabela 3.2.	110
Figura 5.50: Microscopia 3D do canal da entrada de 400 μm (seta na horizontal) fabricado em PDMS do microseparador com profundidade de 50 μm (seta na vertical), medida tomada próximo a região de bifurcação e assinalado no canto superior esquerdo.....	111
Figura 5.51: Microscopia 3D da bif. maior de 400 μm (seta na horizontal) fabricado em PDMS do microseparador com profundidade de 50 μm (seta na vertical), medida tomada próximo a região de bifurcação e assinalado no canto superior esquerdo. ..	111
Figura 5.52: Microscopia 3D da bif. menor de 100 μm (seta da horizontal), próximo a região de bifurcação assinalado no canto superior esquerdo, fabricado em PDMS microseparador com profundidade de 50 μm (seta da vertical).	112

Figura 5.53: Desenho esquemático da selagem com PDMS, vidro e PDMS, ainda sem as ligações com o meio externo.....	113
Figura 5.54: (a) Desenho esquemático da colocação da placa de vidro sobre os microcanais na base fabricada em PDMS deixando uma borda, (b) foto do procedimento sendo realizado.	114
Figura 5.55: Deposição de PDMS sobre o conjunto: placa de vidro e base contendo o microdispositivo.	114
Figura 5.56: Estufa da marca Sterilifer utilizada para a segunda parte do processo de cura do PDMS.	115
Figura 5.57: Resumo da selagem de PDMS utilizando vidro sem plasma.....	115
Figura 5.58: Encaixe da mangueira (sonda de aspiração traqueal) que fez a ligação com o meio externo.	116
Figura 5.59: (a) Desenho esquemático da selagem com PDMS, vidro e PDMS já com as conexões, (b) foto do mesmo dispositivo ainda sem a ligação com o meio externo e (c) microdispositivo pronto para uso.	117
Figura 5.60: Fluxograma do processo de fabricação do microseparadores em PDMS (* dentro de capela de fluxo laminar vertical).	118
Figura 6.1: Aparato experimental na montado para o balanço de massa dos microdispositivos fabricados em UA e PDMS, (a) mostrado de forma esquemática e (b) mostrado na forma de foto.	121
Figura 6.2: Microdispositivo sendo utilizado para o balanço de massa (a) fabricado em PDMS e (b) fabricado em UA.....	122
Figura 6.3: Medida do campo de velocidade utilizando o Micro-PIV no microseparador fabricado em PDMS.....	125
Figura 6.4: Partícula fluorescente, rodamina b, utilizada para medidas de velocidades no Micro-PIV.....	126
Figura 6.5: Tela típica do Micro-PIV capturando a imagem das partículas de rodamina para medir o campo de velocidade.	126
Figura 6.6: Analisador hematológico automatizado da marca Sysmex XT-2000iV, pertencente ao LBCD.	128
Figura 6.7: Resultado do hemograma do sangue total, gerado pelo analisador Sysmex XT-2000iV.....	128
Figura 6.8: (a) Pipetando o sangue total e (b) adicionando o material biológico ao tubo contendo PBS na quantidade previamente calculada.	129
Figura 6.9: Amostras já diluídas armazenadas em tubo tipo falcon e com as porcentagens de hematócritos identificadas em 5%, 10% e 16%.	129

Figura 6.10: Bancada experimental para a microseparação do material biológico diluído, (a) desenho esquemático e (b) a bancada em si.	130
Figura 6.11: Separação entre hemácias e plasma podendo ser observada na saída do canal menor.	131
Figura 6.12: Resultado da microseparação de sangue humano para 5% de hematócritos.	131
Figura 6.13: Resultado do hemograma do sangue canino de uma fêmea da raça Shih tzu de 4 anos de idade.	132
Figura 6.14: Bancada experimental montada para sangue canino.	133
Figura 6.15: Resultado da separação entre microdispositivos fabricados em UA e PDMS.	133
Figura 7.1: Eficiência de separação relacionado com os ângulos entre os canais bifurcados e porcentagem de diluição da amostra com base na quantidade de hematócritos.	137
Figura 7.2: Variação da pressão, em Pa, entre o canal de entrada e o canal de saída de maior diâmetro hidráulico, ou seja, saída da bif. maior.	137
Figura 7.3: Eficiência de separação com ângulo de 90°, 5% de hematócritos e variação da velocidade média de entrada.	138
Figura 7.4: Estudo teórico as dimensões do para o microseparador fabricado em UA.	139
Figura 7.5: Estudo teórico para as dimensões do microseparador com fabricado em PDMS.	139
Figura 7.6: Valores de velocidade para os microcanais projetados, fabricados em UA e PDMS.	140
Figura 7.7: Valores de pressão para os microcanais projetados, fabricados em UA e PDMS.	141
Figura 7.8: Medidas de largura do microseparador em UA: (a) entrada de 400 μm , (b) bif. maior de 400 μm (saída de células) e (c) bif. menor de 100 μm (saída de plasma) quais são apresentadas na Tabela 3.2.	144
Figura 7.9: Gráfico com as medidas de largura no microcanal de entrada comparativas entre o molde fabricado em PMMA e os microcanal de entrada fabricado em UA e PDMS por fotolitografia.	151
Figura 7.10: Gráfico com as medidas de largura no microcanal da bifurcação maior comparativas entre o molde fabricado em PMMA e os microcanal de entrada fabricado em UA e PDMS por fotolitografia.	151

Figura 7.11: Gráfico com as medidas de largura no microcanal da bifurcação menor comparativas entre o molde fabricado em PMMA e os microcanal de entrada fabricado em UA e PDMS por fotolitografia.	152
Figura 7.12: Medidas de profundidade no microcanal de entrada comparativas entre o molde fabricado em PMMA e o microdispositivo fabricado em UA e PDMS.	153
Figura 7.13: Medidas de profundidade no microcanal da bifurcação maior comparativas entre o molde fabricado em PMMA e o microdispositivo fabricado em UA e PDMS.	153
Figura 7.14: Medidas de profundidade no microcanal da bifurcação menor comparativas entre o molde fabricado em PMMA e o microdispositivo fabricado em UA e PDMS.	153
Figura 7.15: Campo de velocidade resultante para a vazão de $Q=0,150$ mL/min.	155
Figura 7.16: Perfil de velocidade (a) para a entrada e bifurcação maior e (b) bifurcação menor próximos a bifurcação dos canais do microdispositivos.	156
Figura 7.17: Sequência das etapas experimentais utilizando material biológico humano.	160
Figura 7.18: Valor da eficiência de separação obtida para 5% de hematócrito.	160
Figura 7.19: Valor da eficiência de separação obtida experimentalmente, simulados e apresentados na literatura (Tripathi, Siddhartha, et al., 2013) para 5%, 10% e 16% de hematócrito de uma única amostra em um único microseparador.....	161
Figura 7.20: Resultado da terceira etapa experimental, um único microdispositivo para 3 amostras sanguíneas diferentes.	162
Figura 7.21: Resultado da microseparação com uma mesma concentração de 16% aplicada em três diferentes dispositivos.....	162
Figura 7.22: Resultado da quinta etapa experimental, onde foi utilizado diferentes microseparadores com diferentes concentrações.	163
Figura 7.23: Gráfico comparativo entre os valores de eficiência de separação entre os microseparadores fabricados em PDMS, UA e simulação para 10% do valor de hematócritos.	163
Figura 7.24: Resultado da microseparação com 10% de hematócrito de sangue canino, utilizando o dispositivo fabricado em PDMS e UA.....	164

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Concentração normal das hemoglobinas no recém-nascido e adulto (Ferraz & Murao, 2007).	2
Tabela 2.1: Comparação entre valores médios de hemogramas de sangue humano e canino (Bruno Ferreira Soares, 2012).	10
Tabela 3.1: Correspondência física na analogia entre circuitos hidráulicos e elétricos (Bruus, 2008).	42
Tabela 3.2: Geometrias dos microdispositivos conforme Fig. 3.4, os comprimentos analisados são calculados por resistência hidráulica.	44
Tabela 3.3: Com os valores apresentados para os microseparadores na Tabela 3.2, foram calculados os valores proporcionais entre as vazões dos canais bifurcados para os dispositivos analisados e fabricados.	45
Tabela 3.4: Valores do diâmetro hidráulico, resistência hidráulica, vazão e Re para o microseparador projetado, com dimensões apresentadas na Tabela 3.2.	46
Tabela 3.5: Relação entre a vazão de entrada, vazão de saída do plasma e eficiência de separação (Zhaoxin Geng et al., 2011).	47
Tabela 4.1: Valores de resistência hidráulica, diâmetro hidráulico, velocidade e número de Reynolds para o microseparador apresentado na Figura 4.1.	51
Tabela 4.2: Propriedades e dados de entrada dos fluidos no sistema para estudo teórico.	62
Tabela 4.3: Número de elementos característicos de cada malha.	63
Tabela 4.4: Valor da velocidade média [m/s] nos pontos assinalados na Figura 4.12 em $z=0,025$ mm, $-0,01$ mm $\leq x \leq 0,01$ mm e $0,1$ mm $\leq y \leq -0,4$ mm, para as diferentes malhas.	68
Tabela 4.5: Valor da pressão [Pa] nos pontos assinalados na Figura 4.12 em $z=0,025$ mm, $-0,01$ mm $\leq x \leq 0,01$ mm e $0,1$ mm $\leq y \leq -0,4$ mm, para as diferentes malhas.	68
Tabela 4.6: Tempo computacional para a geração das malhas.	70
Tabela 4.7: Tempo computacional para realização do comando <i>study</i> 1.	70
Tabela 4.8: Tempo computacional para realização estudo teórico completo.	72
Tabela 5.1: Características das microfresas usadas para a microusinagem do molde em PMMA para moldagem de microcanais em fotolitografia.	80
Tabela 5.2: Dimensões dos canais dos microseparadores com 50 μ m de altura, apresentando largura e comprimento, apresentado na Figura 4.12.	83
Tabela 7.1: Valores de eficiência de separação com o ângulo de 90° e 5% de hematócritos variando a velocidade média de entrada.	138

Tabela 7.2: Valores de velocidade média, vazão, pressão nos pontos ($-0,01$) $\text{mm} \leq x \leq 0,1\text{mm}$ e $0,01 \text{ mm} \leq y \leq 0,4 \text{ mm}$ e $z=0,025 \text{ mm}$ e Re encontrados no estudo teórico para as dimensões do microdispositivo fabricado com UA, utilizando o sangue como fluido.	139
Tabela 7.3: Valores de velocidade média, vazão, pressão nos pontos ($-0,01$) $\text{mm} \leq x \leq 0,1\text{mm}$ e $0,01 \text{ mm} \leq y \leq 0,4 \text{ mm}$ e $z=0,025 \text{ mm}$ e Re encontrados no estudo teórico para as dimensões do microdispositivo fabricado com PDMS, utilizando sangue como fluido.	140
Tabela 7.4: Valores de velocidade e pressão para o microdispositivo projetado, novas dimensões dos microseparadores fabricados em PDMS e UA.	140
Tabela 7.5: Cálculo do comprimento da entrada hidrodinâmica para o microseparador fabricado em UA, sem barreiras.....	142
Tabela 7.6: Cálculo do comprimento da entrada hidrodinâmica para o microseparador fabricado em PDMS, sem barreiras.	142
Tabela 7.7: Medidas de largura realizadas no molde em PMMA na entrada, bif. maior e bif. menor, comparando com as medidas apresentadas na Tabela 5.2.	143
Tabela 7.8: Medidas de profundidade realizadas no molde em PMMA na entrada, bif. maior e bif. menor, comparando com as medidas apresentadas na Tabela 5.2.....	143
Tabela 7.9: Resultado das medições de largura do microdispositivo fabricado em UA, como apresentado na Tabela 3.2, com a média e desvio padrão (σ).....	145
Tabela 7.10: Comparação da largura da entrada para o microdispositivo projetado em AutoCad, fabricado em PMMA e moldado em UA.	146
Tabela 7.11: Medidas de profundidade no microseparador projetado, apresentado na Tabela 3.2, média e desvio padrão (σ) calculados para o microdispositivo em UA...	146
Tabela 7.12: Comparação da largura para o microdispositivo projetado em AutoCad, fabricado em PMMA e moldado em UA.	147
Tabela 7.13: Novos valores de diâmetro hidráulico, resistência hidráulica, vazão, velocidade e número de Re para os microseparadores fabricados com a UA, usando como base os valores apresentados nas Tabelas 7.11 e 7.13.....	147
Tabela 7.14: Resultado das medições de largura do microdispositivo fabricado em PDMS, como apresentado na Tabela 3.2, com a média e desvio padrão (σ) calculados.	148
Tabela 7.15: Comparação da largura para o microdispositivo projetado em AutoCad, fabricado em PMMA e moldado em PDMS.....	149
Tabela 7.16: Medidas de profundidade no microseparador projetado, apresentado na Tabela 3.2, média e desvio padrão (σ) calculados para o microdispositivo em PDMS.	149

Tabela 7.17: Comparação da largura para o microdispositivo projetado em AutoCad, fabricado em PMMA e moldado em PDMS.....	150
Tabela 7.18: Novos valores de diâmetro hidráulico, resistência hidráulica, vazão, velocidade e número de Re para os microseparadores fabricados com PDMS, usando como base os valores apresentados nas Tabelas 5.11 e 5.13.....	150
Tabela 7.19: Comparação da largura do microdispositivo projetado em AutoCad, fabricado em PMMA e moldado em UA e PDMS.	151
Tabela 7.20: Comparação da altura do microdispositivo projetado em AutoCad, fabricado em PMMA e moldado em UA e PDMS.	152
Tabela 7.21: Balanço de massa, utilizando água com corante como fluido, medindo a massa na saída de 400 μm (bif. maior) e na saída de 100 μm (bif. menor), utilizando os dispositivos fabricados em UA e PDMS.	157
Tabela 7.22: Valores comparativos entre experimento de balanço de massa e Micro-PIV para o dispositivo fabricado em PDMS.	157
Tabela 7.23: Valores comparativos entre a simulação utilizando água como fluido no COMSOL, balanço de massa e Micro-PIV para o dispositivo fabricado em PDMS. ...	158
Tabela 7.24: Valores comparativos entre a simulação utilizando água como fluido no COMSOL e balanço de massa para o dispositivo fabricado em UA.....	158
Tabela 7.25: Valores de eficiência de separação obtidas por simulação, experimentalmente e apresentadas pela literatura.....	161
Tabela 7.26: Valores obtidos da eficiência de separação de 10% de hematócritos para sangue humano e canino, comprando com o estudo teórico, experimental e com dados da literatura.....	164

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

A	Área [m ²]
C _E	Concentração de partículas na entrada
C _p	Concentração de plasma na saída
C _s	Concentração de sangue na saída
D _H	Diâmetro Hidráulico [μm]
F _Q	Razão entre as vazões dos canais bifurcados
G _H	Condutância [S]
H	Altura [mm]
L	Comprimento [mm]
L _p	Comprimento do canal do plasma [mm]
L _s	Comprimento do canal do sangue [mm]
PBS	Phosphate buffered saline (fosfato salino)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PE	Pureza de separação
PIV	Particle Image Velocimetry
PMMA	Polimetilmetacrilato
Q	Vazão volumétrica [mL/min]
Re	Número de Reynolds
R _H	Resistência Hidráulica [Pa.s/m ³]
v	Velocidade [m/s]
UA	Uretana-Acrilato
w	Largura [μm]
w _p	Largura do canal do plasma [μm]
w _s	Largura do canal do sangue [μm]
W	Vazão mássica [g/s]

Letras Gregas

σ	Desvio Padrão
η	Eficiência de separação
μ	Viscosidade dinâmica [Pa.s]
ρ	Massa específica [kg/m ³]

1. INTRODUÇÃO

1.1 Motivação e objetivos

Microdispositivos vêm sendo progressivamente utilizados na separação celular, e tem comprovadamente se afirmado como ferramenta poderosa para o diagnóstico de doenças e outras aplicações em biologia celular. O diagnóstico rápido e preciso permite detectar com exatidão de determinada doença ainda que em seu estágio inicial. De fato, o diagnóstico correto aumenta o êxito no sucesso no tratamento de doenças, e o uso de microdispositivos como ferramenta de diagnóstico vem apresentando crescimento exponencial na última década devido aos excelentes resultados.

Entre as principais justificativas para o aumento da utilização de microdispositivos na Medicina moderna, destacam-se a necessidade de acelerar decisões terapêuticas e de substituir procedimentos laboratoriais complexos e caros. Os novos procedimentos necessitam de menor quantidade de material biológico para compor uma amostra quando comparada aos métodos tradicionais de diagnóstico, ou seja, uma única gota de material biológico possui quantidade de material suficiente para a análise imediata e de alta precisão para diagnóstico de doenças através de marcadores de doenças ou da combinação destes. Os novos procedimentos necessitam de menor quantidade de material biológico para compor uma amostra quando comparada aos métodos tradicionais de diagnóstico.

Pacientes delicados, com quadro avançado de doenças ou debilitados necessitam de urgência e precisão em seus diagnósticos, um exemplo que hoje é aplicado em larga escala seria o exame do pezinho. Esse exame pode diagnosticar precocemente doenças metabólicas, genéticas e infecciosas.

O recém-nascido com doença falciforme, por exemplo, é geralmente assintomático devido ao efeito protetor da hemoglobina fetal, que, neste período da vida, representa cerca de 80% do total da hemoglobina. Por este motivo, os testes de falcização (pesquisa de drepanócitos) e os testes de solubilidade não se aplicam durante os primeiros meses de vida.

Os testes usados em triagem populacional devem ser sensíveis e apresentar boa relação custo-benefício (Ferraz & Murao, 2007). A concentração normal de hemoglobina no recém-nascido e um adulto tem uma diferença significativa, como mostrado na Tabela 1.1.

Tabela 1.1: Concentração normal das hemoglobinas no recém-nascido e adulto (Ferraz & Murao, 2007).

Hemoglobina	% no recém-nascido	% no adulto
Hb A ($\alpha_2\beta_2$)	0 a 20	96 a 98
Hb A2 ($\alpha_2\delta_2$)	0 a 1	2,0a a 3,7
Hb F ($\alpha_2\gamma_2$)	80 a 100	0,2 a 1,5

Os métodos convencionais para diagnósticos adotam em geral o processo de centrifugação. Essa técnica apresenta a vantagem de elevada eficiência de separação e pureza (> 90%), mas a desvantagem da centrifugação é a utilização de equipamentos e partes móveis. Quando comparado com o método utilizando microseparadores, por exemplo, técnicas com microcanais bifurcados, o processo de diagnóstico torna-se mais simples, trazendo agilidade para a intervenção terapêutica, menor custo e necessitando de uma menor quantidade de material biológico.

Outro exemplo que pode se fazer o uso de microseparação seria a microseparação magnética, a qual fazendo uso de um campo magnético sobre o fluido num microcanal, separam-se misturas com diferentes materiais.

Fenômenos hidrodinâmicos que envolvem propriedades intrínsecas do sangue e das micro-vasculaturas podem ser utilizadas para uma separação da parte líquida da parte sólidas desse material biológico. Dentro da micro-vasculatura, os glóbulos

vermelhos (GVs) têm tendência a se concentrarem junto ao centro do vaso, ao passo que os glóbulos brancos (GBs) são associados a uma região rica em plasma junto às paredes (Glossett, Westbrook, & al., 2010). O efeito Zweifach-Fung, ou a lei da bifurcação, descreve o comportamento dos GVs quando o micro-capilar se separa em dois canais, onde estas células (GVs) “escolhem”, predominantemente, o maior dos capilares na bifurcação. O Efeito Zweifach-Fung está presente nos canais mais amplos e também naqueles em que as taxas de escoamento são maiores (Sollier & al, 2009).

Ainda que a redução dos custos de operação e fabricação de microseparadores para diagnóstico de doenças específicas venham a atender a sua utilização em laboratórios, não há pretensão que a escala industrial seja atendida nesse cenário (SisNANO, 2016). Além de diagnóstico, microdispositivos são também utilizados na Biologia Celular, ajudando a tentar compreender o comportamento celular através de isolamentos dos componentes sanguíneos. Por essa razão, algum estudo sobre as características do sangue é requisito importante, considerando que este fluido do corpo humano, que passa por todos os órgãos e tecidos, fornecem informações importantíssimas sobre as condições do paciente. Por sua composição em parte sólida e líquida, é amplamente utilizado em diagnósticos, sendo de forma fracionada ou total.

A fabricação dos microdispositivos, presentes na literatura, é feita, entre outros modos por meio de polímeros, como por exemplo, polidimetilsiloxano (PDMS). Este polímero, para sua utilização, necessita de um ambiente específico para sua manipulação e um alto custo no momento de selagem entre a tampa de vidro e a base confeccionada com o PDMS, onde os microseparadores se encontram, fazendo uso de plasma de oxigênio. Em contrapartida, os equipamentos necessários para a fabricação de microdispositivos fabricados em UA (uretana-acrilato) são de fácil aquisição e manuseio.

De fato, dos equipamentos para a fabricação dos microdispositivos em PDMS torna o processo economicamente inviável para utilização no diagnóstico de doenças enquanto a UA torna esse processo adequado a esse segmento de mercado brasileiro.

Além da sofisticação das instalações necessárias para a fabricação do microdispositivo mencionado, a aquisição do polímero também é um fator determinante para a escolha do processo produtivo. No caso o Brasil, a fabricação em PDMS depende da importação desse material, enquanto a fabricação em UA se faz mais viável e de fácil aquisição.

Para diminuir o custo de fabricação desse microdispositivo deve-se buscar alternativas para de aumento da variabilidade de materiais além do PDMS. Uma alternativa encontrada foi o polímero uretana acrilato. Este polímero é fotossensível, o qual tem de menor valor, facilidade no procedimento de selagem, fácil aquisição e a fabricação, uma vez que são realizadas através de um equipamento mais acessível.

O método tradicional de separação sanguínea é por meio de centrifugação e uma quantidade significativa de amostra sanguínea é retirada do paciente. Para diagnosticar enfermidades associada ao sangue, deve-se ir até um laboratório de análises clínicas, retirar uma amostra de material biológico, o qual passará por um processo de centrifugação e análise do material e dias após voltar ao local pra obter os resultados dos exames e encaminhar para o médico. Com o processo de microseparação, a quantidade de amostra coletada é menor, ou seja, menos evasiva e o microdispositivo é composto por uma entrada para o sangue e duas saídas, uma para a parte sólida (eritócitos) e outra para a parte líquida (plasma). A funcionalidade desse dispositivo é de simples manuseio e tão eficiente quanto técnicas já aplicadas tradicionalmente e em tempo real para aplicações em lab-on-a-chip. Devido a sua pequena estrutura, o seu custo para a fabricação é menor e pode ser transportado com facilidade.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo geral projetar, fabricar, caracterizar e experimentar um microseparador confeccionado em dois diferentes polímeros: polidimetilpolisiloxano conhecido popularmente por PDMS e UA, que estará baseado no Efeito Zweifach-Fung também conhecido como Lei da Bifurcação, levando em conta os parâmetros geométricos, características de escoamentos nos canais de pequena dimensão e diferentes materiais biológicos (humano e canino) com diferentes

diluições baseadas na porcentagem de hematócritos presente em cada amostra coletada.

Para alcançar esse objetivo geral, as etapas de trabalho foram estruturadas sobre os seguintes objetivos específicos:

- Estudar o comportamento de fluidos newtonianos e não newtonianos dentro de microcanais bifurcados, ou seja, Efeito Zweifach-Fung;

- Realizar estudos sobre o estado da arte dos métodos de microseparação aplicados a material biológico e fluídos incompressíveis;

- Projetar um microseparador baseado no Efeito Zweifach-Fung, utilizando os conceitos básicos de diâmetro hidráulico, a resistência hidráulica, velocidade e pressão para os microcanais do dispositivo;

- Realizar estudo teórico utilizando a plataforma computacional COMSOL, calculados: diâmetro hidráulico, resistência hidráulica, velocidade, número de Reynolds, relação entre as vazões do microcanais bifurcados, ângulos entre os microcanais, simulação de escoamento utilizando fluidos (água e sangue), para obtenção de valores de velocidade média e pressão em cada um dos microcanais para definir o melhor design e geometria, encaminhando assim o estudo experimental;

- Pesquisar técnicas de fabricação e selagem utilizando polímeros com diferentes custos (Uretana Acrilato e PDMS);

- Fabricar microdispositivos utilizando um molde em PMMA usinado em uma microfresa e com os polímeros UA e PDMS;

- Caracterizar geometricamente o molde fabricado em PMMA e os microcanais após o processo de litografia macia antes da selagem;

- Simular o escoamento de fluido (sangue e água) para as novas geometrias caracterizadas pelo microscópio 3D, para posteriormente comparar resultados e verificar possíveis discrepâncias;

- Utilizar diferentes técnicas experimentais (balanço de massa e micro-PIV) para realização do estudo de escoamento e perfil de velocidade dentro dos microcanais em ambos polímeros utilizados;

- Comparar os resultados obtidos nos diferentes estudos (teórico e experimental);

- Preparar o material biológico (humano e canino) coletado, com base no resultado do analisador hematológico automatizado, o qual fornece as características sanguíneas de cada amostra, entre elas, a porcentagem de hematócritos presente, no qual é baseado as diluições de 5%, 10% e 16%;

- Microseparar as amostras com diferentes diluições utilizando diferentes dispositivos;

- Analisar o resultado da microseparação em cada um dos microcanais de saída, utilizando novamente o analisador hematológico automatizado;

- Calcular a eficiência de separação obtida para os materiais biológicos (humano e canino), com diferentes diluições e diferentes dispositivos fabricados com polímero de alto e baixo custo (PDMS e UA);

- Comparar os diferentes resultados obtidos com os dispositivos fabricados em PDMS e UA.

Vale salientar a fundamental importância da colaboração do Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBDC) o qual é parte integrante do Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC), do IQ-UFRJ.

No LBDC foram coletadas as amostras sanguíneas de voluntários, analisadas por um analisador hematológico automatizado para obter as características sanguíneas de cada amostra e com base na quantidade de hematócritos era calculada a diluição com 5%, 10% e 16%. Com a amostra submetida ao dispositivo, o fluido obtido em ambas as saídas eram levados novamente para o analisador hematológico automatizado para obter o resultado da microseparação. Com bases nesses resultados, era então calculada a eficiência de separação do microseparador.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo, são revisados trabalhos disponíveis na literatura até o momento que abordaram métodos de microseparação, a importância do desenvolvimento do estudo microfluídico para o desenvolvimento tecnológico.

Um dos métodos mais convencionais para a detecção de doenças é através de coleta sanguínea. Coletada a quantidade de amostra, o material biológico passa por verificações de variação de parâmetros pré-estabelecidos para identificar qual poderia ser o diagnóstico e posteriormente um possível tratamento da enfermidade encontrada.

Com o avanço dos estudos ligados a área da tecnologia, essas verificação de parâmetros vem então evoluindo e buscando uma forma que essa análise seja mais rápida e tão eficiente quanto as formas tradicionais existentes. O estudo de microfluídica apresenta uma de suas inúmeras aplicações na área de diagnóstico e tratamento de doenças que acometem o corpo humano.

Diagnóstico de doenças que podem ser disseminadas rapidamente devem ser obtidos em um curto espaço de tempo para que seu tratamento se inicie em poucos dias após a confirmação. Em países com baixo desenvolvimento tecnológico, necessitam de meios de detecção de doenças de forma rápida e confiável para assim evitar epidemias. Com essa visão, em 2004, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu diretrizes para o desenvolvimento de meios de diagnósticos adequados para a detecção de tuberculose. Este método de detecção de marcadores recebeu a sigla ASSURED (Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free and Delivered to those in need) (Chocalheiro, 2014).

O sangue percorre todo o corpo humano, passando por veia cava (3 cm), aorta (2 cm), artérias (4 mm), veias (1,5 mm), arteríolas (50 μ m), vênulas (40 μ m) e capilares (8

μm). O tamanho das hemácias do corpo humano (parte sólida) tem diâmetro aproximado de 7 μm e a capacidade de se deformar para entrar em capilares que são próximos a sua dimensão geométrica quando estão saudáveis. A parte líquida do sangue (plasma) circula juntamente com o as hemácias por todas os órgãos que compõe o corpo humano.

A microcirculação compreende os vasos sanguíneos e linfáticos com diâmetro inferior ou igual a 100 μm (JUNIOR, 2006) (Bouskela, 1999) (Fleming, 1985). Inúmeros fenômenos fundamentais para a sobrevivência dos organismos ocorrem ao nível da microcirculação, sendo que a medida de velocidade do fluxo sanguíneo na microcirculação é um fator importante para a determinação da oxigenação sanguínea e da concentração de hemoglobina. Estudos de eritrócitos encontram diversas aplicações relacionadas à fisiologia da microcirculação (Fleming, 1985) e a avaliação da eficiência de medicamentos.

Em grandes artérias onde o diâmetro dos vasos sanguíneos é suficientemente grande comparativamente a células individuais, é adequado considerar o sangue como um fluido Newtoniano (YC, 1993) (Yamaguchi, 2006). Deste modo, o sangue nas grandes artérias pode ser estudado como um fluido homogêneo, onde a influência das partículas no escoamento é ignorada.

No entanto, como as artérias se dividem em contínuas artérias com menores diâmetros, a área da secção transversal vai ser amplificada, logo tanto a pressão como a velocidade reduzem à medida que o sangue flui para os vasos de menor porte (YC, 1993) (Yamaguchi, 2006).

Quando o sangue atinge as arteríolas e capilares, o número de Reynolds (Re) torna-se menor que um, onde a força viscosa domina sobre as forças de inércia (Caro, 1978) (YC, 1993). A microcirculação estabelece o ponto em que o sangue e os tecidos dos distintos órgãos corporais entram realmente em contato (Silva J. e., 1997).

Os fluidos podem ser considerados Newtonianos e não-Newtonianos, mediante o seu comportamento. São considerados fluidos Newtonianos, aqueles que demonstram

a mesma viscosidade em qualquer velocidade de escoamento, por exemplo, a água, o ar, o plasma e a gasolina. Estes exibem um comportamento viscoso ideal, onde a variação da tensão de corte por gradiente de velocidade é linear (Lima R. I., 2012).

Denomina-se fluido não-newtoniano, um fluido cuja viscosidade varia mediante o grau de deformação exercido. O sangue como fluido não-Newtoniano caracteriza-se por possuir uma viscosidade dinâmica de aproximadamente $\mu = 0,04 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ e uma massa específica de $\rho = 1060 \text{ Kg/m}^3$, demonstrando ter um comportamento não linear (Lima R. I., 2012).

Para o perfil de escoamento sanguíneo, o qual foi estudado durante muitos anos, é indicado que o sangue com baixa porcentagem de hematócritos apresente um perfil mais próximo de uma parábola e com maior porcentagem de hematócritos que esse perfil muda para a forma de pistão, como mostrado na Figura 2.1.

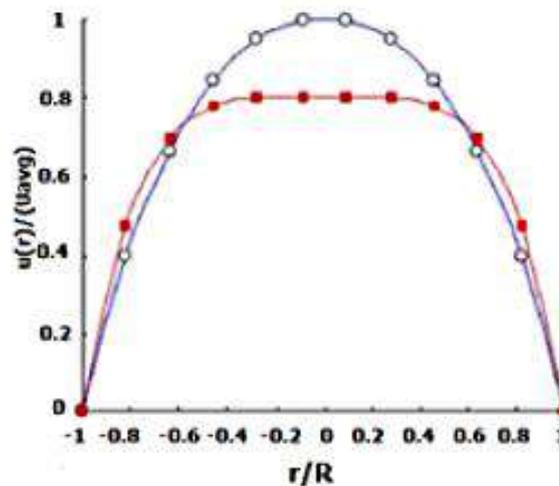


Figura 2.1: Perfil de velocidade sanguínea (Lima R. I., 2012).

O diagnóstico de doenças através de meios menos evazivos e que necessitem de uma quantidade pequena de amostra também se faz importante em meios veterinários, principalmente em animais de pequeno porte (Bruno Ferreira Soares, 2012).

Um estudo comparativo entre uma média de hemogramas humanos e cães, aponta que a quantidade de hemácias e a porcentagem de hematócritos apresentam valores

muito próximos, diferenciando significativamente a quantidade de plaquetas, como mostrado na Tabela 2.1 (Bruno Ferreira Soares, 2012).

Tabela 2.1: Comparação entre valores médios de hemogramas de sangue humano e canino (Bruno Ferreira Soares, 2012).

Sangue	Hemácias (M/mm ³)	Hematócitos (%)	Plaquetas (M/mm ³)
Humano	4,3 – 6,0	13,5 – 17,8	140000 – 400000
Canino	5,0 – 8,5	12,0 – 18,0	200 - 900

Buscando então meios de separar as hemácias do plasma através de microdispositivos, fez-se um estudo sobre métodos de microseparação, buscando entender o processo físico de cada um deles. Qual seria mais apropriado fabricar e experimentar com os equipamentos que estariam disponíveis para desenvolver o estudo, que apresentasse baixo custo, fácil aplicação e facilitasse a fabricação com diferentes polímeros.

Com o objetivo de fabricar o microdispositivo, caracterizar, experimentar e verificar o que seria projetado, as diferentes técnicas de separação passiva foram revisadas e estão apresentadas a seguir. O Efeito Zweifach-Fung também conhecido como lei da bifurcação se mostrou um excelente método, apresentando até 97% de eficiência de separação com 5% de hematócitos presente no fluido (Tripathi, Siddhartha, et al., 2013).

2.1 Métodos de microseparação

A microfluídica pode ser de forma simplória definida como sendo o estudo da mecânica dos fluidos aplicada a microssistemas. O avanço dessa área de pesquisa, tem-se mostrado com grande potencialidade de aplicação, em especial nas ciências biológicas. A possibilidade do uso da microfluidica neste tipo de análise, além de ser menos invasiva, requer uma pequena amostra de sangue do paciente e assim obtendo um resultado mais rápido e preciso de sua doença e assim iniciando o tratamento com

brevidade e com maiores chances de recuperação (Bi-Feng Liu, et al., 2005) (Jian Chen, et al, 2012).

Vários métodos de separação têm sido estudados, este campo de rápido crescimento da tecnologia tem encontrado numerosas aplicações em Biomedicina, diagnósticos, análises químicas, indústrias automotiva, eletrônica e de processamento na avaliação ambiental. Técnicas passivas utilizam a interação entre as partículas, o escoamento e a estrutura do canal e não requerem forças ou ações externas. Por outro lado, técnicas ativas fazem uso de campos externos em várias formas, como por exemplo, forças magnéticas e/ou acústicas, e podem oferecer um melhor desempenho de separação (Sajeesh & Sen, 2014).

A base das aplicações de microfluídica é o desenvolvimento de dispositivos como ferramentas de diagnóstico chamados de “point-of-care” e “Lab-on-a-Chip” (LOC). Um dispositivo típico Lab-on-a-Chip pode incluir vários módulos funcionais: transporte da amostra, módulo de preparação, módulo de separação, módulo de detecção e análise, todos incorporados em um único dispositivo (Sajeesh & Sen, 2014).

O módulo de separação tem importância fundamental em aplicações onde uma amostra pode ser purificada através da separação de elementos biológicos, bem como em aplicações analíticas onde esses elementos separados são cuidadosamente estudados. Além disso, a seleção baseada no tamanho dos elementos numa amostra é uma das tecnologias importantes nos domínios da produção industrial, indústria química e de alimentos, avaliação ambiental e química ou a investigação biológica. A triagem de elementos micros em um fluxo contínuo é necessário para uma ampla variedade de aplicações, incluindo sínteses químicas, processamento de minerais e análises biológicas. Em diagnóstico, as técnicas de separação podem ser utilizadas para separar células vivas de células mortas, células de câncer de células normais e células infectadas por malária de células saudáveis, entre outras (Bi-Feng Liu, et al., 2005) (Jian Chen, et al, 2012) (Sajeesh, P., et al., 2014).

No exemplo de aplicação em diagnóstico de infecção por malária, as células sanguíneas saudáveis podem facilmente se deformar para circular entre os vasos sanguíneos, as células infectadas por malária ficam rígidas, sem capacidade de deformação e assim o sangue fica incapacitado de circular pelos menores vasos (Jason P. Beech, 2012).

O desempenho dos dispositivos é classificado com base no tempo de separação, eficiência de separação das partículas, rendimento e aplicabilidade. A separação e as técnicas de seleção são classificadas como: (i) passiva, (ii) ativa e (iii) as técnicas combinadas. As técnicas de seleção ativas envolvem um campo externo para triagem de partículas (campo magnético, acústica...), as técnicas de triagem passivas fazem uso somente da interação entre as partículas, estrutura de microcanais e do escoamento. As técnicas de separação passivas têm vantagens sobre as técnicas ativas, uma vez que não é exigido nenhum campo externo para o processo de seleção tornando essa técnica mais barata. Todavia, técnicas de triagem ativas, apresentam uma eficiência de separação com rendimento relativamente superiores (Sajeesh, P., et al., 2014), ambas as técnicas serão apresentadas no presente trabalho, mas com enfoque somente nas técnicas passivas, uma vez que a presente tese optou por escolher uma técnica passiva para projeto e fabricação dos microseparadores aqui descritos. Uma ilustração destas divisões e classificação dos vários meios de separação de partículas e técnicas é apresentada na Figura 2.2.

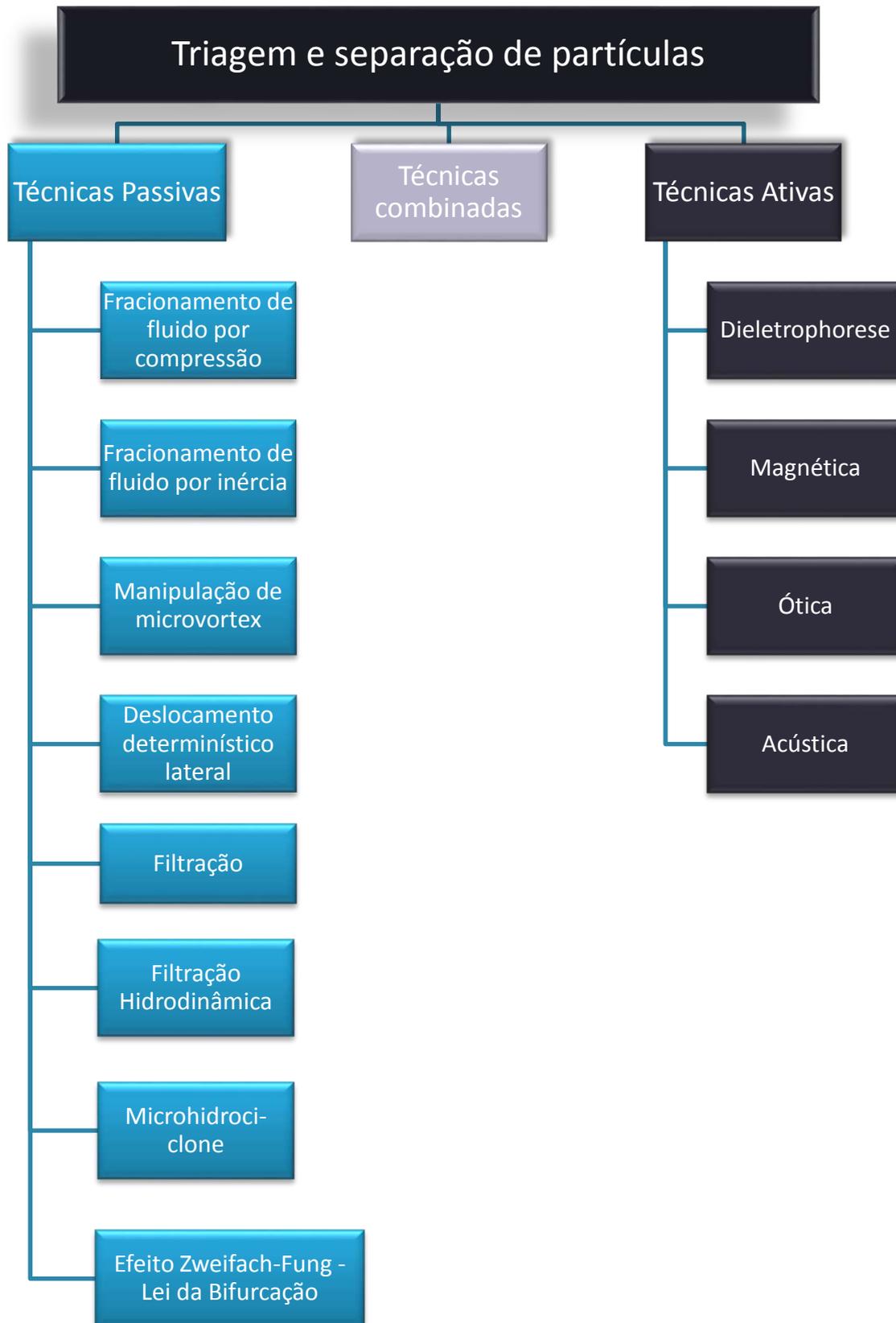


Figura 2.2: Classificação de vários métodos de triagem e separação aplicados em microfluidica, adaptado de (Sajeesh, P., et al., 2014).

2.1.1 Separação por técnicas passivas

As técnicas de separação passivas podem ser aplicadas quando há preocupação com o gasto de energia neste processo, enquanto as técnicas de separação ativas são indicadas onde é necessária maior eficiência de separação e/ou classificação de partículas. Dentro das técnicas combinadas, ativa e passiva, são empregados forças externas para melhorar ainda mais a separação e classificação de desempenho do microseparador. As técnicas de separação passiva e ativa são classificados em diferentes modos, com base nos princípios de funcionamento.

Em cada método, em primeiro lugar, é necessário ter clareza do que se quer separar, qual a eficiência necessária, tamanho de partículas e associar a isso o princípio operacional de cada técnica. Podem ser citadas como sendo passivas as seguintes técnicas de triagem e separação (Figura 2.2): fracionamento de fluido por compressão, filtração, filtração hidrodinâmica, Efeito Zweifach-Fung, microhidrociclone, deslocamento determinístico lateral, manipulação de vórtex e fracionamento de fluido por inércia (Bi-Feng Liu, et al., 2005) (Jian Chen, et al, 2012) (Sajeesh, P., et al., 2014) (C. Wyatt Shields IV, et al, 2015). A seguir as técnicas de separação passivas serão analisadas em mais detalhe, devido ao objetivo de desenvolver, fabricar e analisar um microdispositivo de baixo custo e fácil aplicação do dispositivo.

2.1.1.1 Fracionamento de fluido por compressão

Esta técnica é classificada como triagem passiva que pode ser utilizada para um contínuo dimensionamento de partículas em um microcanal, empregando as características de escoamento laminar. O fluido contendo as partículas a serem classificadas é deslocado por um fluido livre de partículas, tal como representado na Figura 2.3. O microcanal inclui um segmento comprimido onde as partículas são alinhadas com uma das paredes laterais através do controle das vazões de ambos os fluidos. Em um fluxo laminar, uma partícula tem uma tendência para fluir ao longo da

linha crítica que passa através do seu centro de massa. Para partículas menores, as linhas de corrente que passam pelo seu centro de massa estão mais próximas da direção da parede do canal e, para as partículas maiores, as linhas de corrente que atravessam pelo seu centro de massa, longe da linha crítica, estão mais próximas do no centro do canal. A mistura de líquido e partículas que saem do segmento comprimido são separadas pelas linhas de corrente que as espalham de acordo com os seus tamanhos (Sajeesh, P., et al., 2014) (C. Wyatt Shields IV, et al, 2015).

A técnica de fracionamento de fluido por compressão assume que o fluido é incompressível, e condição de não deslizamento, baixo número de Reynolds e condições de estado estacionário são satisfeitas. Além disso, presume-se que as partículas não perturbam o escoamento de fluido ou interagem com as paredes do canal. Esta técnica pode ser aplicada a vários tipos de partículas a serem separadas, e o número de partículas presentes no fluido de separação não afeta a eficiência. O limite de tamanho das partículas classificadas depende principalmente da distribuição precisa das vazões na entrada dos ramos e a qualidade fracionamento é altamente dependente da forma de compressão realizada no fluido. Se a largura do segmento de compressão é alta, o perfil do escoamento no limite entre segmento compressor e o alargado torna-se suave, resultando em uma menor eficiência. A largura do segmento compressor depende do tamanho de partículas presentes no fluido (Sajeesh, P., et al., 2014) (C. Wyatt Shields IV, et al, 2015).

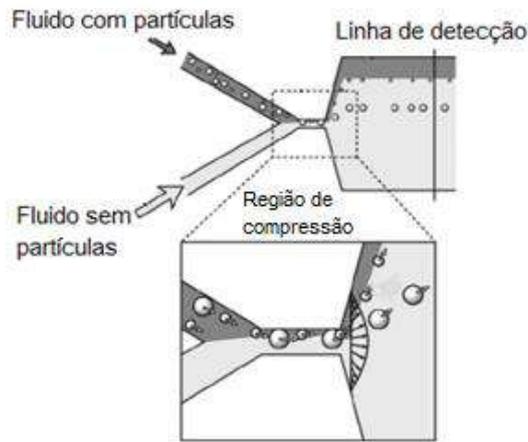


Figura 2.3: Design do microseparador para aplicar a técnica de separação passiva de fracionamento de fluido por compressão (Sajeesh, P., et al., 2014).

2.1.1.2 Fracionamento de fluido por inércia

Quando uma partícula se move ao longo de um microcanal reto, duas forças agem sobre a partícula: (i) força de cisalhamento e (ii) força devido ao atrito com a parede. As forças de cisalhamento induzidas são resultados da natureza parabólica do perfil de velocidade dentro do canal. Para uma partícula esférica presente perto da linha central do canal, o gradiente de velocidade é mais elevado do lado da parede onde está a partícula do que na área central do canal. Portanto, as partículas esféricas correm do centro ao encontro das paredes do microcanal. O efeito de ‘força de levantamento induzido pela parede’ pode ser explicado considerando o campo de escoamento em torno de uma partícula esférica na presença da parede causando perturbações que conduzem à formação de uma assimétrica esteira em volta da partícula. Esta assimetria leva a um empuxo que dirige as partículas para longe da parede. Ambas estas forças de sustentação estarão agindo em direções opostas. A migração lateral de partículas em microcanais ocorrem devido à sobreposição das forças inerciais e empuxo. As partículas são posicionadas no interior da secção transversal de microcanais, dependendo da sua dimensão relativa com as dimensões dos microcanais e, assim, a triagem de partículas de tamanhos diferentes torna-se possível (Bi-Feng Liu, et al.,

2005) (Jian Chen, et al, 2012) (Sajeesh, P., et al., 2014) (C. Wyatt Shields IV, et al, 2015) (Carlo, 2009).

Quando as partículas são posicionadas arbitrariamente, movem-se ao longo de um microcanal em linha reta, apresentam a tendência a ficarem próximas à parede devido a inércia, é nisso que se baseia esse microseparador.

Neste dispositivo, as partículas que serão separadas têm como base no fluxo de vórtice (ou fluxo separadas), que é criado na região de expansão. Na câmara de expansão, as forças de sustentação de efeito na parede induzida pelas laterais são enfraquecidas em comparação com o elevado grau de cisalhamento induzidas pelo gradiente força devido à longa distância da principal força para as paredes laterais. As partículas que se movem perto da linha central são desviadas para as paredes laterais devido à predominância do empuxo induzido pelo gradiente de cisalhamento. A maioria das partículas tem sua trajetória perto das paredes laterais ao passar por uma série de canais de contração e expansão (Bi-Feng Liu, et al., 2005) (Jian Chen, et al, 2012) (Sajeesh, P., et al., 2014) (C. Wyatt Shields IV, et al, 2015). A separação inercial das partículas com base no tamanho é demonstrada pelo efeito das forças de suspensão inerciais e força de suspensão inercial induzida devido à mudança de momentum. Quando as partículas passam de uma para outra contração, contração através de uma câmara de expansão (microcanais com múltiplos orifícios) como mostrado na Figura 2.4a, há uma troca de momento entre a partícula e o fluido. A Figura 2.4b, mostra que há uma troca de momento entre a partícula e o fluido. Na primeira transição entre 1-2 e 2-3, não há considerável incompatibilidade entre a partícula e o caminho de fluido. Assim, a mudança dinâmica e força inercial induzida são menores. Quando a partícula se move da região de 3 a 4, devido à incompatibilidade no caminho do fluido e das partículas, o impulso muda consideravelmente a direção da força induzida que está agindo em direção à parede. Devido à presença da parede, a partícula irá alinhar-se à direção da mesma, independentemente do tamanho da partícula. O movimento da partícula de 4 para 5 é crucial. Aqui, a incompatibilidade no caminho e a resultante da

mudança de momento são altos, e a força de sustentação induzida está agindo em uma direção longe da parede (Sajeesh, P., et al., 2014) (C. Wyatt Shields IV, et al, 2015).

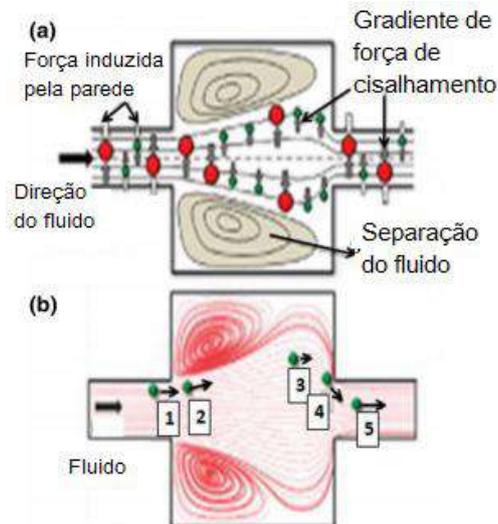


Figura 2.4: Separação inercial: (a) fluxo entre um par de contração-dilatação numa matriz em um canal em linha reta. (b) Caminho de partículas com trocas de momentum entre partículas e do fluido, adaptado de (Sajeesh, P., et al., 2014).

Na primeira técnica, fracionamento por compressão, não há interação alguma entre as partículas e as paredes do canal e não perturbam o escoamento do fluido, sendo a separação efetivada pelas linhas de corrente que as espalham e o tamanho das partículas envolvidas será decisivo na trajetória que irão tomar no fluxo.

Já na segunda, fracionamento por inércia, há interação, e tal interação cria uma zona em volta da mesma, possibilitando forças inerciais de suspensão na partícula. Este caminho é traçado pelo balanço entre estas forças inerciais, as forças que as puxam (*drag force*) e a troca de momento entre o fluido e a partícula. O diferencial dessa técnica é ter o mesmo resultado seja qual for o tamanho da partícula usada.

2.1.1.3 Manipulação de microvortex

Manipulação de microvortex (MVM) é utilizada para a concentração de partículas em múltiplos fluxos e separação das mesmas, como se mostra na Figura 2.5, um número de sulcos em zigue-zague é construído sobre o fundo de um canal. Posições

de equilíbrio são alcançados pelas partículas com base no equilíbrio entre a força gravitacional, força de empuxo e força de arrasto hidrodinâmico. Quando fluxo é gerado ao longo dos sulcos, vórtices são criados em direção dos vapores e um padrão de escoamento helicoidal é obtido. Cada conjunto de ranhuras produz microvórtices simétricos de direções alternadas (Sajeesh, P., et al., 2014) (C. Wyatt Shields IV, et al, 2015).

Microvórtices exercem forças de arraste sobre as partículas, tanto na direção vertical quanto na lateral, e as partículas concentram-se na interface dos vórtices. Quando as partículas são mais leves que a média, elas deslocam-se para a parte superior do canal e ocupam uma posição devido ao equilíbrio entre as forças de empuxo ascendente e as que arrastam para baixo; e as partículas mais pesadas, ficam na parte inferior do canal (Sajeesh, P., et al., 2014) (C. Wyatt Shields IV, et al, 2015).

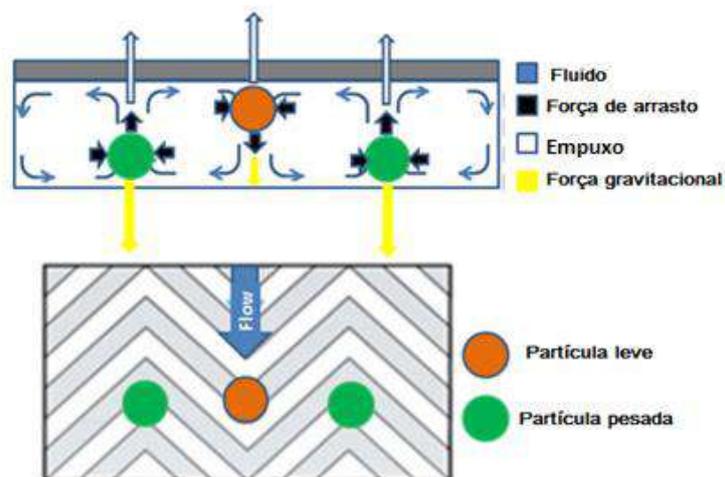


Figura 2.5: Posição das partículas na técnica de separação passiva de microvórtex, adaptado de (Sajeesh, P., et al., 2014).

2.1.1.4 Deslocamento lateral determinístico – DLD

Deslocamento lateral determinístico (DLD) é um método de separação contínuo que faz uso da bifurcação assimétrica do escoamento laminar em torno de obstáculos. Partículas que se movem através de uma série de obstáculos com intervalos maiores do que o tamanho de partícula tem o seu caminho determinado com base no seu

tamanho e capacidade de deformação. As partículas de determinado tamanho e deformabilidade seguem por um caminho de migração equivalente levando a uma separação eficiente. Neste caso, as matrizes periódicas de formato cilíndrico são colocadas na direção do fluxo. A distância centro-a-centro entre os postes adjacentes é λ , D_{post} é o diâmetro do post, e a matriz de postes são definidos no ângulo λ em relação à direção do fluxo (chamado ângulo de migração), como mostrado na Figura 2.6a. Filas sucessivas na direção do fluxo são colocadas com um deslocamento lateral de $\Delta\lambda$ numa direção perpendicular à direção do fluxo. Existem dois métodos usados para organizar as estruturas de caminho. No primeiro método (Figura 2.6b), uma matriz retangular está rodeada em relação a qualquer coluna e no segundo método (Figura 2.6c) uma estrutura romboédrica é usada.

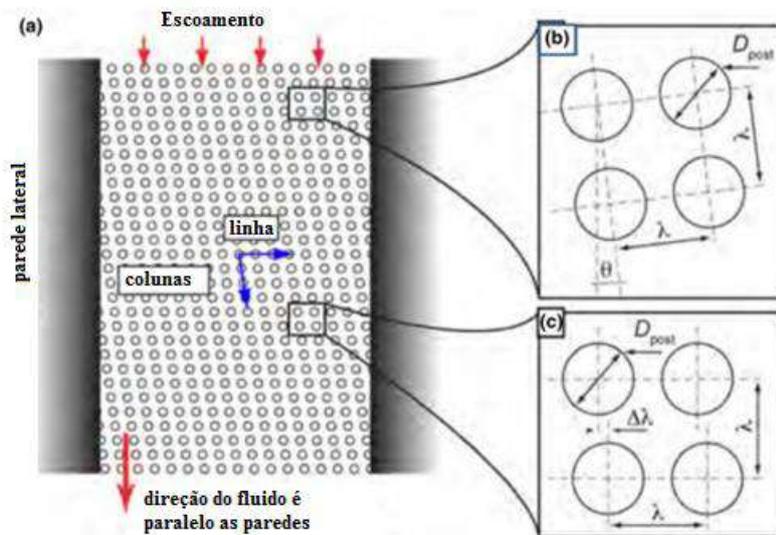


Figura 2.6: (a) Um esquema de um elemento de deslocamento lateral determinístico com uma coluna colocada em um ângulo com a direção do fluxo. (b) Arranjo de matriz retangulares rodeadas de colunas. (c) Colunas de postes romboédricos, onde λ é a distância entre os centros das colunas, adaptado de (Sajeesh, P., et al., 2014).

O movimento de uma esfera sobre sistema de deslocamento lateral determinístico foi estudado para compreender o bloqueio direcional da partícula. Isso mostra que a presença de interações irreversíveis entre as partículas que se movem e os obstáculos quebram a simetria da trajetória das partículas e um deslocamento lateral é induzido na

partícula. Embora este deslocamento lateral seja pequeno, a natureza periódica do sistema deslocamento lateral determinístico faz o deslocamento lateral acumular-se e leva a uma macroscópica mudança no ângulo de migração. O movimento de partícula na matriz periódica também é estudado por meio de simulações de dinâmica estocástica. Devido a interações não hidrodinâmicas e interações de curto alcance entre a partícula e os obstáculos, a partícula que se movimenta torna-se bloqueada em certas trajetórias periódicas com uma orientação ao longo de uma das direções de treliça (Sajeesh, P., et al., 2014) (C. Wyatt Shields IV, et al, 2015).

2.1.1.5 Filtração

A filtração é um método que pode ser utilizado com base no tamanho das partículas para as quais se deseja a separação, por exemplo, para o fracionamento de sangue nos seus componentes. Principalmente, quatro diferentes tipos de microfiltros são usados: membrana, Weir, pilar e de *cross-flow*, tal como mostrado na Figura 2.7.

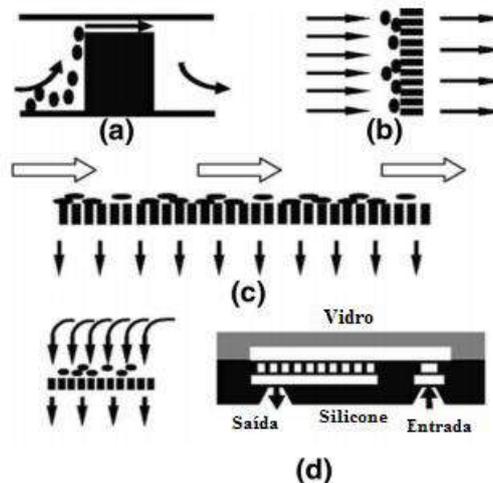


Figura 2.7: Diagramas esquemáticos de projetos microfiltro: (a) uma vista lateral do filtro *weir*; (b) visão de cima do filtro pilar; (c) visão de cima do filtro *cross-flow*; (d) vista lateral do filtro de membrana (Sajeesh, P., et al., 2014).

Métodos de separação à base de membrana têm sido usados para a separação de partículas de amostra. Em plasmaforese usando membrana filtração, o fluxo de plasma depende da concentração de hematócrito, a pressão transmembranar e a taxa de cisalhamento na parede. Se a concentração de hematócritos é grande, o entupimento do filtro é maior e o fluxo é reduzido. Inicialmente, o fluxo aumenta com a pressão transmembranar e, em seguida, atinge um equilíbrio de pressão independente devido à deposição de glóbulos vermelhos na face do filtro, como mostra a Figura 2.7. Nesta faixa de operação, a taxa de cisalhamento da parede determina o fluxo de plasma. Como taxa de corte aumenta, a obstrução de camada de glóbulos vermelhos na superfície do filtro é modulada pela difusão de cisalhamento reforçada.

O principal problema com o método de filtração por membrana é a acumulação de partículas sobre o filtro, a qual reduz a eficiência de separação. Para reduzir entupimentos da membrana transversal, fluxos reversos periódicos têm sido utilizados para a limpeza da membrana (Sajeesh, P., et al., 2014) (C. Wyatt Shields IV, et al, 2015).

2.1.1.6 Filtração hidrodinâmica

Filtração hidrodinâmica é semelhante a filtração em fluxo transversal, mas elas são baseadas em princípios diferentes. Em uma filtração em fluxo transversal, apenas o fluido portador é coletado através dos canais laterais, mas na filtração hidrodinâmica, as partículas são também coletadas através dos canais laterais. Quando um canal lateral é colocado ao longo de um microcanal carregando a amostra, uma certa quantidade de fluido portador transfere-se para o canal lateral. Se a vazão de volume do canal é muito pequena comparada com o canal principal, as partículas de diâmetro maiores do que determinado valor não irão fluir para o canal lateral. Este diâmetro crítico é determinado pela largura virtual (w) da corrente do canal lateral separada do canal principal, como mostrado na Figura 2.8a-c (Sajeesh, P., et al., 2014) (C. Wyatt Shields IV, et al, 2015).

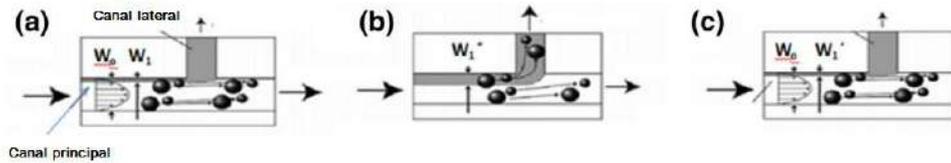


Figura 2.8: (a-c) Comportamento de partículas para várias vazões no canal lateral (Sajeesh, P., et al., 2014).

Inicialmente, como mostrado na Figura 2.8a, nenhuma das partículas inicialmente passam para o canal lateral desde que a largura w é muito pequena em comparação com o diâmetro da partícula menor. Se a taxa de fluxo do canal lateral aumenta, então a largura também aumenta para W_0 e W_1 , como mostrado na Figura 2.8b, c. Os pontos ramificados iniciais são criados para concentrar a amostra através da remoção de algumas partes do fluido portador e se concentrar as partículas nas paredes do canal. Em seguida, as partículas de diferentes diâmetros migram para o canal lateral dependendo das suas taxas de tamanho e fluxo. Finalmente, alta concentração de partículas alvo de grande diâmetro podem ser coletadas na saída do canal principal (Sajeesh, P., et al., 2014) (C. Wyatt Shields IV, et al, 2015).

A técnica de filtração hidrodinâmica muito se assemelha a lei da bifurcação, onde na referida lei, a exposição a diferentes taxas de pressão e distribuição das forças de cisalhamento conduzem a direção da migração das partículas, partículas tais que sempre optam pelo microcanal de maior vazão. Já na técnica de filtração hidrodinâmica, o meio usado não usa bifurcação, mas sim, diferença entre as vazões do canal lateral e principal, também estando diretamente o comportamento da partícula estando atrelado ao seu tamanho .

2.1.1.7 Microhidrociclone

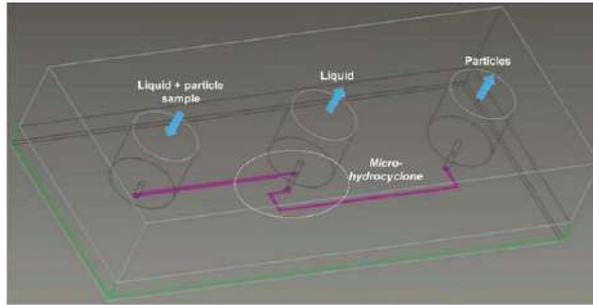
O dispositivo de microhidrociclone para a separação de partículas de líquido utiliza uma câmara cilíndrica com um fundo tronco-cônica e um canal de entrada tangencial para esta câmara cilíndrica para separar partículas de líquidos com base na força

centrífuga. A concepção do dispositivo de microhidrociclone que mostra o fluxo no interior do dispositivo e uma fotografia da estrutura estão representadas na Figura 2.9a. A estrutura do dispositivo inclui um microcanal de entrada, uma câmara cilíndrica com um fundo tronco-cônica e como elemento principal funcional, saída inferior (*underflow*) e saída superior (*overflow*) levando a um microcapilar. Um elemento importante no hidrociclone é o vórtice que está localizado no topo do capilar, que se estende até uma certa distância dentro do corpo principal do hidrociclone para auxiliar a formação de um vórtice no fluxo de entrada. A entrada de microcanais é tangencial à câmara cilíndrica. O fluxo tangencial do ciclone gera um padrão de fluxo em espiral que permite a separação das partículas do líquido, através de uma velocidade radial fluida, orientada para fora, experimentada pelas partículas sólidas (Sajeesh, P., et al., 2014) (C. Wyatt Shields IV, et al, 2015).

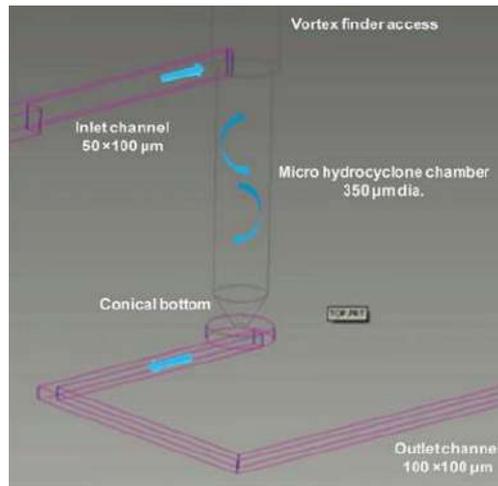
O chip microfluidico é fabricado em três camadas diferentes. Dado o movimento em espiral do fluido, a velocidade pode ser dividida em duas componentes: uma componente tangencial (V_T), e um componente da velocidade radial (V_R) (Figura 2.9b).

O microhidrociclone é utilizado para prever a dinâmica do escoamento e de partículas resolvendo as equações de Navier-Stokes para o escoamento e utilizando uma abordagem Lagrangeana para partículas (Sajeesh, P., et al., 2014) (C. Wyatt Shields IV, et al, 2015).

O dispositivo proposto pode ser facilmente integrado com microambientes; assim, é adequado para Lab-on-a-Chip e desenvolvimento de microssistemas. Além disso, o dispositivo é compatível com a abordagem de microfabricação, que poderia ser facilmente produzido em massa e, portanto, pode ser econômico. O dispositivo tem aplicações potenciais em muitas áreas, incluindo análise química, pesquisa de materiais, point-of-care, preparação de sangue da amostra biomédica e outras aplicações (Sajeesh, P., et al., 2014) (C. Wyatt Shields IV, et al, 2015).



(a)



(b)

Figura 2.9: (a) Desenho do dispositivo de microfluidos com um microhidrociclone para separação de partículas de líquido, (b) câmara de microhidrociclone (Sajeesh, P., et al., 2014).

2.1.1.8 Efeito Zweifach-Fung – Lei da Bifurcação

Em 1968 K. Svanes e B. Zweifach observaram que na presença de ramificações em vasos sanguíneos muito finos (capilares), as células do escoamento sanguíneo apresentavam tendência a escoar para o ramo com menor resistência ao escoamento e com vazão maior (Sung Yang, et al, 2006) (V. Doyeux, et al., 2011). O fato surpreendente foi a existência de escoamento, ainda que em menor vazão, pelo capilar com maior resistência ao escoamento (Sung Yang, et al, 2006) (V. Doyeux, et al., 2011). Verificou-se também que, quando a vazão nos dois ramos difere por um fator de pelo menos 2,5 praticamente todas as células sanguíneas vermelhas (eritrócitos ou glóbulos vermelhos) escoavam pelo capilar com maior vazão.

Em um artigo publicado cinco anos depois, YC Fung relatou uma descoberta paradoxal: mesmo quando um capilar sanguíneo se bifurca em duas ramificações menores, porém de igual diâmetro e mesmo comprimento, os eritrócitos escoavam quase em totalidade em apenas um dos dois ramos idênticos (YC, 1993). Este fenômeno se verificava até determinado instante, como se atingisse um ponto de saturação, após este instante, as células do sangue passavam escoar pelo outro ramo da bifurcação. Uma vez que o segundo ramo atingia determinado nível de saturação, as células do sangue, voltavam a escolher o primeiro ramo. A direção do fluxo das células sanguíneas, assim, periodicamente alternava entre os dois vasos sanguíneos. Entretanto esse fenômeno não foi completamente esclarecido no artigo de Fung (1973), que concluiu que a direção do movimento de eritrócitos em uma bifurcação de um microcanal parece ser determinada pela relação entre as vazões dos dois ramos.

Quando o diâmetro de um capilar é reduzido até a dimensão das células do sangue (glóbulos vermelhos têm diâmetro médio de 7 a 7,5 μm . Os glóbulos brancos podem ter diâmetro de 15 a 30 μm .), as células sanguíneas naturalmente se alinham no interior do capilar, de tal forma que o seu centro se situa próximo ao centro do microcanal. A diferença das vazões em cada um dos dois ramos desempenha um papel crucial no ponto de bifurcação, pois resulta em diferentes pressões em cada lado das células do sangue. Dessa forma, as células são conduzidas para o ramo com a maior vazão. Este efeito foi nomeado de Efeito Zweifach-Fung.

O Efeito 'Zweifach-Fung' afirma que quando uma partícula atinge uma região de bifurcação, a partícula apresenta uma tendência a seguir para o canal de fluxo de alta velocidade (Sung Yang, et al, 2006) (V. Doyeux, et al., 2011). As diferentes pressões e forças de cisalhamento que atuam sobre as partículas e o gradiente de pressão entre os canais bifurcados são as principais razões por trás de tal efeito. Além disso, a força de cisalhamento agindo sobre a partícula ao longo da direção de fluxo de alta velocidade é maior do que a força de cisalhamento no sentido do canal de baixa vazão. Como resultado dessas forças atuando sobre a partícula, essa segue pelo canal com a maior

vazão quando se atinge o ponto de bifurcação (Sung Yang, et al, 2006) (YC, 1993) (V. Doyeux, et al., 2011).

Quando um canal se bifurca em dois canais como na Figura 2.10, eles apresentam diferentes dimensões, vazões e pressões. Para que ocorra a separação através do Efeito Zweifach-Fung, a proporção entre a vazão mínima entre os canais bifurcados deve ser 2,5:1 (Sung Yang, et al, 2006) (YC, 1993) (V. Doyeux, et al., 2011).

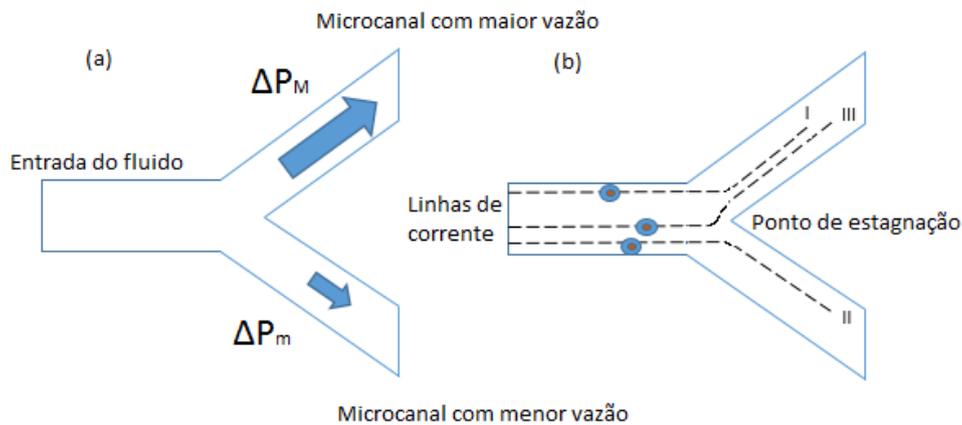


Figura 2.10: (a) Bifurcação com diferentes gradientes de pressão e tensão de cisalhamento na partícula, (b) ponto de estagnação que ocorre na bifurcação, adaptado de (Sajeesh, P., et al., 2014).

Observando a Figura 2.10, vemos uma linha de corrente, se o centro da partícula estiver sobre ela ou abaixo ela seguirá o caminho com maior vazão, se o centro da partícula estiver acima, ela seguirá pela bifurcação com menor vazão, como já foi dito, o Efeito Zweifach-Fung se baseia em diferentes quedas de pressões e forças de cisalhamento atuando sobre as partículas. A força de cisalhamento agindo sobre a partícula ao longo da direção de fluxo de alta velocidade é maior do que a força de cisalhamento no sentido ao longo da direção da alta vazão e que gera um torque sobre a partícula. Como um resultado, a partícula passa do canal com maior vazão quando se atinge o ponto de bifurcação e a vazão mínima à qual todas as partículas escapam para a bifurcação de alta vazão é chamado de "vazão crítica". A proporção de vazão crítica

entre os canais bifurcados é cerca de 2,5:1 (Jian Chen, et al, 2012) (Sung Yang, et al, 2006) (Faivre, M., et all., 2006) (Tripathi, Siddhartha, et al., 2013).

Estudos utilizando material biológico mostram que existe uma distribuição não-linear da parte sólida próximo as bifurcações, que levam uma distribuição não uniforme desta parte, observando que ao aumentar a resistência de uma das bifurcações a parte sólida não passaria por ele. Mostrando assim que as relações entre a vazão nas bifurcações apresentam um papel fundamental para que ocorra a separação (Bi-Feng Liu, et al., 2005) (Sung Yang, et al, 2006) (YC, 1993) (V. Doyeux, et al., 2011) (Tripathi, Siddhartha, et al., 2013) (Changqing Yi, et al., 2005). O fluxo de sangue após fracionado não é igual ao fluxo do sangue total, isso é, depois de separado, a parte sólida tem uma velocidade diferente da parte líquida devido a diferença de área apresentada pelo vaso bifurcado. Com isto, em 1981 o cientista Fung descreveu a microcirculação através de uma lei da bifurcação:

“Quando as hemácias (parte sólida) fluírem através de uma região de uma bifurcação em um vaso capilar sanguíneo, elas têm uma propensão a seguirem pelo ramo que tem a mais elevada taxa de fluxo, deixando um número relativamente pequeno de células no ramo que tem uma vazão menor. Neste caso, os glóbulos vermelhos são submetidos a uma superfície não uniforme de pressão perto dos ramos capilares, o que os leva ao ramo o qual contém a vazão mais elevada. Esta lei é aplicável quando a taxa de fluxo crítica é de 2,5: 1 entre os canais bifurcados.” (Sung Yang, et al, 2006) (V. Doyeux, et al., 2011) (YC, 1993).

Quando é aplicado sangue como fluido em um microcanal bifurcado, as hemácias (parte sólida) migram em direção ao centro do canal devido a Lei de Poiseuille como na Equação 2.1 (Kirby, 2010) (Bruus, 2008).

$$\Delta P = \frac{8\mu LQ}{\pi r^4} \quad , \quad (2.1)$$

onde ΔP é a diferença de pressão entre os extremos do canal, L é o comprimento do canal, μ é a viscosidade dinâmica, Q é a vazão volumétrica e r é a distância entre o centro do canal e a parede.

Deste modo, os glóbulos vermelhos no centro do microcanal tem uma velocidade mais elevada do que os outros componentes do sangue que estão perto da parede. Isto leva a uma redução do tempo de trânsito de eritrócitos através de um dado segmento de microcanais e, portanto, a uma redução na concentração de glóbulos vermelhos nesse segmento, em comparação com a concentração de glóbulos vermelhos que estão entrando com os que estão saindo pelo canal. Esta redução na concentração dinâmica de hemácias é chamado de 'Efeito Fahraeus' (Sajeesh & Sen, 2014) (C. Wyatt Shields IV, et al, 2015). A camada livre de células também serve como uma camada de lubrificação e ajuda a reduzir a viscosidade do sangue. Este fenômeno é chamado de Efeito "Fahraeus-Lindqvist". Quando hemácias migram para o centro, interações entre as hemácias e leucócitos provocam o deslocamento dos leucócitos em direção a parede, que é chamado de "marginação leucocitária" (Sajeesh & Sen, 2014) (C. Wyatt Shields IV, et al, 2015). Por vezes, esses glóbulos vermelhos aderem uns aos outros formando um aglomerado, o que aumenta a viscosidade do sangue e ajuda a marginação dos leucócitos dentro do núcleo dos glóbulos vermelhos. O efeito de "marginação" também é observado nas plaquetas no fluxo de sangue total. Este princípio de marginação também é usado para separar as bactérias a partir do sangue, como mostrado na Figura 2.10.

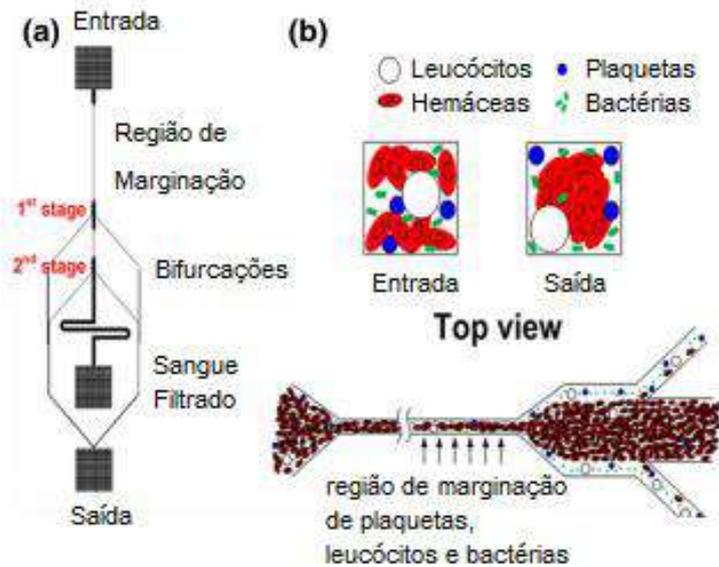


Figura 2.11: (a) Chip de marginação para a remoção do agente patogénico a partir do sangue (b) Vista em corte transversal na entrada e na saída de microcanais (Kersaudy-Kerhoas, 2010).

Ao estudar o fluxo sanguíneo em tubos cilíndricos, observa-se a variação na viscosidade sanguínea, com a redução do diâmetro de aproximadamente 300 μm para capilares de 8 μm , o qual pode ser visualizado na Figura 2.12. O "Efeito Fahraeus" é o decréscimo do valor da viscosidade aparente do sangue, que resulta essencialmente para uma migração axial dos eritrócitos que se afastam das paredes do tubo, onde a resistência ao fluxo é mais elevada (Silva J. A., 1984). Como consequência da separação (Figura 2.13) os eritrócitos aumentam sua velocidade atravessando mais rapidamente os capilares que a camada que está envolvida pelo plasma (quase sem células) ocasionando a redução da hematócrito dinâmico (Efeito Fahraeus) (Silva J. A., 1984).

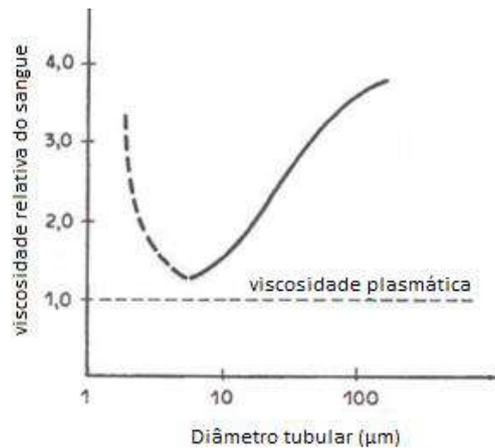


Figura 2.12: Efeito Fahraeus-Lindqvist. A viscosidade relativa aparente do sangue diminui com o diâmetro do canal até quase ao nível da viscosidade plástica (linha preenchida). A parte da curva tracejada representa o fenômeno de inversão, em que a viscosidade aparente aumenta substancialmente quando o diâmetro do canal atinge valores equivalentes aos diâmetros dos eritrócitos (Silva J. A., 1984).

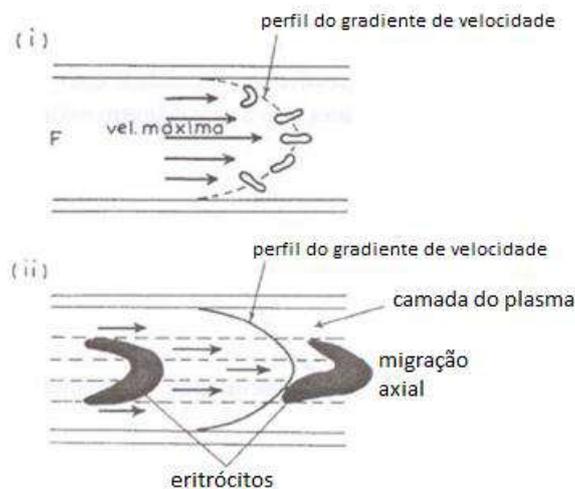


Figura 2.13: Distribuição da velocidade através de um vaso sanguíneo, resultante das forças de pressão na corrente laminar. Em (i) a velocidade de deslocação nas proximidades da parede do canal é inferior à verificada no eixo, em que atinge valores máximos. Como consequência os eritrócitos deslocam-se preferencialmente para as camadas axiais, orientando-se em elipsóides (ii). À medida que o diâmetro vascular diminui acentua-se a deformação dos eritrócitos que, migrando mais rapidamente ao longo do eixo do tubo, ocasionam a redução do hematócrito (Efeito Fahraeus). Paralelamente, forma-se uma camada envolvente de plasma que se desloca mais lentamente que os eritrócitos (Silva J. A., 1984).

Devido ao "Efeito Fahraeus", que é o efeito das forças hidrodinâmicas resultantes a partir da interação intercelular micróbios-hemácias, ocorre a marginação dos micróbios. Existem diferenças entre micróbios e os glóbulos vermelhos em termos de tamanho e rigidez da superfície das células. As bactérias não esféricas em forma de bastonete

entram em um movimento de rotação ao contrário das células esféricas. Devido a isto, as bactérias têm o direcionamento para a lateral, maior velocidade e podem ser facilmente separados a partir de células de sangue.

Para uma dada vazão e geometria, a inclusão de um obstáculo que proporcione uma região de compressão para o fluido, pode melhorar a camada livre de células adjacentes à parede (Faivre, M., et al., 2006). Observou-se que uma redução na largura do microcanal leva ao aumento da largura da camada livre de células. Essa redução de largura ajuda a direcionar as partículas/células da amostra para o centro de um microcanal, onde partículas sofreram influência de um maior gradiente de pressão e também aumentará a diferença de velocidade entre partículas e fluidos (Sajeesh, P., et al., 2014) (C. Wyatt Shields IV, et al, 2015).

Ao usar recursos de expansão e estreitamento no canal, as regiões de plasma livre de células podem ser criadas devido ao 'processo de marginação,' como se mostra na Figura 2.14 (a-e) (Sajeesh, P., et al., 2014) (Shevkoplyas, S.S., et al., 2005). O plasma pode ser retirado através de canais laterais. A recirculação do fluxo vai acontecer nas regiões de expansão, as quais produzem a força centrífuga para melhorar a separação. Uma série dessas regiões de constrições e expansão podem ser usados em série para aumentar ainda mais o processo de extração (Sajeesh, P., et al., 2014).

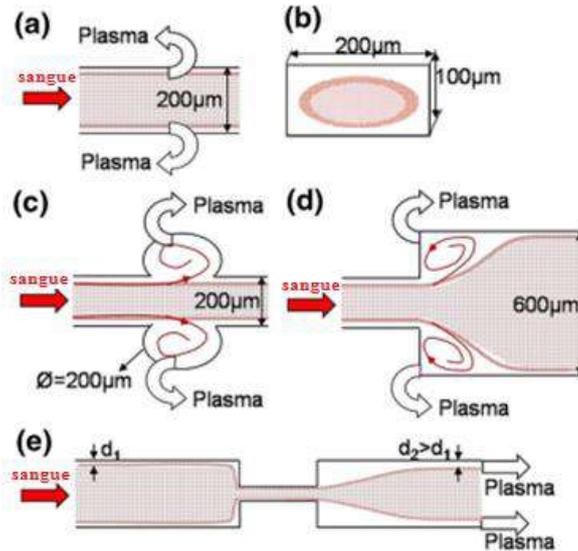


Figura 2.14: (a) Separação do plasma em um canal em linha reta, (b) células dentro microcanal livre de plasma (c-e) desnatação plasmática em um microcanal com estruturas de cavidade, expansão constrição e alargamento, respectivamente (Sajeesh, P., et al., 2014).

Nos microseparadores mostrados na Figura 2.15, o canal principal apresenta uma constrição, série de canais ramificados e t-bifurcações, a constrição concentra as partículas para o centro e aumenta a camada livre de células. Quando o sangue flui através de cada junção, o plasma é extraído para os canais laterais filhas, quanto menos bifurcações, menos plasma é separado.

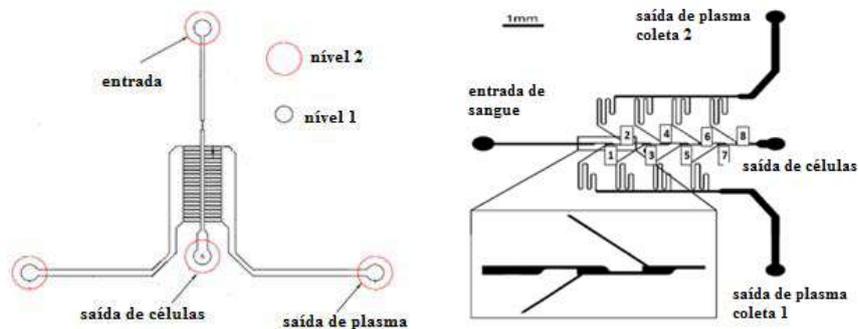


Figura 2.15: Microseparadores com múltiplas bifurcações juntamente com o canal de entrada para aumentar o rendimento (Sajeesh & Sen, 2014) (Kersaudy-Kerhoas, 2010).

Mas, a aplicação de um número de maior número de bifurcações como mostrado na Figura 2.15, o rendimento do plasma coletado é melhorado. Para aumentar ainda

mais o rendimento, o efeito de bifurcação e compressão pode ser explorado em conjunto (Kersaudy-Kerhoas, 2010). Aqui, as diminuições da área do canal bifurcado são feitas para assegurar que canal do plasma tenha uma resistência maior do que o fluido canal de glóbulos vermelhos. O design oferece maior rendimento e evita o entupimento do canal principal com células do sangue (Kersaudy-Kerhoas, 2010).

A separação do plasma a partir de sangue total também é feita num chip de microfluidos usando uma combinação do Efeito Zweifach-Fung, difusor de Nozzle e centrifugação. Neste design, dois microcanais em espiral de diferentes larguras e comprimentos são ligados ao “ralo” difusor. O ângulo entre o microcanal e o canal de difusão é de 45° , enquanto que o ângulo do “ralo” difusor é 30° como mostrado na Figura 2.16a. Devido à força centrífuga, as células migraram para o lado exterior do microcanal principal, como mostrado na Figura 2.16b. No ponto de ramificação, células continuam no canal de fluxo com alta velocidade devido à lei bifurcação, mas o plasma flui para a lateral do microcanal em espiral. A estrutura do “ralo” difusor melhora ainda mais a taxa de transferência, dando um gradiente de pressão entre o canal principal e o canal de plasma.

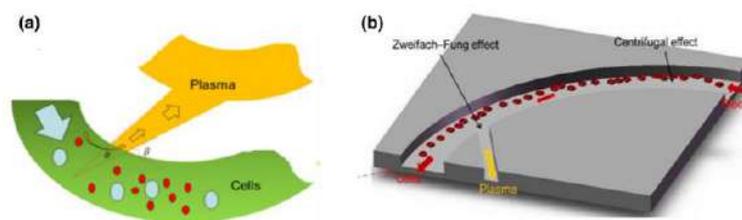


Figura 2.16: (a) Estrutura do difusor de Nozzle conectado a um canal em espiral e (b) combinação do Efeito Zweifach–Fung e efeito de força centrífuga (Sajeesh & Sen, 2014) (Zhaoxin Geng et al., 2011).

Com o estudo do estado da arte de microseparação, foi então verificado os métodos de microseparação, buscando um método que seja de simples aplicação. Outros fatores importantes a serem considerados foram baixo custo, possibilidade de testes com diferentes polímeros, eficiência de separação considerável. Mas tudo isso

deveria ser atendido pelos métodos de fabricação disponíveis no laboratório onde seria desenvolvimento do estudo. A selagem que não utilizasse um ambiente de sala limpa. Com base nesses requisitos, o método que melhor se adqua ao estudo é a Lei da Bifurcação.

Esse Efeito Zweifach-Fung, também conhecido como Lei da Bifurcação, pode ser aplicado para diferentes objetivos, por exemplo: detecção de células cancerígenas, anemia ferropriva, entre outros.

Pois esse microdispositivo pode identificar deformações geométricas relacionada as hemácias e diferentes tamanhos de células coletadas do corpo humano. Como apresenta uma vasta aplicação e um design simples, a escolha em projetar, fabricar, caracterizar e experimentar um microseparador confeccionado em Uretana Acrilato e Polidimetilsiloxano, levando em conta os parâmetros geométricos e características de escoamentos nos canais de pequena dimensão.

A escolha em fabricar em Polidimetilsiloxano (PDMS) vem de estudos da literarura, pois uma grande maioria dos microdispositivos utilizam-se desse polímero. Ele apresenta benefícios como transparência, a qual permite um estudo de escoamento utilizando o micro-PIV, ser inerte (não interage com o material aplicado no estudo do escoamento e separação) e ser polimerizado por elevação de temperatura.

Já a escolha em fabricar em Uretana Acrilato (UA) vem do baixo custo, fácil manuseio, não necessitando de sala limpa, facilidade de selagem e fácil aquisição no mercado brasileiro.

Com a vasta aplicação do polímero PDMS na literatura, fica viável uma verificação do microdispositivo fabricado em UA.

3. PROJETO DO MICROSSEPARADOR

A metodologia do projeto dimensional do microseparador é apresentada nesse capítulo. A Lei da Bifurcação, seus conceitos fundamentais, hipóteses e requisitos mínimos serviram de base para a definição dos principais parâmetros de projeto, como por exemplo, o requisito entre as vazões, que deve ser superior a 2,5:1 (Sung Yang, et al, 2006) (Tripathi, Siddhartha, et al., 2013) (Zoltán Fekete, et al., 2011). Para garantir o resultado desejável na separação. Para demonstrar que essa relação estabelecida precisa ser respeitada, um experimento foi realizado com uma com relação entre as vazões inferior a 2,5:1. O comprimento do canal de saída do plasma (bifurcação menor) foi calculado com base na Equação 3.15, a qual leva em consideração largura, comprimento e altura dos canais bifurcados para encontrar a relação entre as vazões.

Para o dimensionamento do microseparador – especificação das dimensões físicas dos capilares – a metodologia da analogia elétrico-hidráulica foi escolhida e é apresentada nesse capítulo. Considerando a pretensão de projetar, fabricar, caracterizar e avaliar um dispositivo microseparador, a infraestrutura de fabricação disponível no LabMEMs foi determinante na fase de projeto do microdispositivo separador.

Ao final desse capítulo estão os resultados obtidos durante a fase do projeto. Todos os parâmetros necessários para a fabricação são, então, apresentados em formato de tabela.

A infraestrutura disponível nas instalações do LabMEMs também é sistematicamente considerada, para garantir a viabilidade da futura etapa de fabricação. As descrições dos processos de fabricação do microdispositivo projetado nesse capítulo serão apresentadas em detalhe no próximo capítulo: Capítulo 4.

3.1 Fundamentos teóricos de microseparação com bifurcação

Para atingir o objetivo de projetar, fabricar, caracterizar e experimentar um microseparador baseado na Lei da Bifurcação (Fung & Zweifach, 1971), examinaremos os fenômenos físicos envolvidos no princípio de separação de Zweifach-Fung.

Os primeiros artigos que trataram da lei da bifurcação tiveram como principal motivação a microcirculação. Esses estudos, realizados desde a última metade do século passado, buscavam compreender a mecânica do escoamento sanguíneo em artérias humanas (~90 μm). Realizando um estudo teórico abrangente, buscando compreender como o fluido escoava dentro uma rede de microcanais com dimensões de mesma ordem de grandeza das veias humanas. Deste modo a lei da bifurcação se aplica no objeto desse estudo.

As técnicas de separação baseadas em microfluidos compostos por uma parte sólida e uma parte líquida, adaptam-se aos fenômenos hemodinâmicos que envolvem suas propriedades intrínsecas de forma a se alcançar o fracionamento desejado dos componentes do mesmo. Estes fenômenos incluem a drenagem da parte líquida da parte sólida pelo efeito Zweifach-Fung, também conhecido por lei da bifurcação. Inicialmente testado em microcanais (Zhaoxin Geng et al., 2011) usando dois tipos de partículas (microesferas de poliestireno divinilbenzeno com 16 μm de diâmetro e células de melanoma humano C8161), estes efeitos foram observados e reproduzidos em sistemas microfluídicos (Shevkoplyas, S.S., et al., 2005) (Faivre, M., et al., 2006) aplicados aos mais diferentes tipos de composição: sangue, leite, urina, partículas fluorescentes imersas num líquido, entre outros.

O Efeito de Zweifach-Fung consiste na tendência de partículas imersas em fluidos escoando em bifurcações entrarem no capilar com a maior vazão. Isto ocorre, principalmente, pelas seguintes razões: em primeiro lugar, o ramo para o qual as partículas migram é o que apresenta a vazão mais elevada e está sujeito a uma pressão mais baixa, por conseguinte, as partículas são atraídas para esse ramo. Em segundo

lugar, as partículas sujeitas a diferentes vazões também sofrem diferentes tensões viscosas. Este efeito está esquematizado na Figura 3.1.

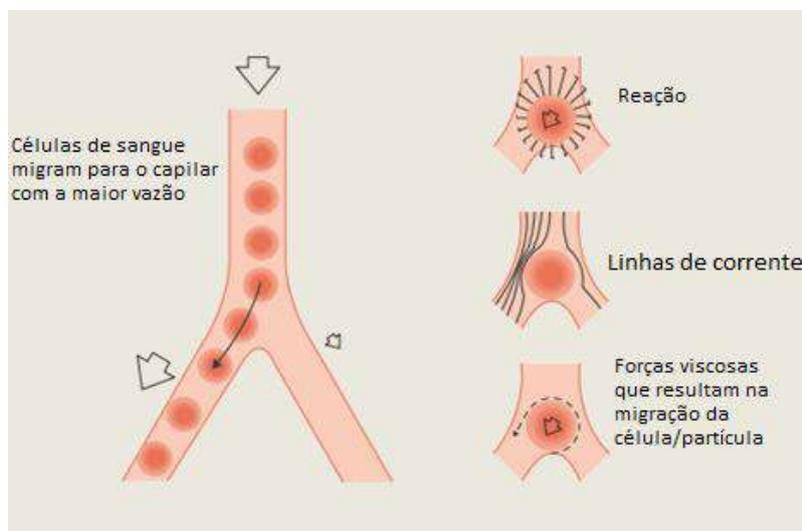


Figura 3.1: Esquema da estrutura de separação baseado no Efeito Zweifach-Fung, também conhecido como lei da bifurcação (Zhaoxin Geng et al., 2011).

Baseado nos estudos aplicando a Lei da Bifurcação, o presente estudo se propõe a projetar, fabricar, caracterizar e experimentar um microseparador, com um baixo custo e com uma geometria diferenciada do trabalho que foi baseado através de estudo da literatura (Tripathi, Siddhartha, et al., 2013). O estudo da literatura (Tripathi, Siddhartha, et al., 2013) fabricou diferentes separadores com os canais de saída com diferentes comprimentos para então ter uma diferença de vazão entre os canais bifurcados.

O presente trabalho, propõe uma geometria com comprimentos dos canais bifurcados iguais, mas variando o diâmetro hidráulico, de modo a variar a resistência hidráulica, para diferentes ângulos entre os canais bifurcados, os quais serão apresentados ao longo deste capítulo.

3.2 As equações do movimento

O sistema de coordenadas adotado para a geometria do microseparador é apresentado na Figura 3.2(a). Destaque para o perfil de velocidades no microcanal, na

direção longitudinal do escoamento é ilustrado na Figura 3.2(b). A direção principal do escoamento é a direção y , sendo a largura na direção x e a altura na direção z , onde $0 < x < w$, $0 < z < h$ e $0 < y < L$, sendo w a largura do canal, h sua altura e L seu comprimento.

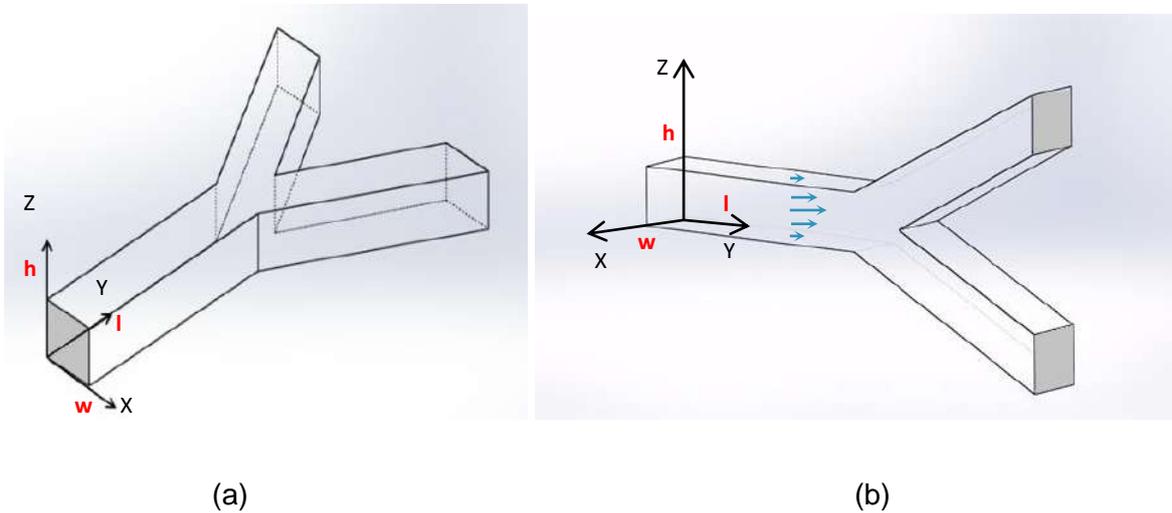


Figura 3.2: (a) Sistema de coordenadas adotado para representação do microcanal. A direção x representa a largura, a direção z representa a altura e a direção y é a direção principal do escoamento do fluido. (b) Perfil do microcanal com destaque para a direção do escoamento do fluido.

Como ilustrado na Figura 3.2, considerando o escoamento em um duto retangular, onde a largura é maior do que a altura, $w > h$, e equação da continuidade, as equações de Navier-Stokes e condições de contorno são representadas pelas Equações 3.1, 3.2 e 3.3,

$$\frac{\partial u_y}{\partial x} + \frac{\partial u_y}{\partial z} = 0 \quad (3.1)$$

$$\mu \left[\frac{\partial^2 u_y}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u_y}{\partial z^2} \right] = -\frac{\Delta p}{L}, \text{ para } 0 < x < w, 0 < z < h \quad (3.2)$$

$$u_y(x, z) = 0, \text{ para } x = 0, x = w, z = 0, z = h \quad (3.3)$$

onde u_y é a velocidade na direção y , μ é a viscosidade dinâmica, w é a largura e h é a altura do microcanal.

3.3 Parâmetros construtivos do projeto para o microdispositivo

Ao considerar a variação de pressão de um escoamento em um microcanal é necessário considerar sua influência na resistência hidráulica. Assim, levando em conta a dependência explícita da resistência hidráulica do canal na variação de pressão, por definição (Bruus, 2008), o balanço de massa do escoamento em função da resistência hidráulica resulta na Equação 3.4.

$$R_H(\Delta p) = \frac{\Delta p}{Q(\Delta p)} \quad (3.4)$$

De fato, em um escoamento com gradiente de pressões nulo, ou seja, com perda de carga constante, a vazão também será constante. Esse resultado está de acordo com a Lei de Hagen-Poiseuille (Equação 3.5).

$$\Delta p = R_H Q = \frac{1}{G_H} Q, \quad (3.5)$$

onde R_H e G_H são fatores de proporcionalidade conhecidos por resistência hidráulica e condutância, respectivamente. A lei de Hagen-Poiseuille é análoga à lei de Ohm (equação 3.6):

$$\Delta V = I R_E, \quad (3.6)$$

relacionando a corrente elétrica I com a resistência elétrica R_E e a diferença de potencial ΔV . A analogia elétrica será utilizada posteriormente para o cálculo de perda de carga no escoamento.

Da mesma forma que a resistência elétrica se relaciona com a dissipação de energia por efeito Joule, a resistência hidráulica se relaciona à dissipação viscosa de energia mecânica resultante do atrito fluido.

O comportamento da dissipação de energia devido aos efeitos viscosos no escoamento de Poiseuille é análogo ao comportamento da potência elétrica consumida por efeito Joule, portanto a analogia elétrica se apresenta como ferramenta adequada para estimar a resistência hidráulica. As expressões para resistência hidráulica de

microcanais de diferentes geometrias estão disponíveis na literatura (Zoltán Fekete, et al., 2011).

Para projetar, fabricar, caracterizar e experimentar o dispositivo microseparador, primeiramente foram especificadas as dimensões dos canais, o diâmetro hidráulico e o comprimento dos microcanais. A analogia de circuitos elétricos foi a metodologia adotada para determinação dos parâmetros do microseparador, de modo que as resistências hidráulicas dos canais pudessem ser calculadas. A escolha das vazões apropriadas foi obtida fixando as dimensões do microcanais, e considerando as possibilidades de fabricação do Laboratório (Sung Yang, et al, 2006) (Zoltán Fekete, et al., 2011) (Tripathi, Siddhartha, et al., 2013).

O uso da analogia de circuitos elétricos é intuitiva e permite relacionar o escoamento ao fluxo de eletricidade e considerar que as moléculas do fluido em um circuito hidráulico se comportam de forma similar aos elétrons em um circuito elétrico. A Figura 3.3 ilustra a similaridade física entre o escoamento de um fluido e a fluxo da corrente (Zoltán Fekete, et al., 2011). A Tabela 3.2 resume as relações de semelhança na abordagem por analogia elétrico-hidráulica.

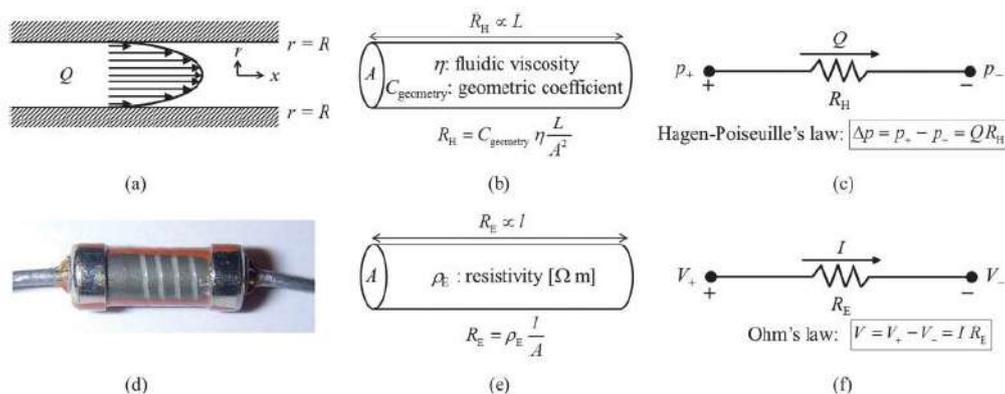


Figura 3.3: Similaridade física entre vazão elétrica e vazão de um fluido. (a) Fluido de Poiseuille em um duto circular, (b) a resistência hidráulica em um canal circular, (c) símbolo de um resistor como se fosse uma resistência hidráulica do fluido da Lei de Hagen-Poiseuille em analogia com a Lei de Ohm, (d) resistor elétrico, (e) resistência elétrica e (e) símbolo de um circuito com resistor elétrico e Lei de Ohm (Kwang W. Oh, et al., 2012).

Tabela 3.1: Correspondência física na analogia entre circuitos hidráulicos e elétricos (Bruus, 2008).

Circuito hidráulico	Circuito elétrico
Bomba de seringa	Bateria
Vazão volumétrica [m^3s^{-1}]	Corrente elétrica [A]
Variação de Pressão [Pa]	Variação de voltagem [V]
Resistência Hidráulica [Pas^3m^{-1}]	Resistência Elétrica [Ω]
Lei de Hagen-Poiseuille	Lei de Ohm
Lei da conservação das massas	Lei de Kirchhoff para corrente
Lei da conservação da energia	Lei de Kirchhoff para tensão
Divisão de Fluido	Divisão de corrente
Divisão de Pressão	Divisão de tensão
Viscosidade do Fluido [μ]	Resistividade [Ωm]

Fazendo uma analogia entre a Lei de Hagen-Poiseuille (Equação 3.9) e Lei de Ohm (Equação 3.10), temos que: P é a pressão (Pa) e é análoga a V que é tensão (V), Q é vazão volumétrica (m^3/s) sendo análoga a I corrente elétrica (A) e R_{Hidri} é a resistência hidráulica análoga a R_E (Ω). O cálculo da vazão volumétrica é obtido pelas Equações 3.7 e 3.8,

$$Q = \frac{\Delta p}{R_H} \quad , \quad (3.7)$$

ou

$$Q = u_{m\u00e9dio} A \quad . \quad (3.8)$$

Na pr\u00e1tica, a analogia entre o circuito el\u00e9trico e a resist\u00eancia hidr\u00e1ulica permite especificar a vaz\u00e3o requerida em projeto, fixando o comprimento dos canais e estabelecendo a raz\u00e3o entre as vaz\u00f5es de pelo menos 2,5:1 (Sung Yang, et al, 2006) (Tripathi, Siddhartha, et al., 2013) (Zolt\u00e1n Fekete, et al., 2011).

A Equa\u00e7\u00e3o 3.8 para calculo da vaz\u00e3o, pode ser reescrita como sendo:

$$Q = \int_0^w dy \int_0^h \left[\frac{\partial u_y}{\partial x} + \frac{\partial u_y}{\partial z} \right] dz \quad (3.9)$$

$$= \frac{4h^2 \Delta p}{\pi^3 \mu L} \sum_{n, \text{impar}} \frac{1}{n^3} \frac{2h}{n\pi} \left[w - \frac{2h}{n\pi} \tanh \left(n\pi \frac{w}{2h} \right) \right] \quad (3.10)$$

$$= \frac{8h^3 \Delta p}{\pi^4 \mu L} \sum_{n, \text{ímpar}}^{\infty} \left[\frac{1}{n^4} - \frac{2h}{w \pi} \frac{1}{n^5} \tanh \left(n \pi \frac{w}{2h} \right) \right] \quad (3.11)$$

$$= \frac{h^3 w \Delta p}{12 \mu L} \left[1 - \sum_{n, \text{ímpar}}^{\infty} \left[\frac{1}{n^5} - \frac{192}{\pi^5} \frac{h}{w} \tanh \left(n \pi \frac{w}{2h} \right) \right] \right] \quad (3.12)$$

Isolando Δp na Equação 3.16, temos:

$$\Delta p = Q \frac{12 \mu L}{wh^3 \left(1 - \frac{h}{w} \left(\frac{192}{\pi^5} \sum_{n=1,3,5,\dots}^{\infty} \frac{1}{n^5} \tanh \frac{n w \pi}{2h} \right) \right)} \quad (3.13)$$

Comparando a Equação 3.7 com a Equação 3.13, temos a seguinte expressão para o cálculo da resistência hidráulica:

$$\frac{1}{R_H} = \frac{12 \mu L}{wh^3 \left(1 - \frac{h}{w} \left(\frac{192}{\pi^5} \sum_{n=1,3,5,\dots}^{\infty} \frac{1}{n^5} \tanh \frac{n w \pi}{2h} \right) \right)} \quad (3.14)$$

onde L, h e w são comprimento, profundidade e largura do canal, respectivamente, μ é a viscosidade dinâmica do fluido e n é um contador de números ímpares inteiros positivos.

3.4 Microdispositivos projetado com base nos resultados dos parâmetros construtivos

A proporção da vazão entre os canais da bifurcação pode ser determinada controlando a razão da resistência hidráulica (Bruus, 2008) entre o canal de entrada e o canal menor, cuja pressão na saída é a atmosférica, desta forma, tem-se as dimensões do canal bifurcado, maior e menor.

Para o cálculo das dimensões dos microssperadores é utilizada a resistência hidráulica (Equação 3.14). Para um dispositivo de entrada de 400 μm de largura e saída de 100 μm no canal de menor largura, encontrou-se um comprimento de 2 mm para a bifurcação maior e 20 mm para a bifurcação menor, todos com a altura padronizada em

50 μm , com base no cálculo da resistência hidráulica. A Figura 3.4 mostra o microseparador projetado, onde as dimensões na lagura para a entrada é 400 μm e 10 mm, bifurcação maior 400 μm e 2 mm (saída de células) e bifurcação menor 100 μm e 20 mm (saída de plasma), com um ângulo entre as bifurcações de 90° .

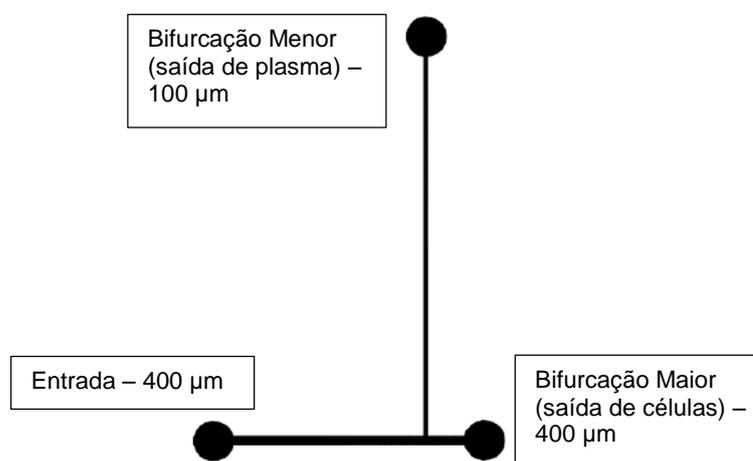


Figura 3.4: Microdispositivo projetado com largura de entrada de 400 μm e comprimento de 10 mm, bifurcação maior com largura de 400 μm e comprimento de 2 mm e bifurcação menor com 100 μm e 20 mm, com ângulo entre as bifurcações de 90° e altura padrão de 50 μm .

A Tabela 3.2 apresenta as geometrias do microdispositivo da Figura 3.5. Os parâmetros de largura, comprimento do canal de entrada e comprimento da bifurcação com maior e menor apresentam uma dependência explícita com a resistência hidráulica.

Tabela 3.2: Geometrias dos microdispositivos conforme Fig. 3.4, os comprimentos analisados são calculados por resistência hidráulica.

Largura (μm)			Comprimento (mm)			Altura (μm)		
Entrada	B. Maior	B. Menor	Entrada	B. Maior	B. Menor	Entrada	B. Maior	B. Menor
400	400	100	10	2,0	20	50	50	50

A proporção entre as vazões dos canais bifurcados é proveniente da razão entre a vazão na saída concentrada de células (bifurcação maior) em comparação com a vazão do canal por onde sairá o plasma (bifurcação menor), utilizando a Equação 3.15 (Tripathi, Siddhartha, et al., 2013):

$$F_Q = \frac{Q_1}{Q_2} = \frac{L_p w_b \left\{ 1 - 0,63 \left(\frac{h_b}{w_b} \right) \right\}}{L_b w_p \left\{ 1 - 0,63 \left(\frac{h_p}{w_p} \right) \right\}}, \quad (3.15)$$

onde F_Q é a razão entre as vazões dos canais bifurcados, Q_1 é a vazão no canal com maior diâmetro hidráulico (saída de células), Q_2 é a vazão no canal de menor diâmetro hidráulico (saída de plasma), L_p e w_p são o comprimento e largura do canal do plasma respectivamente, L_b e w_b são o comprimento e largura do canal do sangue respectivamente, h_p e h_b são alturas dos canais do plasma e sangue.

A Tabela 3.3, baseada nos dados da Tabela 3.2 e aplicando a Equação 3.15, apresenta o valor de proporcionalidade de aproximadamente 54 para as vazões entre os microcanais bifurcados de saída.

Para o dispositivo analisado para um valor predeterminado de vazão na entrada de 0,150 mL/min (Tripathi, Siddhartha, et al., 2013).

Tabela 3.3: Com os valores apresentados para os microseparadores na Tabela 3.2, foram calculados os valores proporcionais entre as vazões dos canais bifurcados para os dispositivos analisados e fabricados.

Microseparador	Comprimento (mm)		Proporção entre canais bifurcados (Q_1/Q_2)
	Bif. Maior	Bif. Menor	
	2,0	20,0	53,795

Uma vez que as dimensões de altura e largura dos canais foram definidas é possível calcular o diâmetro hidráulico " D_H " dos respectivos canais: entrada e os dois canais bifurcados, utilizando a Equação 3.16:

$$D_H = \frac{4 \text{ (área do microcanal)}}{\text{perímetro do microcanal}}, \quad (3.16)$$

onde a área é calculada utilizando a altura e largura do microcanal e seu perímetro é a soma dos lados. Uma vez que se especifique as vazões totais pode-se então calcular as velocidades médias em cada canal. Em seguida pode-se avaliar o número de

Reynolds (Equação 3.17) avaliando assim a importância entre as forças inercias pelas forças viscosas para cada canal (Robert W.Fox, 2001) (Pijush K. Kundu, Ira M. Cohen, David R Dowling Ph.D. , 2012):

$$Re = \frac{\text{forças inerciais}}{\text{forças viscosas}} = \frac{\rho u D_H}{\mu} \quad (3.17)$$

onde ρ é a densidade do fluido, u é a velocidade média, D_H é o diâmetro hidráulico e μ é a viscosidade do fluido estudado.

A Tabela 3.4 apresenta os valores de diâmetro hidráulico que foi calculado utilizando a Equação 3.16, resistência hidráulica utilizando a Equação 3.14, vazão, velocidade e número de Reynolds fazendo uso da Equação 3.17 para o microdispositivo estudado.

Tabela 3.4: Valores do diâmetro hidráulico, resistência hidráulica, vazão e Re para o microseparador projetado, com dimensões apresentadas na Tabela 3.2.

Microcanal	Diâmetro hidráulico (μm)	Resistência hidráulica ($\text{Pa}\cdot\text{s}/\text{m}^3$)	Vazão (mL/min)	Velocidade (m/s)	Re
Entrada	88,89	$9,72 \cdot 10^{13}$	0,150	0,125	0,274
B. Maior	88,89	$2,08 \cdot 10^{13}$	0,147	0,122	0,272
B. Menor	66,67	$1,12 \cdot 10^{15}$	0,003	$2,3 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-5}$

Dois parâmetros significativos são usados para caracterizar a eficiência de separação (η) e pureza (PE) são definidos pelas Equações 3.18 e 3.19, respectivamente.

$$\eta = \frac{C_s - C_p}{C_s} \times 100 \quad (3.18)$$

onde C_s é o número de células por μl de sangue que entra no dispositivo e C_p é o número de células por μl que saem no microcanal menor, canal do plasma.

$$PE = 1 - \frac{C_p}{C_E} \quad (3.19)$$

onde C_p é a concentração de partículas no canal de plasma e C_E é a concentração de partículas no canal de entrada.

A eficiência da taxa de separação é diretamente proporcional a diferença entre vazão de entrada do fluido e a sua vazão de saída, como mostra a Tabela 3.5 abaixo e a Figura 3.6, mostrando por (Zhaoxin Geng et al., 2011), que quanto maior a vazão no canal menor, menor será sua eficiência de separação.

Tabela 3.5: Relação entre a vazão de entrada, vazão de saída do plasma e eficiência de separação (Zhaoxin Geng et al., 2011).

Vazão de entrada ($\mu\text{L/s}$)	Vazão de saída do plasma ($\mu\text{L/s}$)	Eficiência de separação (%)
0,068	0,0597	95,1
0,314	0,295	94
0,628	0,585	93,2
0,942	0,872	92,6
1,256	1,157	92,1
1,570	1,441	91,8
1,884	1,724	91,5
2,198	2,007	91,3
2,512	2,289	91,1
2,826	2,571	91
3,140	2,853	90,9

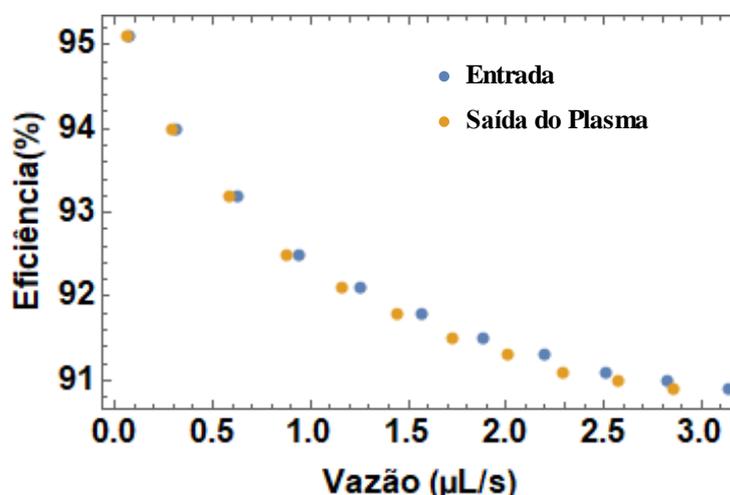


Figura 3.5: Gráfico ilustrativo da Tabela 3.5 o que apresenta que quanto menor a vazão de entrada e no canal do plasma, maior será a porcentagem de eficiência de separação entre as partículas, adaptado de (Zhaoxin Geng et al., 2011).

O experimento para a verificar se a relação entre as vazões dos canais bifurcados necessita resguardar o valor de 2,5:1, iniciou-se utilizando a Equação 3.15 para verificar

o comprimento da saída do plasma para que a relação entre as vazões ficasse num valor menor que o mencionado na literatura (Tripathi, Siddhartha, et al., 2013) (Zoltán Fekete, et al., 2011). Utilizando o que já foi estudado neste capítulo, ao altura foi de 50 μm , canal de entrada com comprimento de 10 mm e 400 μm de largura, a bifurcação maior (saída de células) com 2 mm de comprimento e 400 μm de largura e para a bifurcação menor (saída de plasma) sua largura foi de 100 μm e seu comprimento foi de 0,75 mm, assim apresentando uma relação entre as vazões dos canais bifurcados de 2:1. O microdispositivo foi fabricado em PDMS, processo descrito no capítulo 5, com uma vazão de entrada de 0,150 mL/min, como mostrado na Figura 3.6.

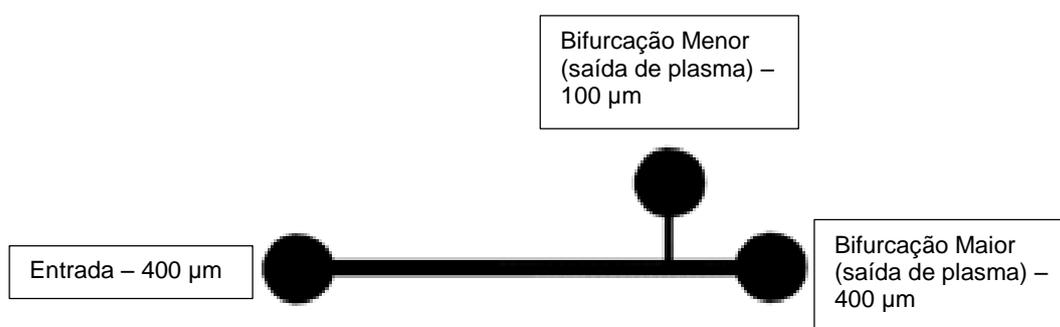


Figura 3.6: Desenho do microseparador fabricado para testar a relação entre as vazões entre as bifurcações.

Assim que o escoamento começa a entrar pelo microdispositivo, ele tende a sair somente pela bifurcação (saída) menor (100 μm) e apresenta uma vazão muito baixa na bifurcação maior (Figura 3.7) (Tripathi, Siddhartha, et al., 2013). Mostrando assim que a relação entre os canais bifurcados na relação 2,5:1 deve ser respeitada. Isso pode ser observada na sequência de fotos da Figura 3.7.

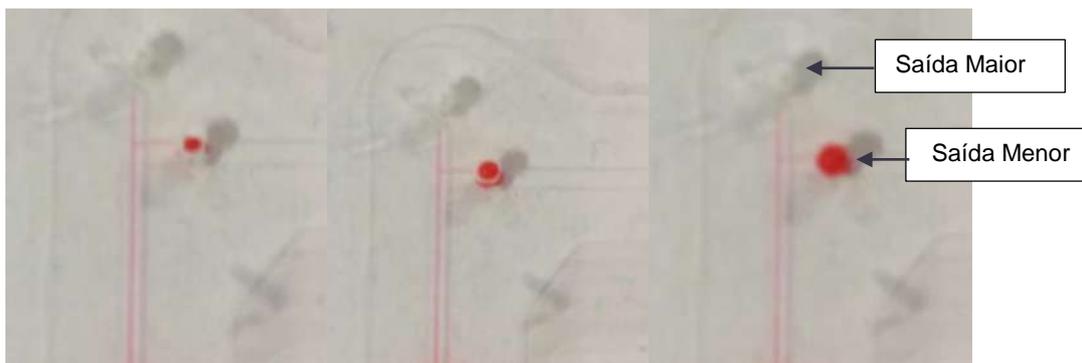


Figura 3.7: Sequência do fluido escoando pelo microdispositivo saindo pela saída menor.

O microdispositivo apresentado na Figura 3.4, foi o microseparador utilizado no presente trabalho e apresentado detalhadamente os estudos nele realizados ao longo do texto.

4. ANÁLISE TEÓRICA

Este capítulo apresenta o estudo teórico realizado para o microdispositivo apresentado no capítulo anterior, que foram fabricados em dois diferentes polímeros. Quando fabricados em polímeros, suas dimensões variam ligeiramente do projetado e esses novos microseparadores também são simulados para uma posterior comparação. A ferramenta computacional COMSOL Multiphysics 5.2 é utilizada neste processo o qual é explicado em detalhes nesse parte da tese.

Neste estudo teórico serão analisados o escoamento do fluido, tanto sanguíneo quanto para a água, variando a quantidade de hemácias no escoamento, ângulo entre as bifurcações, as velocidades de entrada do fluido no dispositivo e os valores médios de velocidade e pressão nos microcanais bifurcados.

Com os resultados obtidos nesta etapa teórica serão utilizados na parte experimental e ambos posteriormente serão comparados.

4.1 Modelo Físico e Matemático

O microdispositivo estudado, cujas geometrias já foram apresentadas no capítulo 3, Figura 3.4 e Tabela 3.2, o valor de vazão de entrada será de 0,150 mL/min assim a proporção de 54:1 (Tripathi, Siddhartha, et al., 2013) é satisfeita e o Efeito de Zweifach-Fung é aplicado satisfatoriamente. Essa proporção de 54:1 ficou maior que o necessário para ter uma margem de erro quando fabricados os canais com polímeros, pois a largura e altura interferem nesse valor. Os dados simulados apresentados a seguir são todos baseados nas medidas projetadas no início do estudo, com dimensões apresentadas na Figura 4.1.

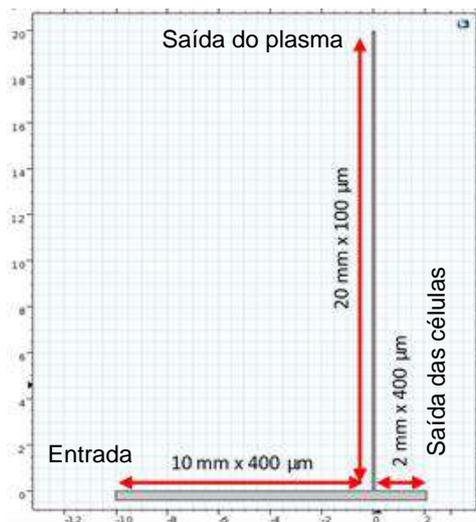


Figura 4.1: Dimensões do microseparador estudado, medidas em μm e mm.

Os valores de resistência hidráulica, diâmetro hidráulico, velocidade e número de Reynolds obtido através de uma analogia com o circuito elétrico estão apresentados na Tabela 4.1 para a entrada, bifurcação maior (saída de células, chamado assim devido a largura) e bifurcação menor (saída de plasma).

Tabela 4.1: Valores de resistência hidráulica, diâmetro hidráulico, velocidade e número de Reynolds para o microseparador apresentado na Figura 4.1.

μcanal	Largura (μm)	Compr. (mm)	Altura (μm)	Q (mL/min)	D_H (μm)	$R_{\text{Hidr.}}$ (Pa.s/m ³)	V (m/s)	Re
Entrada	400	10	50	0,150	88,89	$9,72 \cdot 10^{13}$	0,125	0,274
B. maior	400	2	50	0,146	88,89	$2,08 \cdot 10^{13}$	0,122	0,272
B. menor	100	20	50	0,004	66,67	$1,12 \cdot 10^{15}$	$2,3 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-5}$

4.1.1 Modelo Físico

O microseparador proposto tem teoricamente um canal de entrada de 10,0 mm de comprimento, 400 μm de largura, um dos canais de saída (bifurcação maior) com 2,0 mm de comprimento, 400 μm de largura e outro canal de saída (bifurcação menor) de 20,0 mm de comprimento e 100 μm , 50 μm de profundidade por todo o canal (Tabela 4.2) e um ângulo de 90° entre os canais de saída, apresentado na Figura 4.1, o sistema de coordenadas estão na bifurcação do microseparador para enfocar e facilitar os estudos (Figura 4.2).

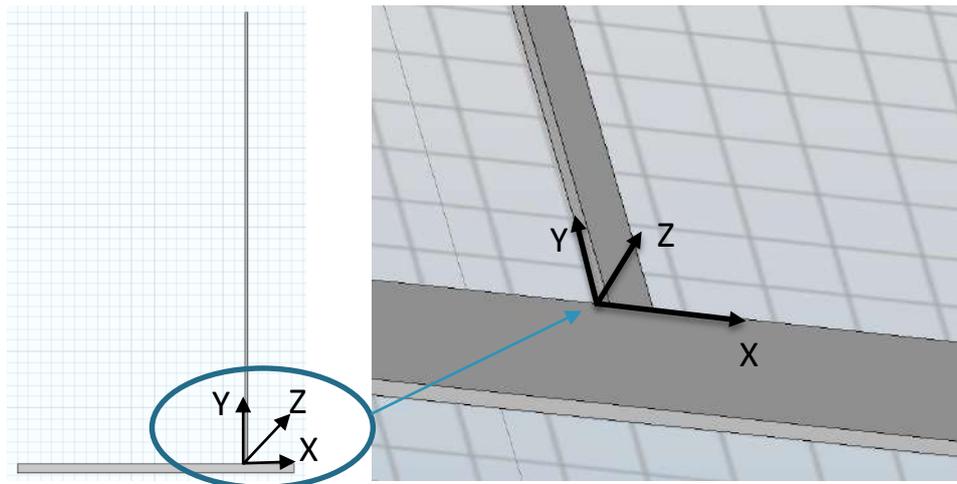


Figura 4.2: Sistemas de coordenadas na base do microseparador para facilitar os estudos.

4.1.2 Modelo Matemático

As hipóteses adotadas no presente estudo foram:

- Fluido Newtoniano e incompressível,
- Escoamento laminar
- Regime permanente
- Propriedades constantes
- Condições de não-deslizamento junto as paredes.

Este problema pode ser matematicamente descrito pelas Equações 4.1 e 4.2, equação da continuidade e equação de Navier-Stokes (equação da conservação da quantidade de movimento linear), respectivamente:

$$\Delta \vec{u} = 0 \quad (4.1)$$

$$\rho(\vec{u} \cdot \nabla) \vec{u} = \nabla \cdot \left[-p\mathbf{I} + \mu(\nabla \vec{u} + (\nabla \vec{u})^T) \right] + \vec{F} \quad (4.2)$$

onde \vec{u} é o vetor campo de velocidade, ρ é a massa específica do fluido, p é a pressão, μ é a viscosidade do fluido, \vec{F} representa todas as forças externas que podem estar presente e atuando no escoamento. As equações que definem as condições de contorno de não-deslizamento na parede. Onde a Equação 4.4 representa o valor da

velocidade média na entrada do dispositivo e a Equação 4.5 é a condição de pressão na saída dos microcanais.

$$u_y(x, z) = 0, \text{ para } x = 0, x = -w, z = 0, z = h \quad (4.3)$$

$$u_{\text{média}} = 0,125 \text{ m/s} \quad (4.4)$$

$$P = 0 \quad (4.5)$$

De forma resumida, as etapas que foram analisadas no estudo teórico foram:

- Ângulos entre os canais bifurcados;
- Velocidades médias de entrada;
- Escoamento com o fluido incompressível;
- Escoamento com o fluido sangue;
 - Variando o ângulo entre os canais bifurcados, variando a quantidade de partículas e fixando o valor da velocidade média de entrada;
 - Fixando a quantidade partículas e variando o valor da velocidade média de entrada;
 - Variando a quantidade de partículas e fixando o valor da velocidade média de entrada.

4.2 Método de solução e implementação computacional

Na análise numérica do microseparador, foi implementada com auxílio da ferramenta computacional COMSOL *Multiphysics* 5.2, a qual baseia-se no método de elementos finitos. A Figura 4.3 abaixo, ilustra a interface gráfica da plataforma de implementação computacional aqui adotada.

As malhas são definidas por pequenos elementos que podem ter a forma triangular-quadrada ou tetraédrica-cúbica, a qual vai determinar o número de graus de liberdade. Quando o software “Iê” esta malha, ele interpreta os pontos de ligação entre elementos

(nódulos). Quanto mais refinada for a malha, menores os elementos, o que indica que no mesmo intervalo de comprimento, mais nódulos serão encontrados, isto aumenta o nível de interpolação, conseqüentemente, mais graus de liberdade serão usados pelo software para gerar melhores resultados. O uso do COMSOL com uma malha chamada mais “grosseira” não descarta os resultados como errôneos, mas a plataforma permite variações mais suaves com maiores graus de liberdade, o que garante precisão nos dados. Em se tratando de dispositivos microfluídicos, devido a escala, preza-se pela precisão destes dados. As malhas utilizadas no presente estudo são da forma triangular-quadrática, com os menores tamanhos possíveis.

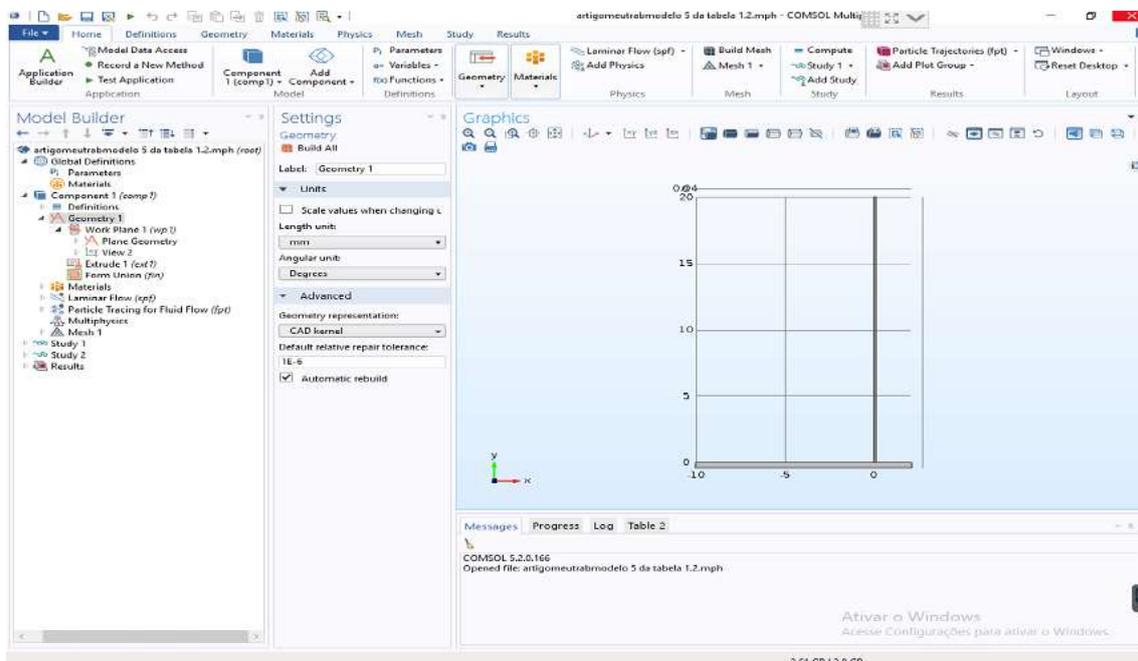


Figura 4.3: Interface do COMSOL *Multiphysics* 5.2 para implementação do problema.

Como pode ser visto na Figura 4.3 a interface do COMSOL é basicamente formada por três partes distintas: a) Construtor do modelo (*Model Builder*), onde são expostos os parâmetros e o modelo a ser resolvido; b) Janela dos detalhes (janela do meio), onde serão inseridos os detalhes do problema, ou seja, os valores de cada informação

inserida; c) Gráficos (*Graphics*), onde são mostradas as informações relacionadas à parte gráfica do problema, como por exemplo, as malhas, a geometria e os resultados.

O problema é implementado na ferramenta computacional COMSOL procedendo na seguinte ordem:

1) Definições globais (*Global Definitions*) – Nesta seção são definidos os valores dos parâmetros utilizados no problema como: escala, ângulos a serem utilizados na geometria, por exemplo, são especificadas incógnitas que o usuário deseja criar. O uso deste procedimento não é obrigatório para a solução de problemas;

2) Modelo (*Model*) – Nesta seção são definidas a geometria, a malha e as físicas do problema a serem resolvidas. Em definições (*definitions*) o usuário entra com valores de variáveis por ele criadas, que serão usadas efetivamente na solução do problema.

A Figura 4.4 mostra detalhadamente as abas do problema na janela do construtor de modelo.

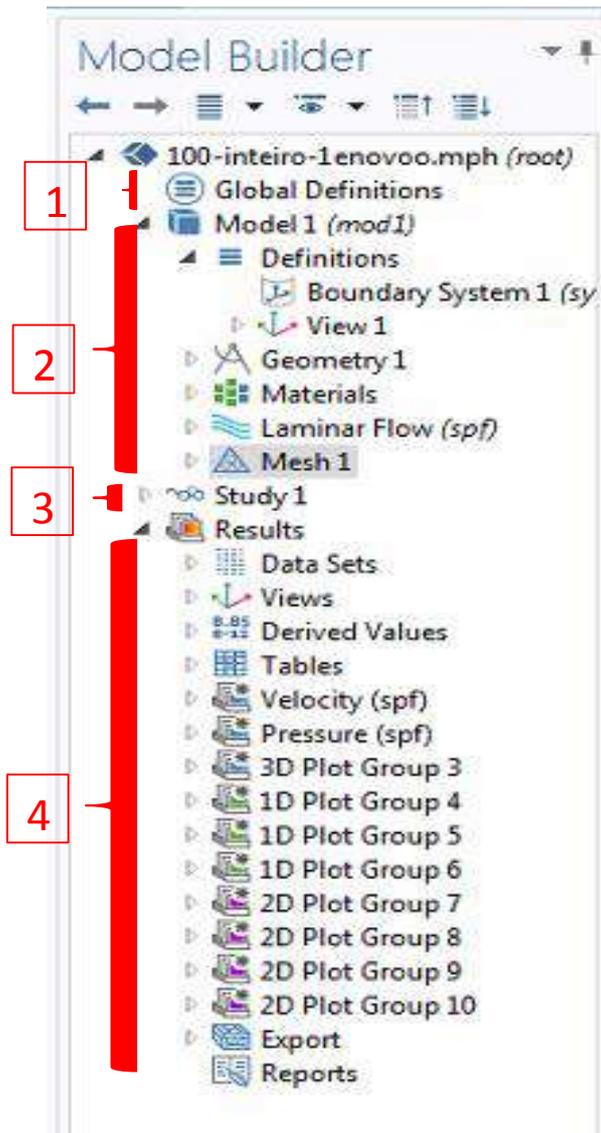


Figura 4.4: Detalhes da janela construtor de modelo.

No caso do presente estudo, a geometria foi importada do programa AutoCad para o COMSOL, e depois utilizando um comando do programa, ela foi “extrudada” (Figura 4.5) para a altura de 0,05 mm, ficando como apresentado na Figura 4.6.

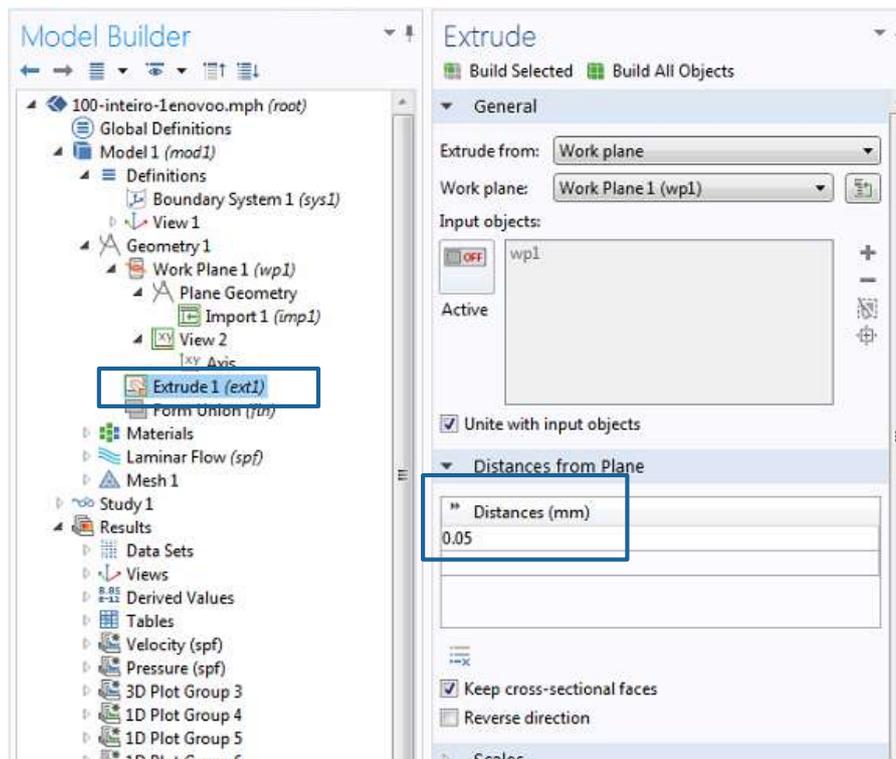


Figura 4.5: Comando extrude, o qual é responsável por dar a altura desejada ao microseparador com altura de 0,05 mm.

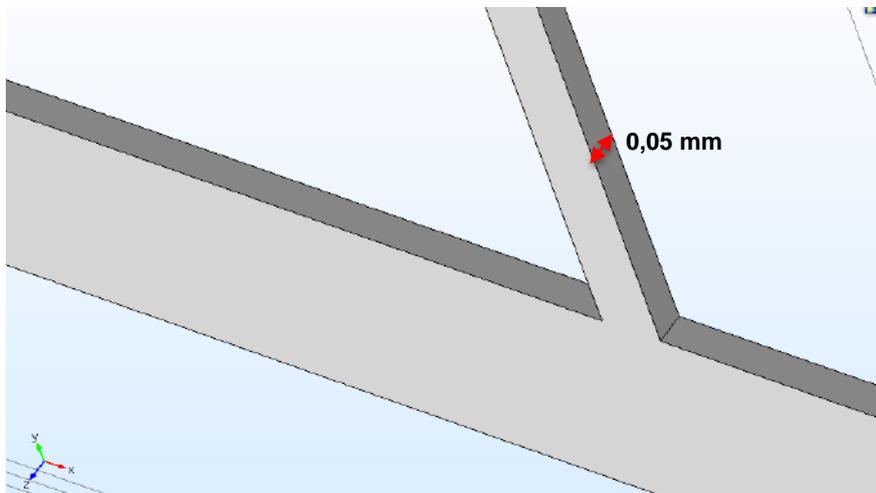


Figura 4.6: Microseparador “extrudado” para 0,05 mm de altura.

Esta Figura 4.6 apresenta o ângulo de 90° entre os canais bifurcados, porém o estudo entre os ângulos entre as bifurcações também foram realizados. Para uma verificação de quanto o ângulo entre as bifurcações pode influenciar na eficiência de separação, foram simulados diferentes ângulos, verificando suas velocidades e variação

de pressão. Os ângulos estudados foram: 5°, 10° a 40°, 45°, 50° a 90°, como mostrado na Figura 4.7, respectivamente.

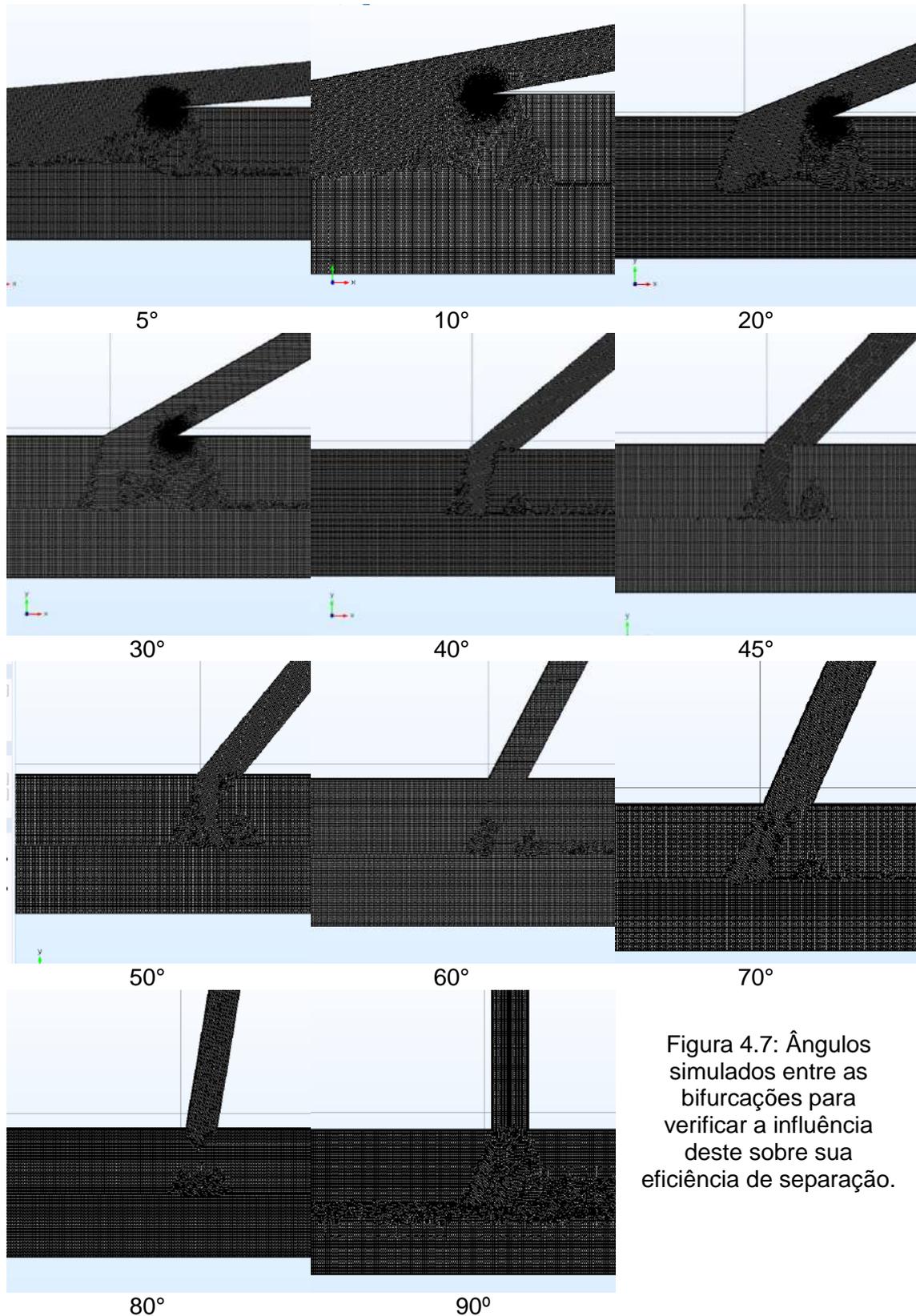


Figura 4.7: Ângulos simulados entre as bifurcações para verificar a influência deste sobre sua eficiência de separação.

Ainda dentro de *Model* pode ser escolhido o material do domínio inserido, que para o presente caso, foi escolhido água, cuja massa específica (ρ) é 1000 kg/m^3 e viscosidade dinâmica (μ) de 10^{-3} Pa.s , e posteriormente também foi realizado estudo com o sangue cujos valores de massa específica (ρ) é 1060 kg/m^3 e viscosidade dinâmica (μ) de $0,04 \text{ Pa.s}$. Escolhe-se também as hipóteses que serão adotadas sobre o fluido e o escoamento (Figura 4.8 – destacado em vermelho) e onde será sua entrada (Figura 4.8 – destacado em azul) e saídas (Figura 4.8 – destacado em verde), na opção *Laminar Flow* (Figura 4.8 – destacado em preto). Para o presente estudo, foi escolhido o regime estacionário, incompressível, não-turbulento e como variáveis dependentes: velocidade e pressão. Onde a velocidade média na entrada do canal de entrada foi de $0,125 \text{ m/s}$, valor usado como base o valor da vazão inicial fixado em $0,150 \text{ mL/min}$ (Tripathi, Siddhartha, et al., 2013), com as geometrias do microseparador projetado no AutoCad.

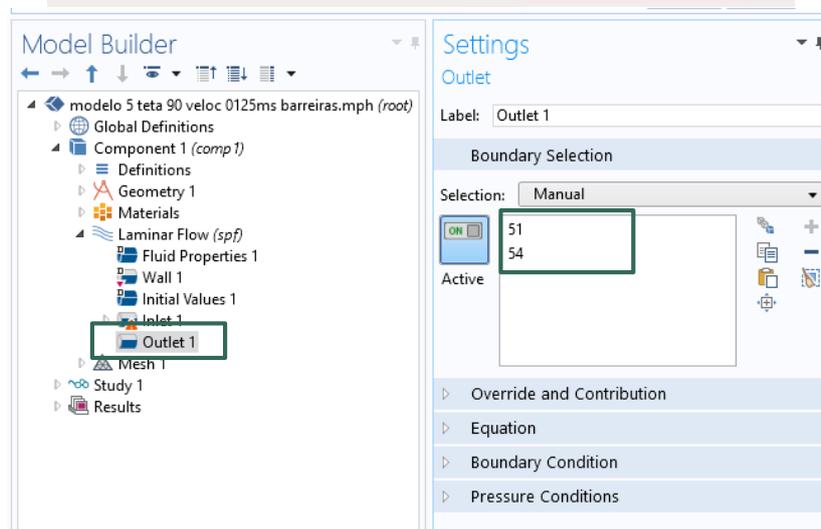
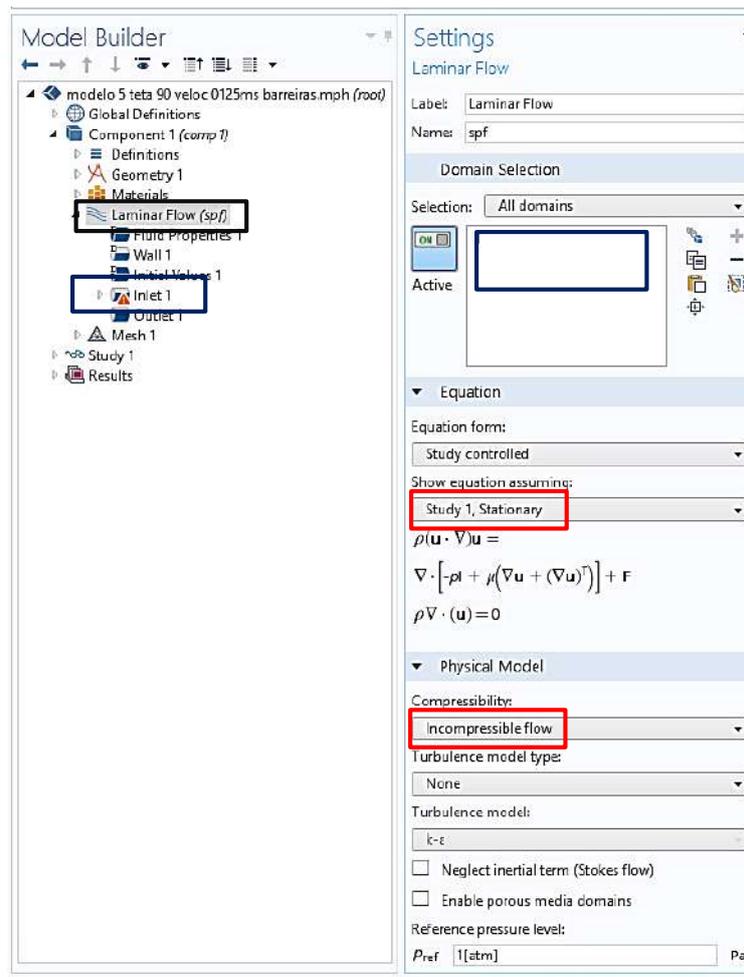


Figura 4.8: Comando *Laminar Flow*, onde pode-se escolher a posição da entrada do fluido e hipóteses de escoamento.

Depois dessas definições de fluido, entrada e saída no sistema, podemos, na aba malhas (*mesh*), entrar com definições para a malha escolhida (Figura 4.9). Da mais grosseira a mais refinada. O COMSOL fornece uma série de malhas “prontas”

selecionando “malha controlada pela física” nas opções de tipo de sequência. Há ainda a possibilidade de definir os parâmetros de uma malha customizada usando a opção “malha controlada pelo usuário”. Ao escolher a opção de malha customizada, o usuário tem a opção de definir o tamanho máximo de elemento, tamanho mínimo, taxa de crescimento máximo, que é a máxima variação quando o sistema interpola pontos em elementos diferentes, fator de curvatura (fator de distorção de um elemento finito em uma região estreita ou infinitesimal) e resolução de regiões estreitas (capacidade de precisão do elemento em regiões infinitesimais).

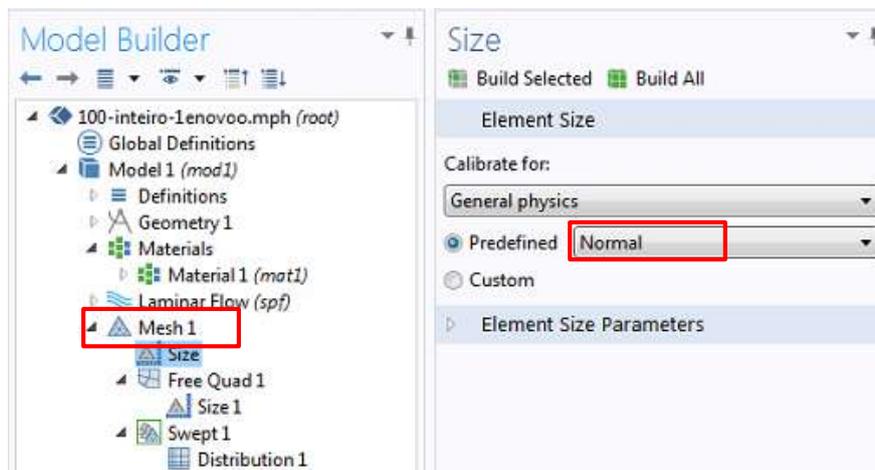


Figura 4.9: Aba *mesh* a qual é possível controlar os parâmetros de malha.

3) Estudo (*Study*) – Nesta seção é definido o tipo de estudo: transiente, estacionário, etc;

4) Resultados (*Results*) – Nesta seção são fornecidos os resultados da simulação numérica, podendo ser analisados através da janela de gráficos. Nesta seção são mostrados o perfil de velocidade, campo de pressão e outros resultados obtidos na simulação. A exportação dos resultados também é feita através desta seção.

4.3 Verificação computacional

Com o uso da ferramenta COMSOL, foram estabelecidos os parâmetros de entrada para simulação computacional (Tabela 4.2) e com isso, a análise de verificação da solução numérica pode ser realizada e podem comparadas em diferentes níveis de refinamento de malhas com o objetivo de avaliar a convergência da solução apresentada.

Tabela 4.2: Propriedades e dados de entrada dos fluidos no sistema para estudo teórico.

	Parâmetros de Entrada
μ da água	10^{-3} Pa.s
μ do sangue	0,04 Pa.s
ρ da água	1000 kg/m^3
ρ do sangue	1060 kg/m^3
$U_{\text{média}}$ na entrada	0,125 m/s
Dimensões do canal de entrada	$400 \mu\text{m} \times 10,0 \text{ mm}$
Dimensões da bif. Maior	$400 \mu\text{m} \times 2,0 \text{ mm}$
Dimensões da bif. Menor	$100 \mu\text{m} \times 20,0 \text{ mm}$
Altura do microseparador	$50 \mu\text{m}$
Temperatura	25°C

O estudo de convergência, para uma análise precisa e refinada, foi realizado variando o tamanho dos elementos da malha, cujos dados de tamanho e número de elementos estão apresentados na Tabela 4.3. Nesta tabela, são apresentados os valores de tamanho máximo dos elementos finitos utilizados, específicos para o tamanho do microcanal. Sendo assim os elementos de malha foram variados entre 0,006 para a malha maior (malha 1) e para a malha com os menores elementos apresentou elementos de tamanho 0,0053 (malha 6).

Tabela 4.3: Número de elementos característicos de cada malha.

Malha	Tamanho do maior elemento	Núm. de elementos de domínio	Núm. de elementos de fronteira	Núm. de elementos de borda
1	0,006	26651409	1126964	21746
2	0,0058	29481388	1177722	22492
3	0,0056	32797325	1275846	23292
4	0,0054	33312053	1391644	24162
5	0,00535	35165928	1400000	24386
6	0,0053	36889819	1408956	24614

A taxa de crescimento é o fator máximo que um elemento pode crescer de uma região com pequenos elementos para uma região com elementos maiores. Este valor deve ser maior ou igual a 1 por exemplo, se a taxa de crescimento máxima é de 1.5, então o elemento pode crescer até 50% a mais do seu tamanho original quando ocorre a transição de uma região para a outra, o qual foi atendido nesse estudo. Para determinar o tamanho dos elementos de uma borda, comparando-os com a curvatura geométrica da borda (é a razão entre o tamanho do elemento e o raio de curvatura). Quanto menor for o fator de curvatura, mais fina é a malha nas zonas curvas da geometria. A resolução de regiões estreitas é um número escalar que é usado para controlar a quantidade de camadas de elementos que se sobrepõem em regiões estreitas (cantos vivos por exemplo).

Na convergência da malha, elementos de domínio são os elementos finitos contidos no domínio da geometria do problema proposto. Elementos de fronteira são os elementos que fazem fronteira com elementos de tamanhos diferentes (aqui, se classificam os fatores de crescimento) e elementos de borda são os elementos que ocupam as bordas ou limites do dispositivo. Os parâmetros variados de uma malha para a outra foram os que fariam com a malha ficasse cada vez mais refinada. De acordo com o número de elementos das malhas podemos classificá-las em mais refinadas (menores fatores de curvatura) ou menos refinadas (maiores fatores de curvatura). Se para o mesmo dispositivo (mesmo tamanho) temos mais elementos finitos, pode-se concluir que a malha é mais refinada em relação à anterior. Sendo assim, a classificação

das malhas pelos números (1 a 6) representa um refinamento gradual das malhas à medida que se aumenta o número de elementos, e estas diferentes malhas são apresentadas na Figura 4.10, respectivamente.

Para realizar o estudo da malha, foi utilizado o programa COMSOL, o qual estava instalado num computador com 2 processadores Intel (R) Xeon (R), CPU E5-2620 v2, 2.10 GHz, com memória Ram de 128,0 GB e HD de 1TB.

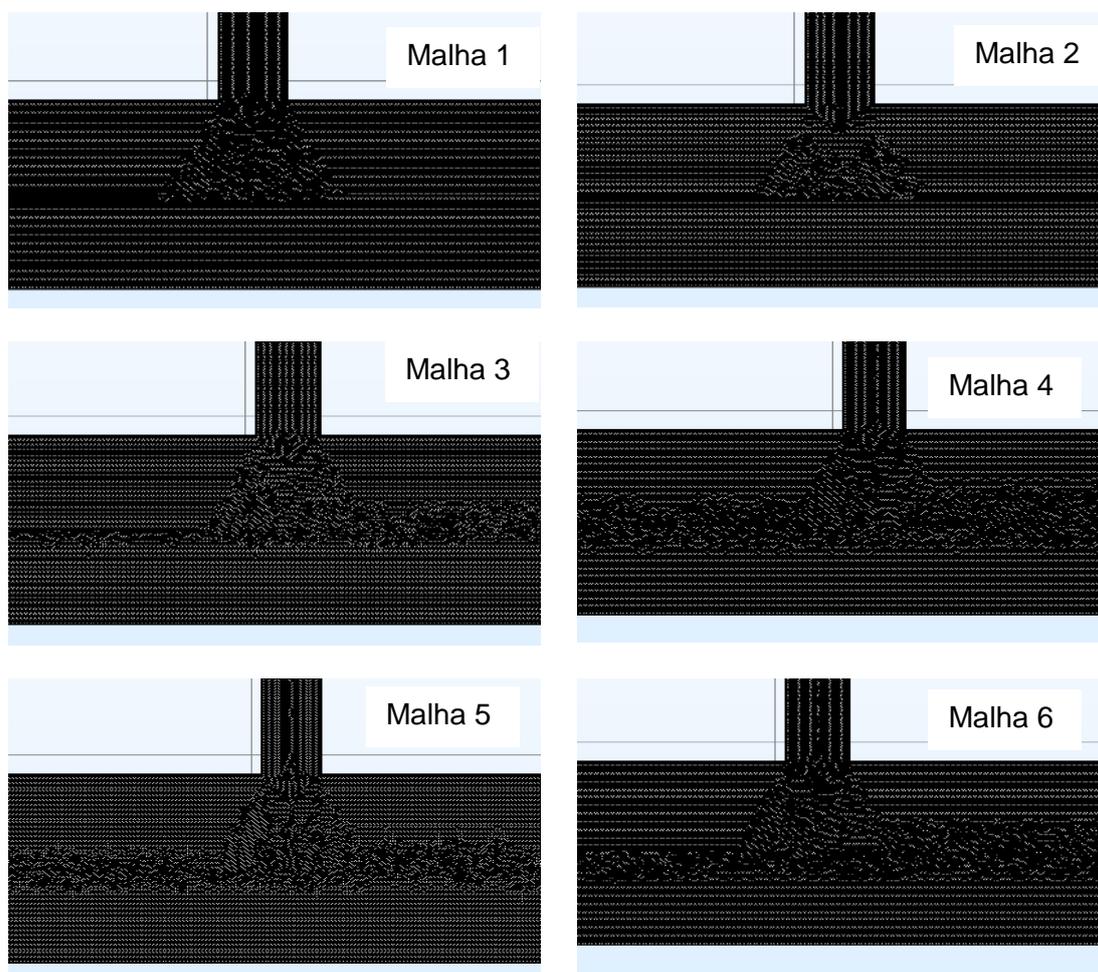


Figura 4.10: Comparativo entre as malhas estudadas com os valores de geometria projetados no início do estudo. Percebe-se que o padrão de formação muda na região de bifurcação, havendo mudança significativa entre as malhas 1 e 6.

A Figura 4.11 ilustra um típico resultado das simulações realizadas no COMSOL, neste caso são plotados o campo de pressão onde a cor mais vermelha representa a pressão de entrada e a cor mais azul representa a pressão igual a zero imposta na aba

Laminar Flow, aba das saídas. Esse resultado apresentado na Figura 4.11 foi obtido com a malha 5, a qual apresentada o tamanho maximo do elemento 0,00535.

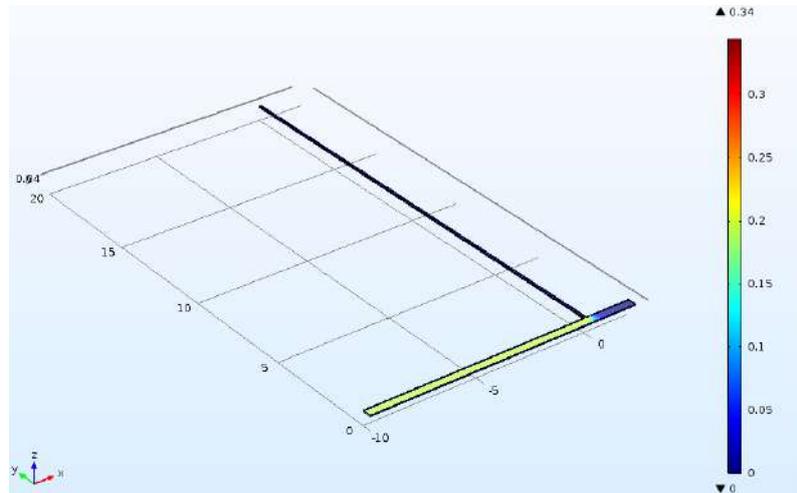


Figura 4.11: Desenho esquemático usado para a verificação da distribuição de pressão, para as geometrias projetadas inicialmente.

Com o resultado do estudo da malha com os valores de geometria projetados no início do estudo, exportam-se esses valores para o *software* Wolfram Mathematica, para um estudo de convergência de velocidade local do escoamento em alguns pontos escolhidos ao longo do domínio para comparação das malhas apresentadas nas Tabelas 4.3 e 4.4. Neste sentido foi fixado uma altura dentro canal ($z = 0,025$ mm) para os quais variou-se a posição “y” ($0,01$ mm $\leq y \leq -0,4$ mm) no plano de simetria ($-0,01$ mm $\leq x \leq 0,1$ mm), estes pontos estão assinalados na Figura 4.12 a seguir ilustra a posição de análise.

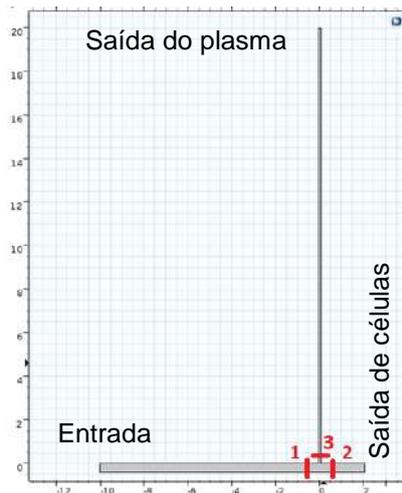


Figura 4.12: Imagens das posições selecionadas para a análise do perfil de velocidades.

A verificação da convergência da malha gerada pelo programa COMSOL, mostram através da análise da malha quanto ao tipo e números de elementos empregados nas simulações e a quantidade de elementos. Pode-se observar nas Figuras 4.13 a 4.15 que as malhas convergem para uma quantidade fixa de elementos, mas com uma variação no seu tamanho. Os casos apresentados na forma gráfica de convergência das malhas geradas podem ser verificadas para as malhas de 4 a 6, mostrando que os resultados independem destas malhas, sendo assim, permitindo por esta análise, o uso da malha com o melhor refinamento, malha de número 6, mas por uma questão de economia de tempo computacional, a malha utilizada no presente estudo será a malha 5, pois não apresentam grandes discrepâncias nos valores de velocidade e pressão nos pontos assinalados na Figura 4.12.

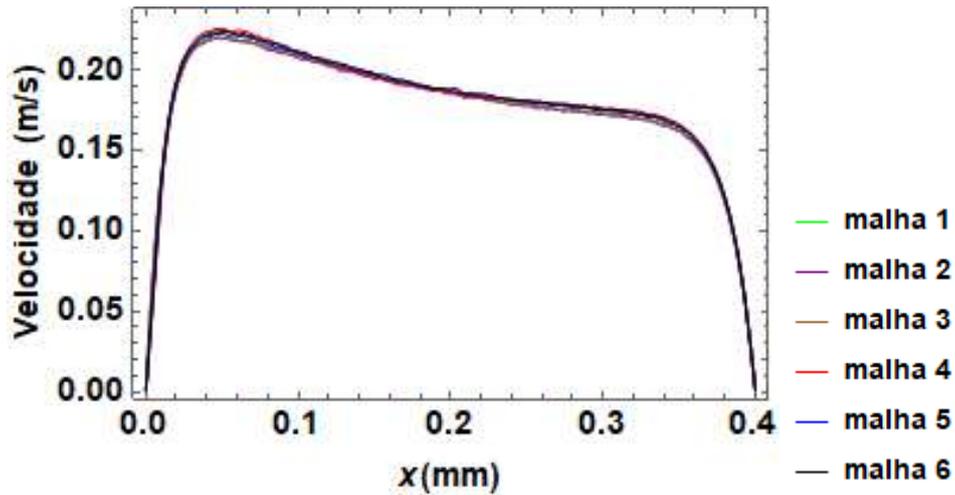


Figura 4.13: Gráfico com o perfil de velocidade apresentando convergência para número de distribuição fixa, medido no ponto 1 apresentado na Figura 4.12.

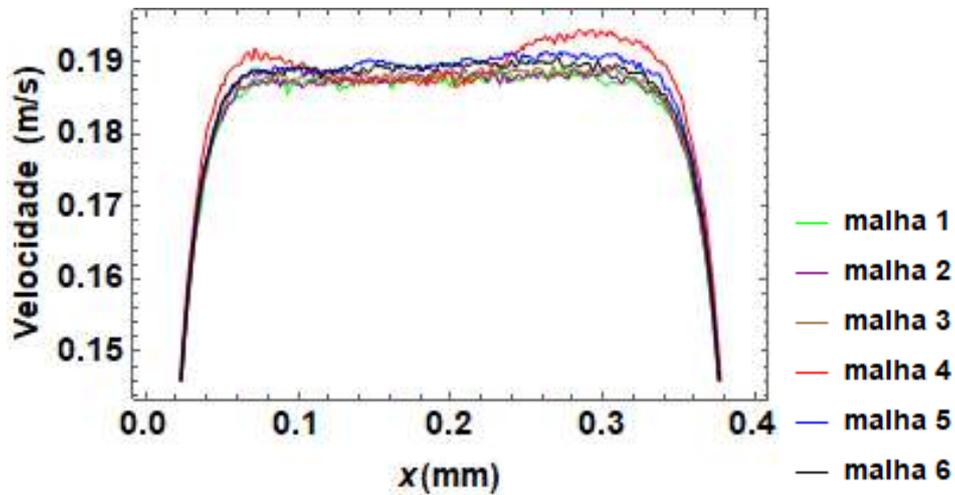


Figura 4.14: Gráfico com o perfil de velocidade apresentando convergência para número de distribuição fixo, medido no ponto 2 apresentado na Figura 4.12.

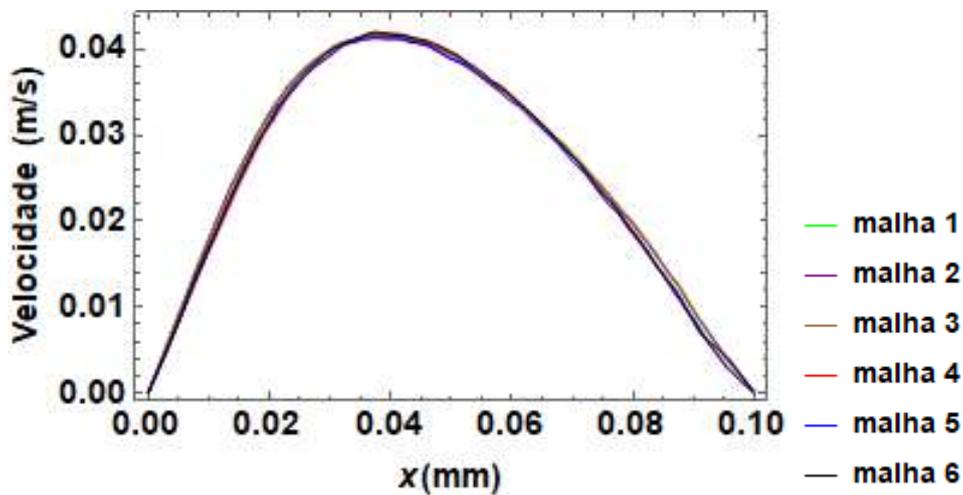


Figura 4.15: Gráfico com o perfil de velocidade apresentando convergência para número de distribuição fixo, medido no ponto 3 apresentado na Figura 4.12.

Na Tabela 4.4 são apresentados os valores das velocidades médias em $z=0,025$ mm, $-0,01 \text{ mm} \leq x \leq 0,1 \text{ mm}$ e $0,01 \text{ mm} \leq y \leq -0,4 \text{ mm}$ e na Tabela 4.5 os valores da pressão nesses mesmos pontos, para as diferentes malhas e pode-se perceber que o valor da velocidade média está convergido em mais ou menos no 3º dígito significativo nos três pontos analisados, confirmando assim que os valores apresentados pela malha de número 5 já se encontra convergida e pode ser usada nas simulações futuras, que aqui serão apresentadas.

Tabela 4.4: Valor da velocidade média [m/s] nos pontos assinalados na Figura 4.12 em $z=0,025$ mm, $-0,01 \text{ mm} \leq x \leq 0,01 \text{ mm}$ e $0,1 \text{ mm} \leq y \leq -0,4 \text{ mm}$, para as diferentes malhas.

Malha	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Re Pto 1	Re Pto 2	Re Pto 3
1	0,176	0,173	0,026	0,41	0,41	0,046
2	0,176	0,173	0,026	0,41	0,41	0,047
3	0,177	0,173	0,026	0,42	0,41	0,047
4	0,179	0,175	0,026	0,42	0,41	0,048
5	0,179	0,176	0,026	0,42	0,41	0,049
6	0,179	0,176	0,026	0,42	0,41	0,048

Tabela 4.5: Valor da pressão [Pa] nos pontos assinalados na Figura 4.12 em $z=0,025$ mm, $-0,01 \text{ mm} \leq x \leq 0,01 \text{ mm}$ e $0,1 \text{ mm} \leq y \leq -0,4 \text{ mm}$, para as diferentes malhas.

Malhas	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
1	1276,4	1175,0	1240,3
2	1277,7	1176,3	1241,7
3	1280,1	1178,4	1244,0
4	1303,0	1197,1	1265,0
5	1300,0	1195,6	1262,5
6	1299,8	1195,4	1261,8

A Figura 4.16 mostra o erro relativo entre as malhas menos refinadas (malhas 1 a 5) com a malha mais refinada (malha 6). A análise foi feita para o ponto bem próximo a bifurcação, ponto 1 ilustrado na Figura 4.12 onde $(-0,01) \text{ mm} \leq x \leq 0,1 \text{ mm}$ e $0,01 \text{ mm} \leq y \leq -0,4 \text{ mm}$ e $z=0,025 \text{ mm}$. A equação do erro relativo para os valores de velocidade é apresentada a seguir:

$$\varepsilon_{relativo} = \left| \frac{u_i - u_6}{u_6} \right| \quad (4.6)$$

onde, u_i (m/s) velocidade média relaciona as i -ésima malha e v_6 (m/s) é a velocidade no ponto 1 (Figura 4.12) na malha 6, que é tomada como padrão. Os pontos apresentados na Figura 4.16 referem-se às malhas 1 a 5, respectivamente, classificadas de acordo com o número de elementos de domínio da malha. As menos refinadas apresentam erros relativos maiores em relação a malha mais refinada (malha 6). Nota-se um baixo erro relativo entre a malha 5 e a malha 6, o qual já poderia ser visto de uma forma gráfica na Figura 4.16, afirmando que a malha 5 pode ser utilizada no presente estudo sem apresentar valores com grande discrepância dos valores reais.

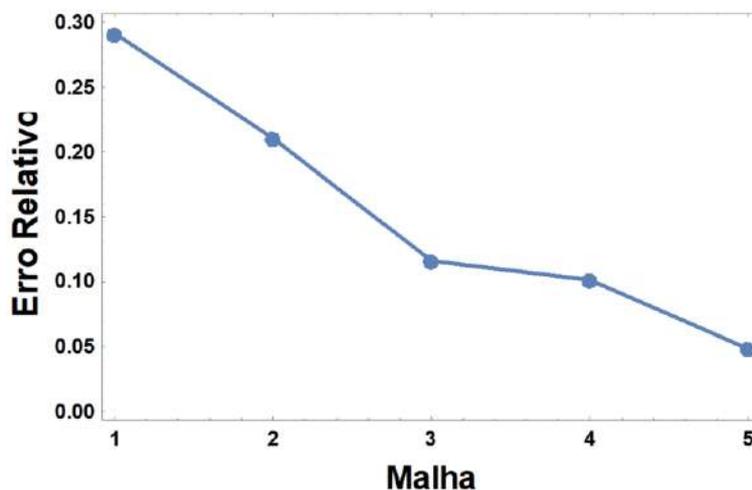


Figura 4.16: Gráfico do erro relativo entre malhas 1 a 5 com a malha 6.

O tempo de simulação computacional entre a malha 5 e a malha 6 se diferenciam por 90 minutos, sendo assim, não há grande prejuízo em usar a malha 5 no presente estudo, pois o tempo computacional é um fator importante e a diferença entre as malhas não apresentaram discrepância entre os valores de velocidade e pressão, como já apontados anteriormente. O tempo de que o programa levou para gerar cada malha, está apresentado na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Tempo computacional para a geração das malhas.

Malha	Tamanho do maior elemento da malha	Núm. de elementos do domínio	Tempo computacional (min)
1	0,006	26651409	60
2	0,0058	29481388	92
3	0,0056	32797325	104
4	0,0054	33312053	125
5	0,00535	35165928	161
6	0,0053	36889819	252

Após convergir os valores de velocidade e pressão, vem a etapa do comando *study* 1, onde definiu-se o estudo como sendo estacionário, laminar, incompressível e condições de não-deslizamento, a densidade e viscosidade do fluido. Para processar o comando *study* 1, a ferramenta computacional COMSOL, necessita de um novo processamento, assim exigindo um novo tempo computacional, que está apresentado na Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Tempo computacional para realização do comando *study* 1.

Malha	Tempo computacional para a malha (min)	Tempo computacional para o <i>study</i> 1 (horas)	Tempo computacional (malha+ <i>study</i> 1) (horas)
1	60	18	19
2	92	22	24
3	104	25	27
4	125	30	32
5	161	35	38

Quando o comando *study* 1, o qual faz o estudo do fluido em regime estacionário, termina seu processo, obtém-se o valor médio e perfil de velocidade, valor da pressão através de pontos escolhidos no modelo projetado (Figura 4.12).

Tendo o conhecimento que o plasma a parte líquida do sangue, é possível realizar o fracionamento com base em tamanho das partículas, isto é, plasma separadas de glóbulos vermelhos. Para realizar o estudo teórico aplicando partículas é introduzido um novo comando o qual fará o estudo do fluido juntamente com as partículas. Este comando se chama *Particle tracing for fluid flow* (Figura 4.17 – destacado em vermelho),

no qual se especifica as propriedades das partículas, canal de entrada e canais de saídas, as características (massa, densidade e diâmetros) e quantidade das partículas. Após inserir esses dados na ferramenta computacional COMSOL, para obter os resultados da simulação, é necessário inserir um novo *study*, *study 2* (Figura 4.17 – destacado em verde), o qual levará em consideração o fator tempo de escoamento do fluido e irá calcular as trajetórias das partículas.

O tempo computacional do *study 2* é de aproximadamente um quarto da simulação levando em consideração somente o escoamento do fluido (*study 1*), o qual aumenta o tempo computacional apresentado na Tabela 4.7, onde a Tabela 4.8 apresenta o tempo total necessário para finalizar todo o estudo teórico.

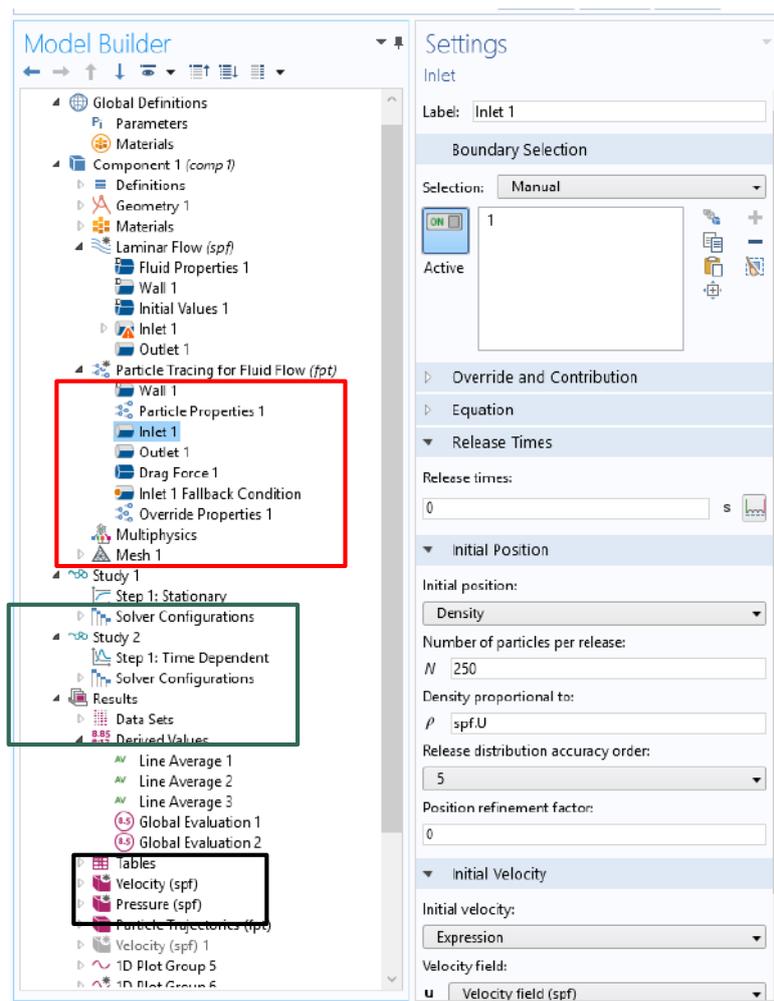


Figura 4.17: Comando *Particle tracing for fluid flow* e *studys 1 e 2*.

Tabela 4.8: Tempo computacional para realização estudo teórico completo.

Malha	Tempo computacional <i>study 1</i> (horas)	Tempo computacional <i>study 2</i> (horas)	Tempo computacional (malha+<i>study 1</i>+<i>study 2</i>) (horas)
1	18	4,5	23,5
2	22	5,5	29,5
3	25	6	33
4	30	8	40
5	35	9	46

Com a finalização do *study 2*, pode-se encontrar a quantidade de partícula em cada uma das saídas (Figura 4.17 – destacado em preto) e assim calcular a eficiência de separação do dispositivo simulado através da Equação 3.22.

5. FABRICAÇÃO DOS MICROSSEPARADORES

Neste capítulo será apresentado a técnica de fabricação dos microcanais em material polimérico através de um processo de moldagem. Os moldes são confeccionados em PMMA com o uso de uma microfresa-CNC e os microseparadores são moldados em Uretana Acrilato e PDMS.

O uso da microfresa pode facilitar ou permitir a fabricação de canais com alturas variáveis, sem acrescentar mais etapas ou dificuldade adicional ao processo de fabricação, quando comparado ao processo fotolitográfico tradicional. Os microdispositivos apresentados no presente trabalho não fez uso desse recurso, porém essa possibilidade pode ser explorada.

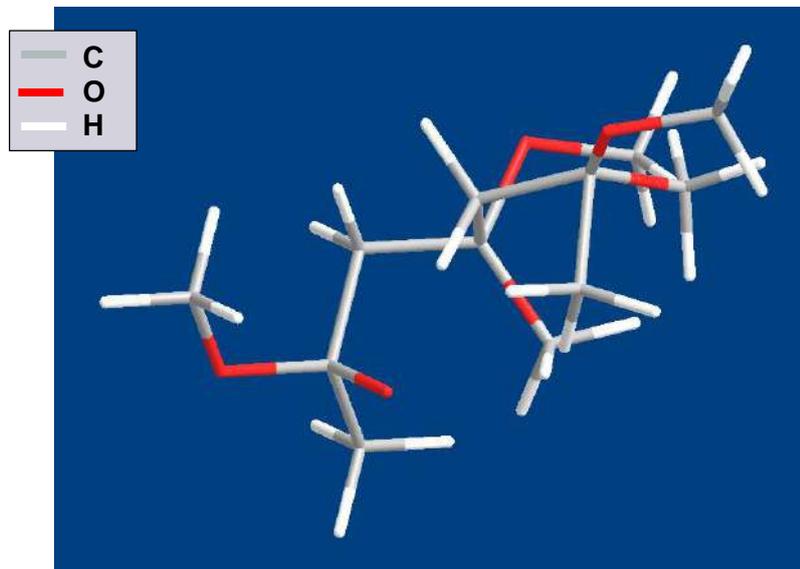
A técnica de moldagem e selagem apresentada na fabricação do dispositivo em PDMS, se faz de grande utilidade e versatilidade pois não necessita de sala limpa e isso consequentemente gera um menor custo.

5.1 Molde em polimetilmetacrilato (PMMA)

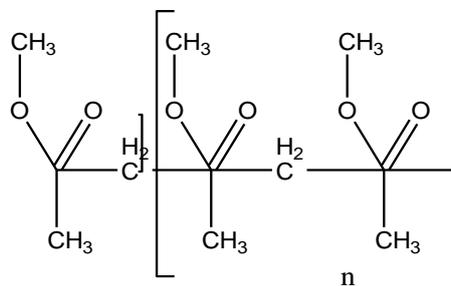
5.1.1 Fabricação do molde em PMMA

No processo de fabricação dos microseparadores foi adotada uma abordagem similar ao processo tradicional de microfabricação chamado na literatura de Litografia Macia. Este processo baseia-se na moldagem de um canal polimérico de polidimetilsiloxano (PDMS) em um molde de silício e SU-8 que por sua vez é fabricado via processo fotolitográfico tradicional. Todavia no presente estudo o processo de Litografia Macia foi readaptado visando uma microfabricação mais rápida e de baixo custo quando comparada ao processo tradicional.

No processo de microfabricação que será aqui apresentado em detalhes, foi feito o uso de molde microusinado em uma placa de acrílico (polimetilmetacrilato-PMMA), Figura 5.1ab, através de um processo de microfresamento e a etapa seguinte de moldagem foram utilizados 2 diferentes polímeros: Uretana-Acrilato (UA) comprada em lojas de material para a confecção de carimbos cujo fabricante é PolyStamp, o mesmo material usado na confecção de carimbos comerciais, e o outro foi o polímero tradicional polidimetilsiloxano (PDMS) cujo fabricante é a Dow Chemical Company. Posteriormente a confecção dos microseparadores fabricados com ambos os polímeros, foi realizada uma comparação entre as geometrias e o escoamento do fluido.



(a)



(b)

Figura 5.1: Estrutura química do polimetilmetacrilato (PMMA), (a) espacial e (b) plana.

Uma das vantagens do uso da Uretana-Acrilato como substrato dos microseparadores também reside na maior facilidade de aquisição e custo de selagem dos microdispositivos, uma vez que estes polímeros expostos a luz ultravioleta permitem ligações intermoleculares, dispensando a etapa de preparação e ativação da superfície em sistemas de plasma de oxigênio, tradicionalmente usadas na selagem de canais de PDMS e vidro, por exemplo.

Posteriormente, com as geometrias dos microseparadores já definidas, o procedimento de microfabricação é iniciado pela elaboração do desenho técnico dos moldes a serem fabricados na microfresa-CNC. Fazendo uso do software gráfico AutoCAD 2013 (AutoDesk®) foi projetado os desenhos dos microdispositivos a serem fabricados, como é apresentado na Figura 5.2.

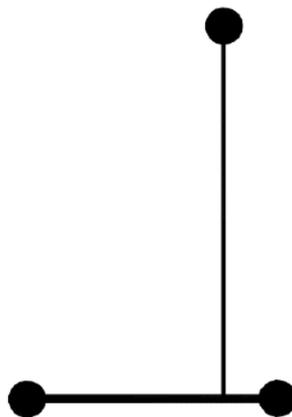


Figura 5.2: Vista superior do microseparador que foram fabricado em PMMA utilizando a microfresadora CNC-*Minitech Machinery*.

Na Figura 5.2, com o intuito de verificar a Lei da Bifurcação, temos um microsistema com diferentes dimensões internas dos canais de saída, dentro de uma placa de PMMA que possui uma espessura de 5 mm e aproximadamente em um quadrado de 5 cm de lado. Este microdispositivo é composto de um canal de entrada de 400 μm de largura e dois canais de saída, um de 400 μm e o outro de 100 μm , detalhe das suas dimensões na Figura 5.3, com escala em mm.

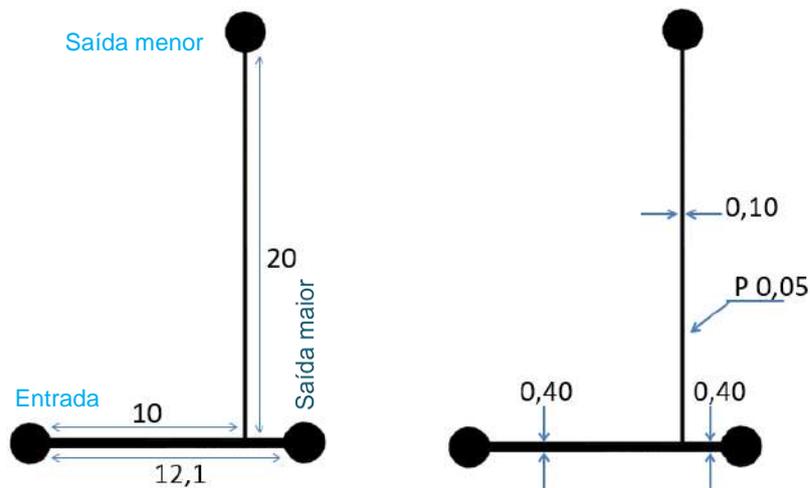


Figura 5.3: Detalhes das dimensões do microdispositivo com profundidade de 0,05, escala em mm, relacionado com a Figura 5.2.

Em seguida, o desenho técnico pode ser transformado em código numérico pela microfresadora com o auxílio do *software* “MecSoft VisualCad 2012”. A microfresadora de controle numérico computadorizado (CNC) da empresa “*Minitech Machinery*” disponível no LabMEMS, e que foi utilizada no presente estudo é apresentada na Figura 5.4ab. Esta microfresadora trabalha com três eixos motorizados x, y e z e possui uma castanha acoplada a um motor de passo permitindo a utilização de um 4º. eixo. As ferramentas, microfresas de topo, utilizadas são de carboneto de tungstênio da empresa PMT (*Performance Micro Tool*), que apresenta uma gama de dimensões de fresas na faixa de 5-400 μm de diâmetro.



(a)



(b)

Figura 5.4: (a) Bancada de microfresamento CNC - *Minitech Machinery* e (b) detalhe da microfresadora.

Para acelerar o processo de fabricação, três diferentes fresas foram utilizadas, cada uma em uma etapa. O início da fabricação, primeira etapa, consiste em fazer um rebaixamento na placa de acrílico, utilizando a fresa de 3000 μm de diâmetro (Figura 5.5a, topo e Figura 5.5b, perfil), com velocidade de corte de 84 m/min, rotação de 9000 rpm e foram adotados 5 passos de meio milímetro no seu procedimento de fresamento, o qual resultou num “buraco” de 2,5 mm com área aproximada de 2000 mm, deixando uma borda de aproximadamente 3 mm. Em seguida, segunda etapa, um primeiro

refinamento foi realizado, usando uma fresa de 500 μm de diâmetro (Figura 5.6a, topo e Figura 5.6b, perfil), com velocidade de corte de 42 m/min, com rotação de 27000 rpm e foi feito 1 passo de 50 μm . Por último, terceira etapa, foi utilizada uma fresa de 50 μm de diâmetro (Figura 5.7a, topo e Figura 5.7b, perfil) com velocidade de corte de 8 m/min, rotação de 50000 rpm e foi feito mais 1 passo de 50 μm . Essas etapas estão ilustradas na Figura 5.8.

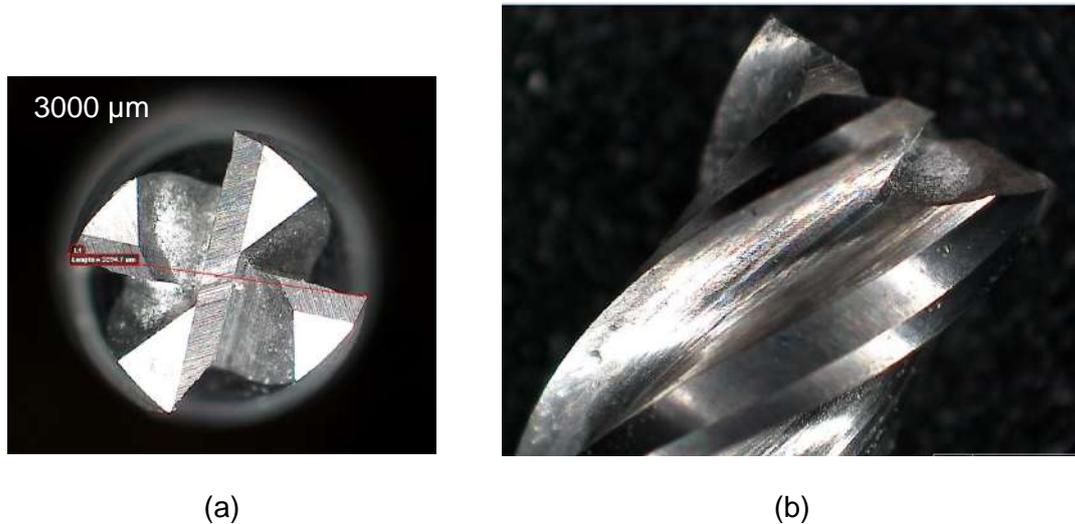


Figura 5.5: Fresa de 3000 μm de diâmetro usada para o rebaixamento, (a) vista do topo e (b) vista de perfil.

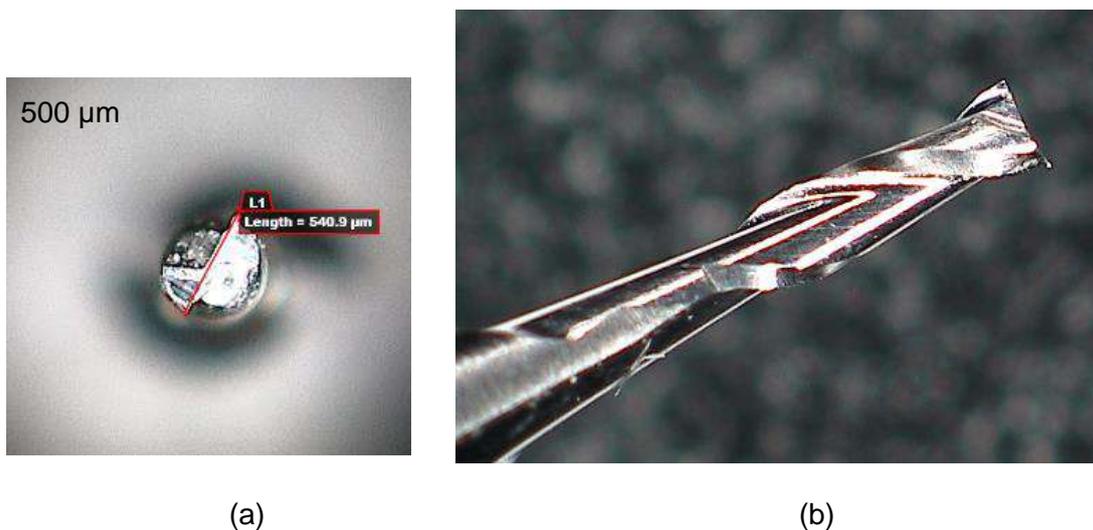
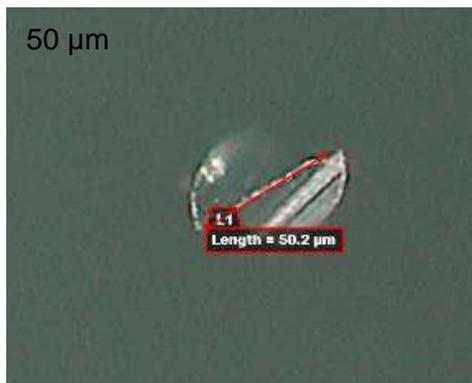
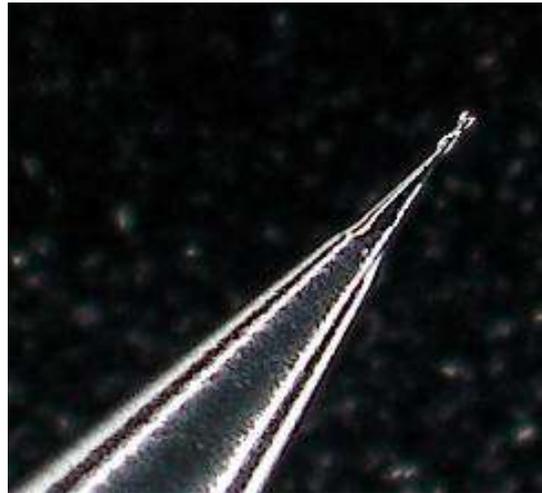


Figura 5.6: Fresa de 500 μm de diâmetro usada para o um primeiro refinamento dos microcanais, (a) vista do topo e (b) vista de perfil.

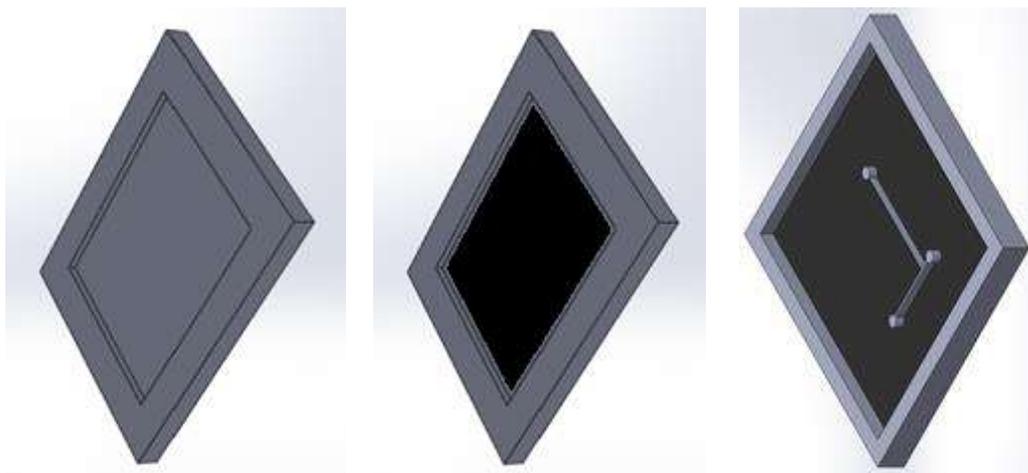


(a)



(b)

Figura 5.7: Fresa de 50 μm de diâmetro usada para o refinamento dos contornos dos microcanais, (a) vista de topo e (b) vista de perfil.



1º etapa - Rebaixamento

2º etapa - Refinamento

3º etapa - Microcanal

Figura 5.8: Etapas do processo de fabricação do molde em PMMA utilizando as fresas apresentadas na Tabela 5.1.

Na Figura 5.9 mostra o detalhe da microfabricação do molde em acrílico sendo realizado na microfresadora de controle numérico computadorizado (CNC) da empresa “*Minitech Machinery*”, utilizando as microfresas mostradas nas Figuras 5.5, 5.6 e 5.7.



Figura 5.9: Detalhe da fabricação do molde em PMMA na microfresadora de controle numérico computadorizado (CNC) da empresa “*Minitech Machinery*”.

A Tabela 5.1 apresenta um resumo das ferramentas usadas as quais foram apresentadas nas Figuras 5.5ab, 5.6ab e 5.7ab, com seus diâmetros, velocidade de corte e rotação.

Tabela 5.1: Características das microfresas usadas para a microusinagem do molde em PMMA para moldagem de microcanais em fotolitografia.

	Microfresa usada (diâmetro em μm)	Velocidade de corte (m/min)	Passos	Rotação (rpm)
Rebaixamento	3000	84	5	9000
Refinamento	500	42	1	27000
Profundidade	50	8	1	50000

A Figura 5.10 ilustra a interface gráfica do software “MecSoft VisualCad 2012”. Nesta figura podem ser vistas linhas de diferentes cores, que detalham o caminho que a ferramenta percorreu, este caminho é consequência da escolha de alguns parâmetros de fabricação como por exemplo: fresa, velocidade de corte, rotação e passo.

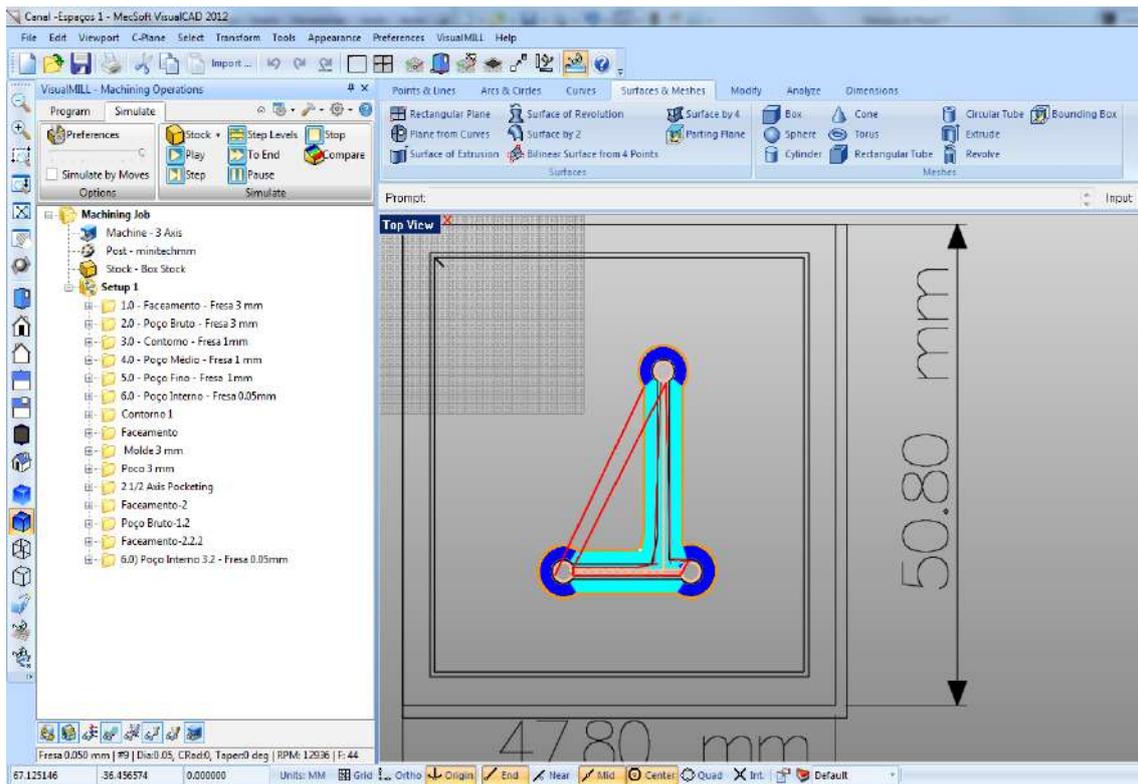


Figura 5.10: Interface gráfica do software “MecSoft VisualCad 2012”.

Depois da conversão do modelo produzido em um controle numérico, inicia-se a confecção do molde em polimetilmetacrilato (PMMA) na microfresa, um desenho esquemático de como ficou o molde é apresentado na Figura 5.11. Após a fabricação do molde pela microfresa, o mesmo está pronto para receber os polímeros, que passará pelo processo de exposição à luz ultravioleta com conseqüente polimerização (FERNANDES J. C. B. e FERREIRA L. O. S, 2006) e polimerização por aquecimento.

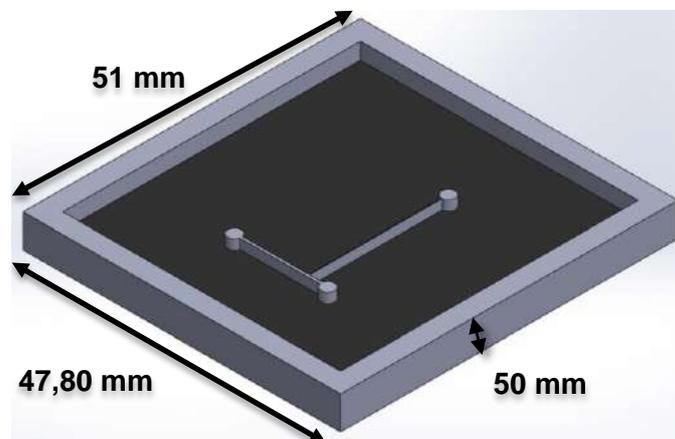


Figura 5.11: Desenho esquemático do molde fabricado em PMMA.

Um detalhe importante que cabe destacar na fabricação do molde em acrílico e está assinalado na Figura 5.12, é a distância do canal até a borda do molde. Como o mesmo molde será utilizado na fabricação com os ambos polímeros (UA e PDMS) a distância deve apresentar um mínimo de 5 mm, pois isso facilitará na selagem e garantirá uma área maior de contato entre a tampa e base.

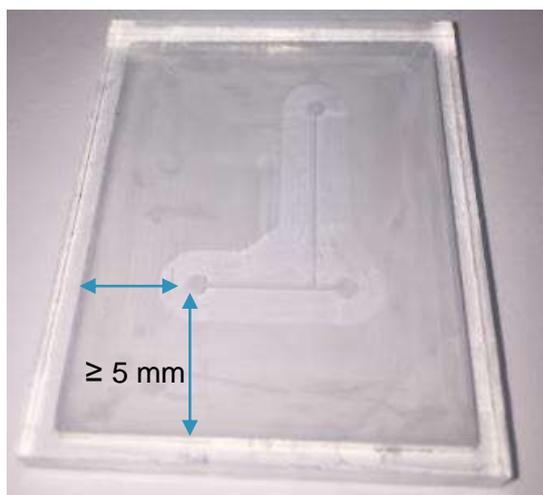


Figura 5.12: Molde em PMMA confeccionado pela microfresa.

5.1.2 Caracterização do molde fabricado em PMMA

Os microcanais fabricados em uma placa de acrílico (polimetilmetacrilato - PMMA), usinados via microfresa (Figura 5.12), foram analisados com a ajuda de um microscópio 3D digital *Hirox Digital Microscope* modelo *KH.8700* (Figura 5.13). Foram tomadas medidas de profundidade e largura dos canais para várias posições do microdispositivo, como assinalados na Figura 5.14 e nessas posições foram realizadas de 3 a 5 repetições de altura, profundidade e largura.



Figura 5.13: Microscópio digital *Hirox Digital Microscope* modelo *KH.8700* efetuando a caracterização do microseparador.

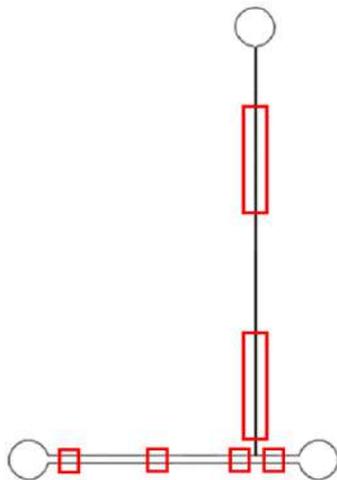


Figura 5.14: Posição de onde foram realizadas as medidas de altura, largura e profundidade, de 3 a 5 medidas em cada ponto.

O molde em PMMA que foi utilizado para a fabricação dos microdispositivos em Uretana-Acrilato (UA) e polidimetilsiloxano (PDMS). A Figura 5.15 apresenta o molde depois da usinagem, onde a entrada possui 400 μm , a bifurcação maior tem dimensão de 400 μm e a bifurcação menor tem 100 μm (Tabela 5.2).

Tabela 5.2: Dimensões dos canais dos microseparadores com 50 μm de altura, apresentando largura e comprimento, apresentado na Figura 4.12.

Canal Principal	Bifurcação maior	Bifurcação menor
400 μm x 10,0 mm	400 μm x 2,0 mm	100 μm x 20,0 mm

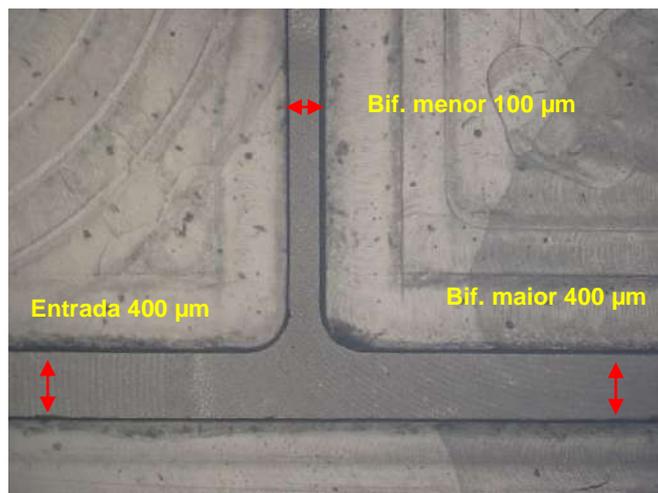


Figura 5.15: Visualização do molde em PMMA para a fabricação do microseparador em UA, com altura de 50 μm como projetado e apresentado na Tabela 5.2.

As Figuras 5.16, 5.17 e 5.18 apresentam um exemplo das medidas realizadas no molde microusinado em PMMA na entrada próximo a região da bifurcação, na bifurcação maior e na bifurcação menor, respectivamente. Este molde foi utilizado para a fabricação dos microseparadores em Uretana-Acrilato (UA) e PDMS, cujas dimensões de largura são: entrada 400 μm , bifurcação maior 400 μm e bifurcação menor 100 μm , com altura padrão de 50 μm .

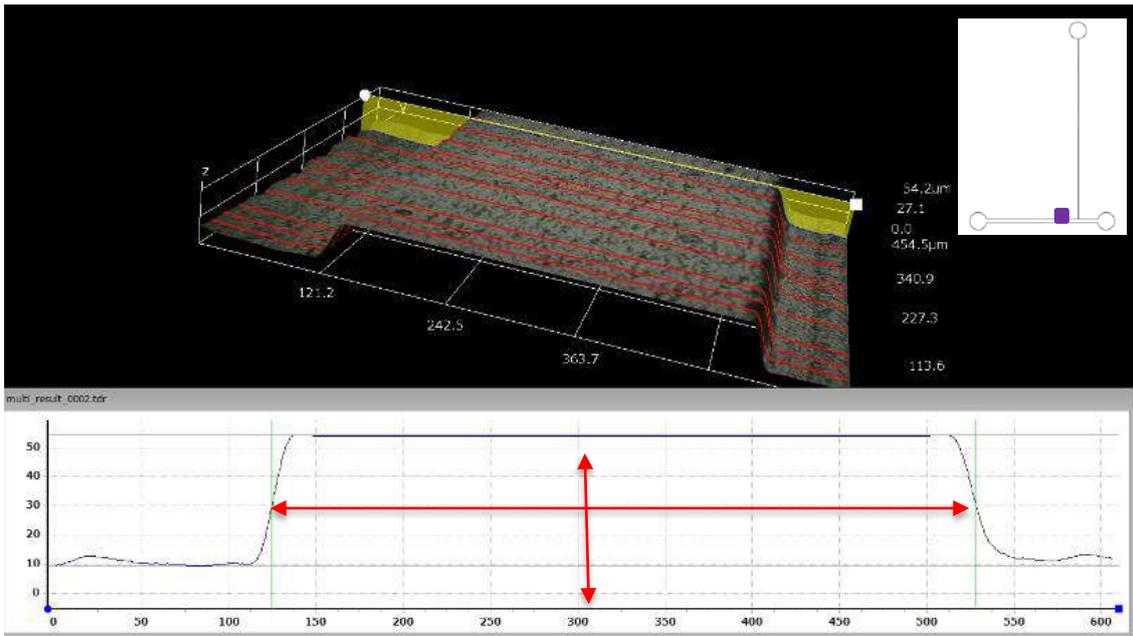


Figura 5.16: Medidas de largura (seta da horizontal) e profundidade (seta da vertical) no microcanal de entrada próximo a região de bifurcação no molde em PMMA fabricado pela microfresa.

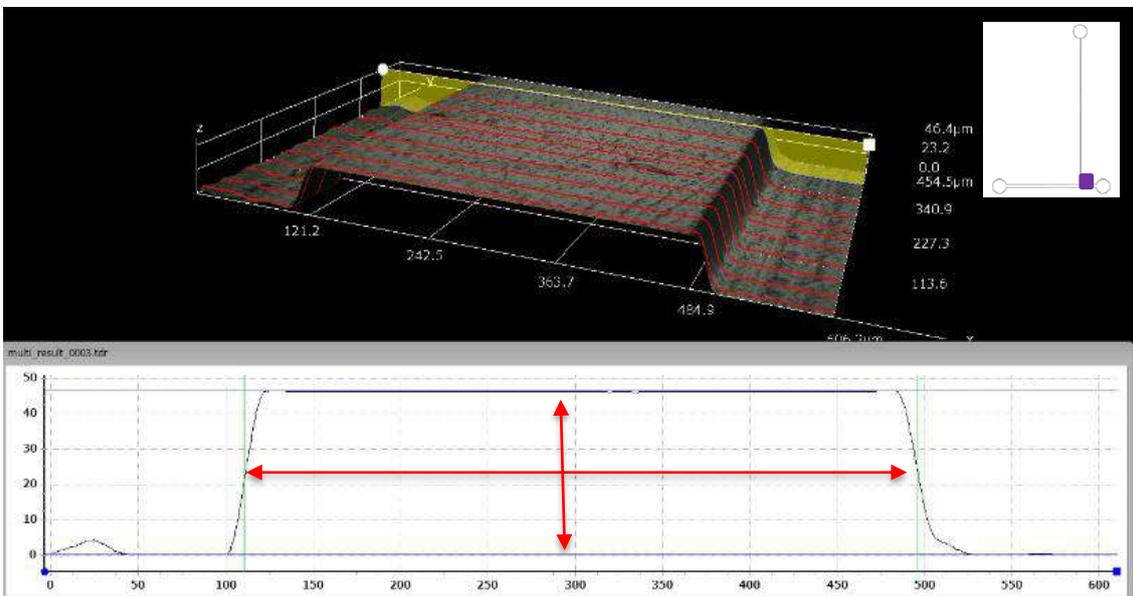


Figura 5.17: Medidas de largura (seta da horizontal) e profundidade (seta da vertical) no microcanal da bif. maior próximo a região de bifurcação no molde em PMMA fabricado pela microfresa.

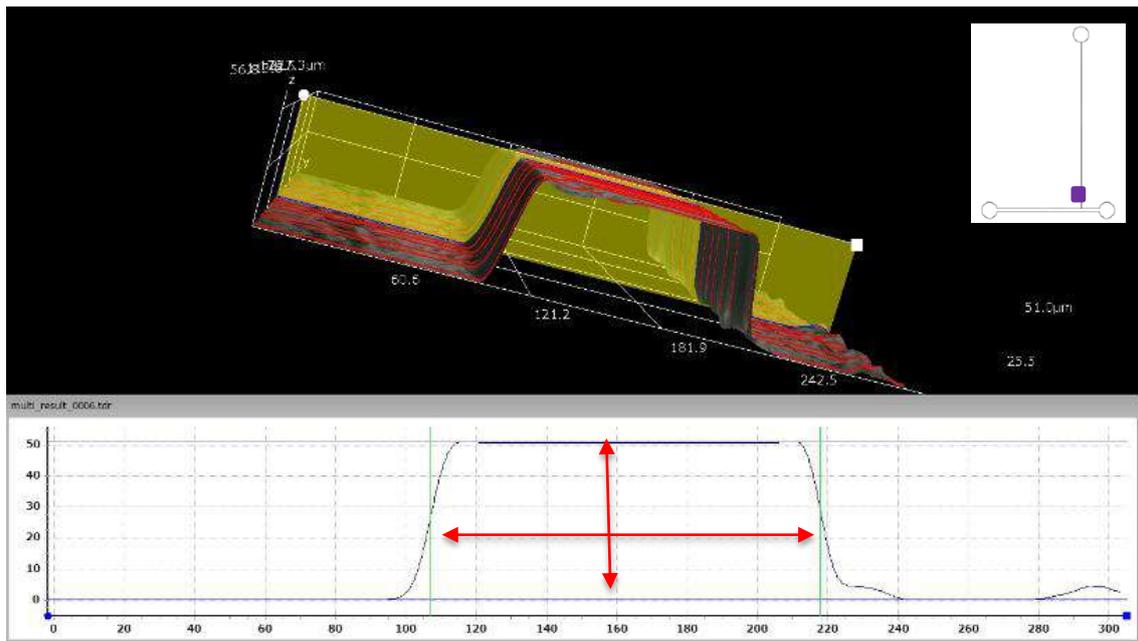


Figura 5.18: Medidas de largura (seta da horizontal) e profundidade (seta da vertical) no microcanal da bif. menor próximo a região de bifurcação no molde em PMMA fabricado pela microfresa.

O fluxograma apresentado na Figura 5.19 abaixo, apresenta as etapas de seguidas para a fabricação do molde em acrílico (PMMA) para a confecção dos microcanais em uretana-acrilato e PDMS.

Etapas de microfabricação do molde em PMMA por microusinagem

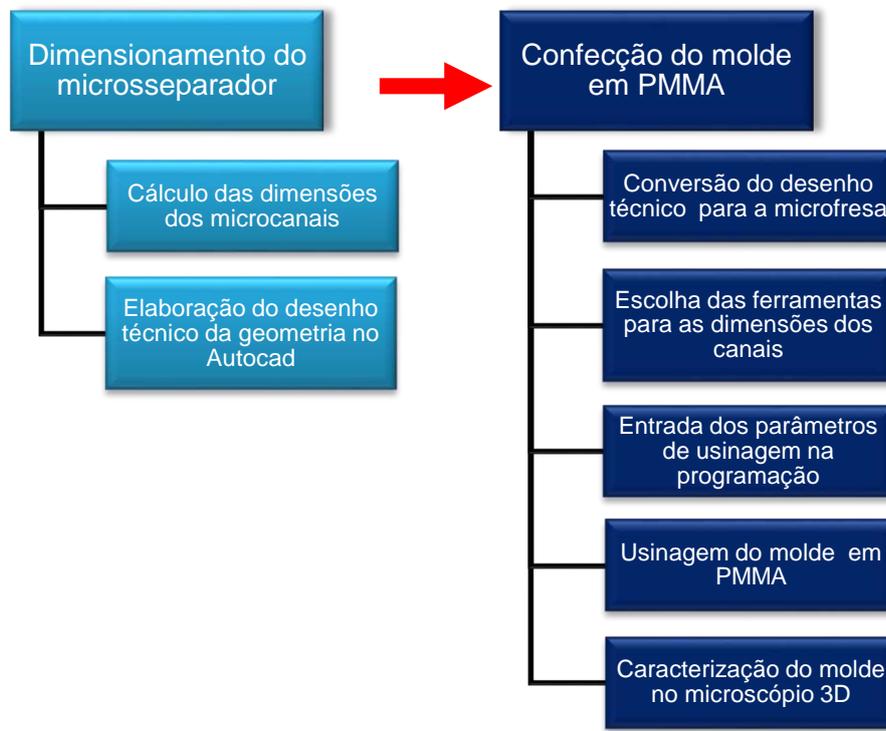


Figura 5.19: Fluxograma de fabricação do molde em PMMA para confecção de microdispositivos.

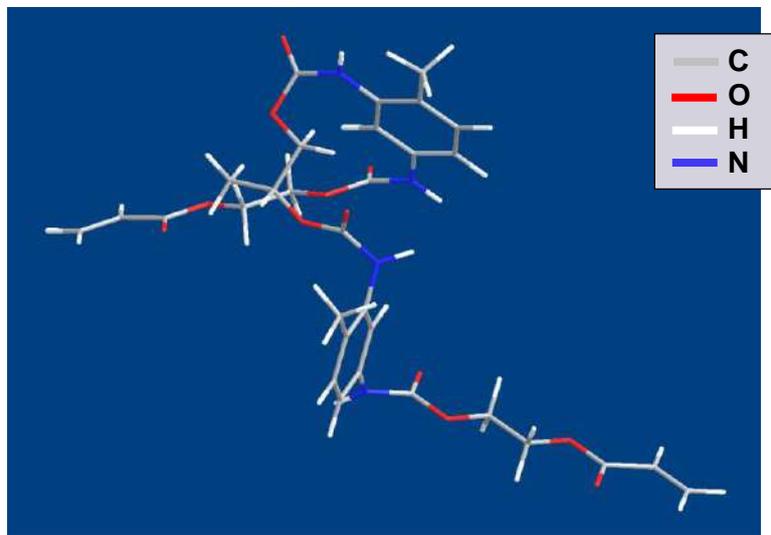
5.2 Microdispositivos em Uretana-Acrilato (UA)

5.2.1 Fabricação em UA

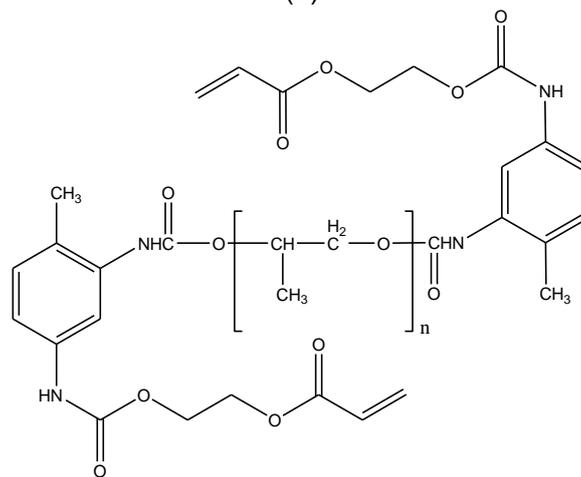
Uma das opções que vem sendo muito utilizada para a fabricação de microssistemas são os polímeros, como por exemplo, polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), poliestireno (PE), policloreto de vinila (PVC), poliuretano (PU), polidimetilsiloxisano (PDMS) e uretana-acrilato (UA) (FERNANDES J. C. B. e FERREIRA L. O. S, 2006) (COLTRO, 2007).

A utilização da técnica de fotopolimerização cujo principal polímero utilizado é formado por oligômeros à base de Uretana-Acrilato (Figura 5.20), apresenta diversas vantagens como a secagem instantânea, redução no consumo de energia e materiais

de baixo custo. Essa técnica representa um grande avanço no desenvolvimento de materiais de revestimento, adesivos e na indústria de tintas. Basicamente, o mecanismo para a gravação dos canais é a junção de dois efeitos gerados pela exposição à luz UV, fotodegradação e a decomposição térmica (FERNANDES J. C. B. e FERREIRA L. O. S, 2006). Por empregar materiais com custos bastante reduzidos e ainda assim apresentar um ótimo desempenho, boa resistência química e apresentam transparência à luz visível, o que possibilita a sua utilização em métodos ópticos de análise.



(a)



(b)

Figura 5.20: Estrutura típica de um oligômero Uretana-Acrilato, (a) espacial e (b) plana.

De posse do polímero UA e do molde microusinado em uma placa de acrílico, vem então a etapa de modelagem. Nesta etapa, a fotorresina uretana-acrilato (UA) é

aquecida em banho-maria (Figura 5.21), com a finalidade de diminuir sua viscosidade e assim obter uma melhor definição nas regiões dos contornos dos microcanais. A água depois de aquecida foi colocada dentro de um becker e adicionado um corante na cor verde apenas para ter um contraste para gerar uma melhor visualização na Figura 5.21.



Figura 5.21: Banho-maria da fotorresina cujo objetivo é diminuir sua viscosidade, onde em verde é a água aquecida, usada somente para dar um contraste e apresentar melhor a UA que é transparente e está contida dentro do copo de plástico.

Uma quantidade de UA suficiente para preencher o molde fabricado em PMMA foi colocada em um copo de café e então aquecida. Este aquecimento foi realizado até a fotorresina alcançar a temperatura de 35°C, medida pelo sensor do agitador (Figura 5.22), o que leva em torno de 5min.



Figura 5.22: Sensor utilizado para medir a temperatura da UA após aquecida.

Após a fotorresina atingir a temperatura estabelecida, ela é depositada no molde de PMMA (Figura 5.23). Este molde foi previamente preparado com uma fina camada de desmoldante PVA, o mesmo utilizado para laminações com fibras de vidro, cuja finalidade é facilitar a remoção após a polimerização da resina no molde.

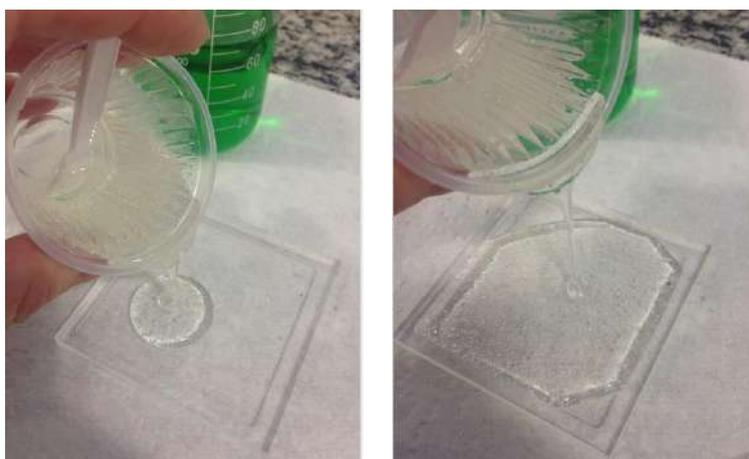


Figura 5.23: Deposição da fotorresina aquecida no molde.

Devido à agitação da fotorresina para homogeneização de temperatura, surgem bolhas (Figura 5.24a) e para que estas sejam eliminadas, o molde preenchido com a UA aquecida, é levado a um ambiente com vácuo de 22 Tor. Esse ambiente é produzido dentro de um dessecador, ficando em repouso o conjunto durante 1h e assim ocorrendo eliminação destas (Figura 5.24b).

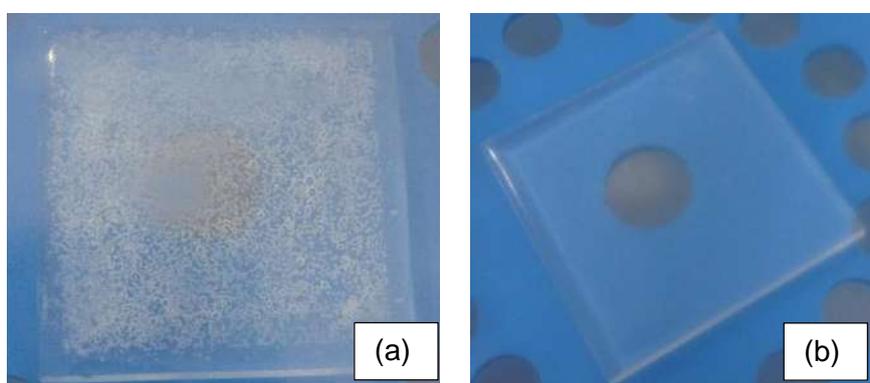


Figura 5.24: (a) Bolhas que se formam devido a agitação da fotorresina para homogeneização da temperatura e deposição no molde (b) molde contendo a fotorresina após o ambiente com vácuo.

Esse dessecador (Figura 5.25a) possui um diâmetro de 250 mm, vacuômetro em metal de latão, registro em latão com borracha sintética para vedação e um anel de alumínio para travar a tampa. A bomba responsável pelo vácuo (Figura 5.25b), é uma bomba de alto vácuo da JB-Platinum duplo estágio modelo DV142 com capacidade de 5CFM a qual para atingir 100 Pa leva 2 min.

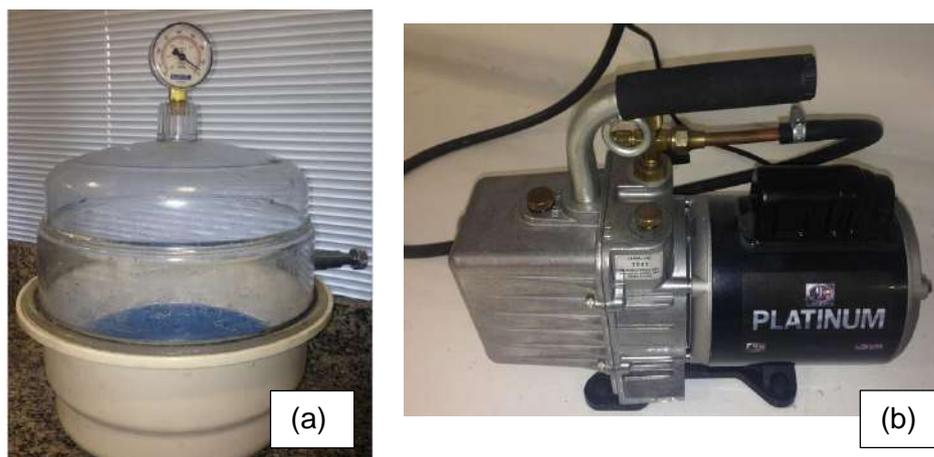


Figura 5.25: (a) Dessecador com vácuo para a retirada das bolhas e (b) bomba de alto vácuo JB-Platinum, duplo estágio de 5CFM.

Depois de retirado o vácuo do dessecador onde estava descansando o molde com a resina, esse conjunto é levado até a fotoexpositora.

A fotolitografia profunda no ultravioleta com fotorresina UA (FERNANDES J. C. B. e FERREIRA L. O. S, 2006) (Fonseca, 2008) se baseia em procedimentos utilizados para a confecção de carimbos comerciais. A fotolitografia profunda no UV, permite a prototipagem rápida dos dispositivos sem necessidade de equipamentos especiais e outros reagentes, o que reduz drasticamente os custos para a sua produção (Fonseca, 2008).

A fotoexpositora utilizada neste trabalho é mostrada na Figura 5.26, uma máquina comercial Polijet Carbrink modelo Prata composta por dois conjuntos de lâmpadas (380nm), cada um com quatro lâmpadas, localizados na parte superior e inferior da máquina, os quais são acionados independentemente. O conjunto foi exposto à luz U.V. durante 300s, para a cura e conseqüente transferência dos microcanais do molde para

o polímero. O valor de 300s chegou-se após vários testes variando o tempo de exposição.



Figura 5.26: Máquina fotoexpositora (processadora de carimbos), utilizada no presente trabalho.

Com o término do tempo programado na fotoexpositora para a polimerização da resina, o conjunto é retirado do interior da máquina e o molde é separado do polímero, como pode ser visualizado na Figura 5.27, onde pode ser visualizado o molde e a base do dispositivo com os microsseparadores moldados logo após etapa de fotoexposição.

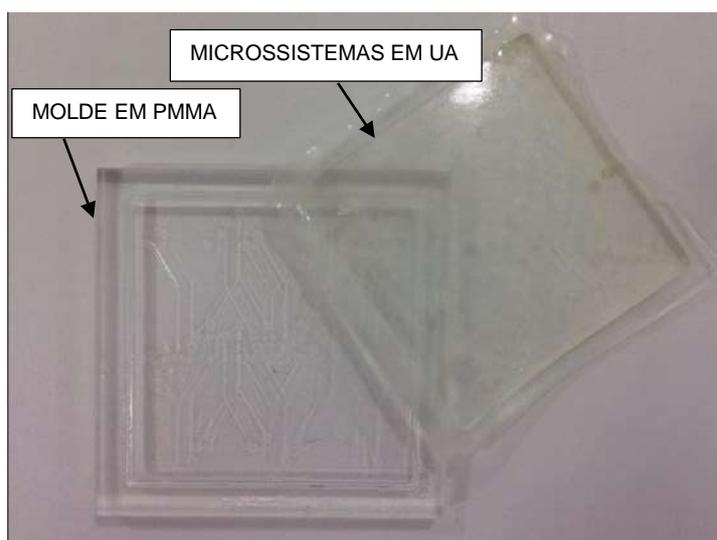


Figura 5.27: Dispositivo de polímero UA removido do molde de acrílico.

Em seguida ocorre a etapa de limpeza e remoção dos excessos de polímero não sensibilizado pela luz U.V. por meio de um banho revelador com agitação ultrassônica (por 10 min) com um solvente apropriado, que no caso desta resina de carimbo, é apenas água levemente aquecida e detergente (Jr, 2012).

A Figura 5.28 ilustra o equipamento de banho ultrassônico utilizado para limpeza de restos de fotorresina que ainda possam estar nos microcanais.



Figura 5.28: Banho de ultrassom utilizado no processo de limpeza.

5.2.2 Caracterização do microdispositivo em UA

Após a fabricação e caracterização de dimensões do molde fabricado em acrílico, fabricou-se então por fotolitografia os microseparadores de UA. Suas dimensões também foram caracterizadas utilizando o microscópio digital *Hirox Digital Microscope* modelo *KH.8700*. Uma ideia preliminar de como ficou o microdispositivo em UA é apresentado na Figura 5.29, com uma altura uniforme de 50 μm para o microdispositivo e larguras de: entrada 400 μm , a bifurcação maior 400 μm e a bifurcação menor tem 100 μm , como projetado e apresentado na Tabela 5.2.

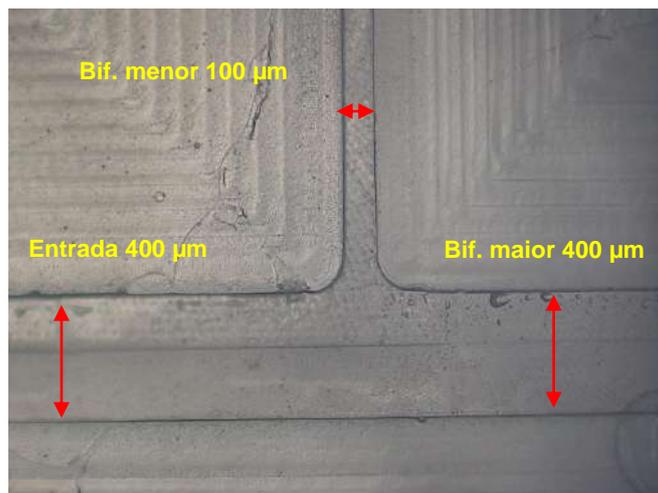


Figura 5.29: Visualização do microseparador fabricado em UA.

Para medição da profundidade dos canais foi necessário gerar uma imagem em 3D no *software* do *Hirox Digital Microscope* dos canais do microseparador. As Figuras 5.30 a 5.32, apresentam uma típica imagem 3D gerada pelo *software*, para a entrada, bifurcação maior e bifurcação menor, respectivamente, medidas tomadas próximas a região de bifurcação, onde o plano em amarelo representa a seção do canal onde será extraído o perfil tridimensional.

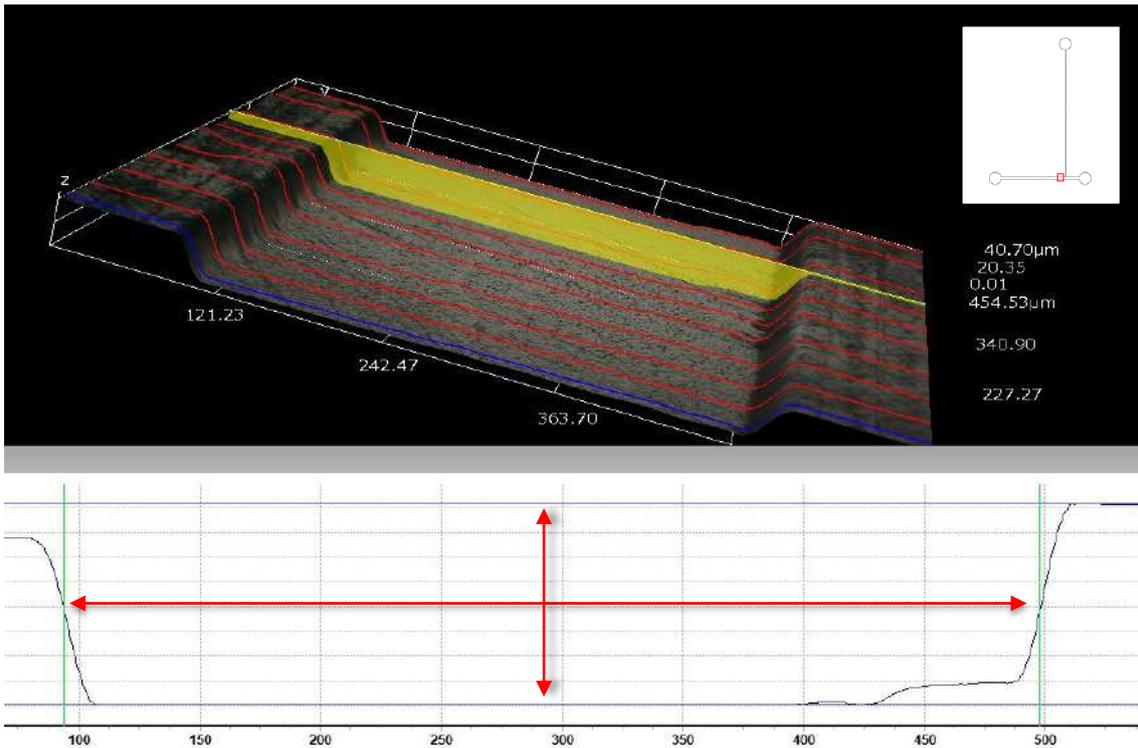


Figura 5.30: Microscopia 3D do microcanal com profundidade de 50 μm (seta da vertical) para a entrada (seta da horizontal) de 400 μm próxima a região de bifurcação e assinalado no canto superior esquerdo, fabricado em UA.

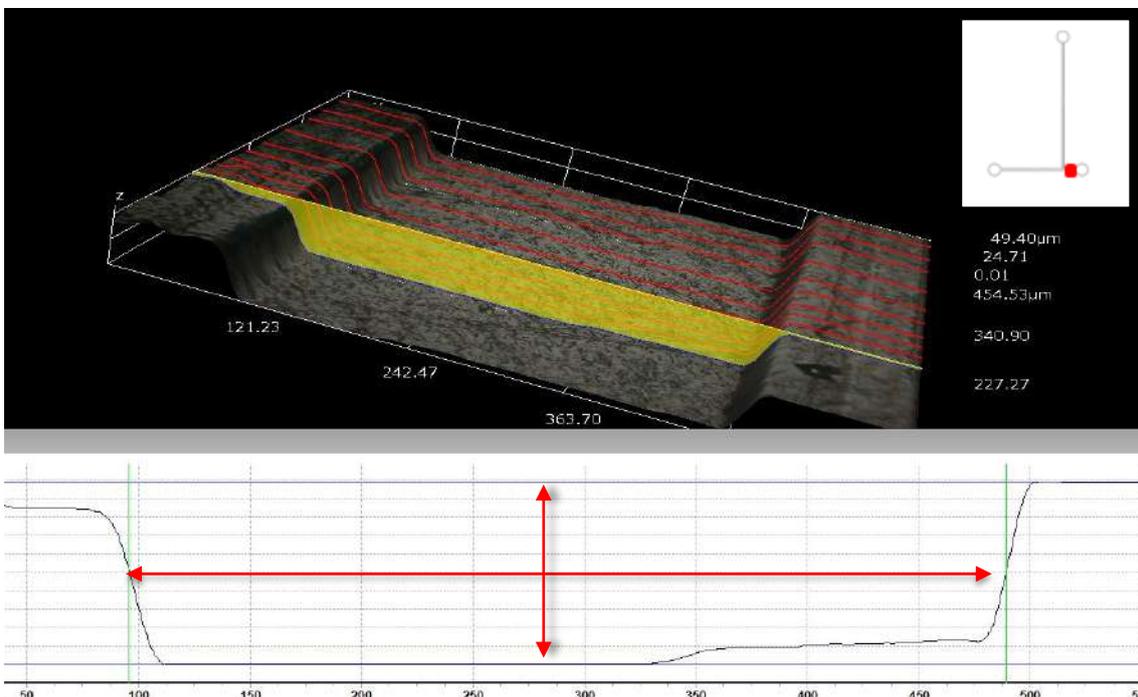


Figura 5.31: Microscopia 3D do microcanal com profundidade de 50 μm (seta da vertical) para a bif. maior (seta da horizontal) de 400 μm próxima a região de bifurcação e assinalado no canto superior esquerdo fabricado em UA.

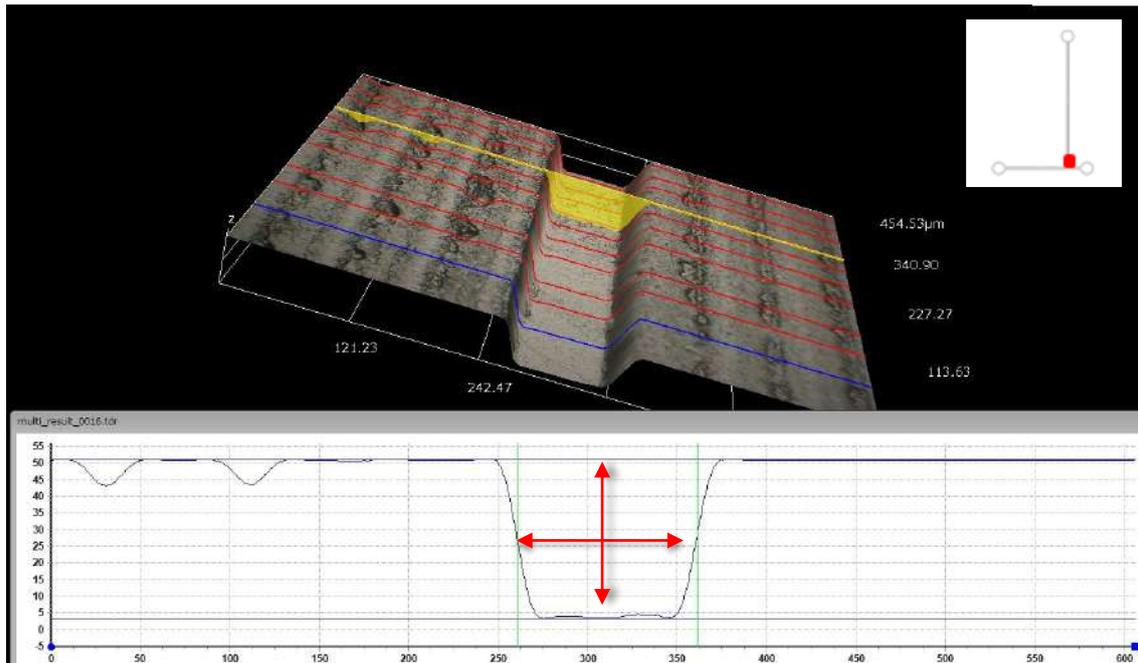


Figura 5.32: Microscopia 3D do microcanal com profundidade de 50 μm (seta da vertical) para a bif. menor de 100 μm (seta da horizontal) próxima a região de bifurcação e assinalado no canto superior esquerdo, fabricado em UA.

5.2.3 Selagem do microdispositivo em UA

Após limpo, seco e caracterizadas suas dimensões, o microdispositivo fabricado em UA necessita de uma tampa para a selagem e uma comunicação com o meio externo. O primeiro passo para a comunicação com o meio exterior foi a realização de um furo com um *punch* dermatológico (Figura 5.33) no local onde seria encaixado as mangueiras. Este equipamento utilizado para biópsia dermatológica, tem diâmetro interno de 1,25 mm, o qual é posicionado sobre o ponto onde se deseja fazer o orifício.



Figura 5.33: *Punch* dermatológico com diâmetro interno de 1,25mm utilizado para realizar as furações para a conexão das mangueiras com o meio externo.

O microdispositivo fica como ilustrado na Figura 5.34, após realizados os furos para comunicação com o meio exterior e com a tampa já fabricada.

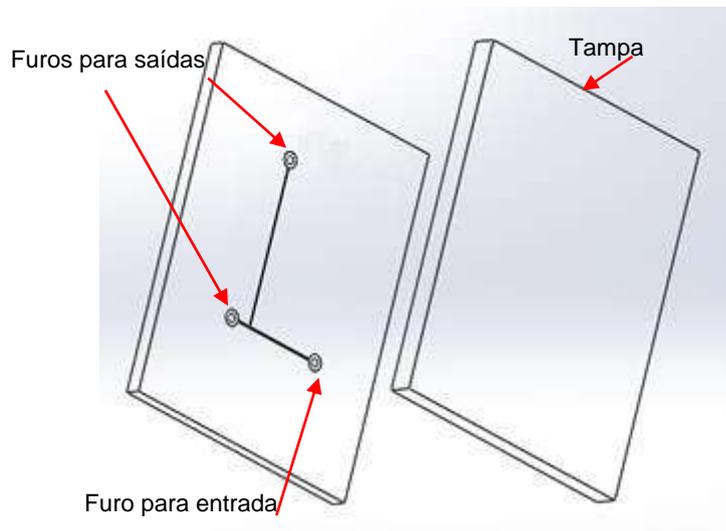


Figura 5.34: Desenho esquemático do microseparador com os furos de entrada e saída dos microcanais antes de sua selagem e sua tampa em UA.

Para a fabricação da tampa, é utilizado o mesmo material, a resina UA e ambas as partes, base e tampa, são colocadas unidas uma a outra, novamente sob a exposição da luz UV de modo a permitir a ligação intra-intermolecular entre elas. Para garantir isso, um fluxo de argônio é imposto ao microdispositivo no interior de um compartimento fechado dentro da fotoexpositora durante aproximadamente 10 minutos e depois reexpondo o conjunto à luz. U.V. e ao fluxo de argônio durante aproximadamente 15 minutos com a finalidade de se proporcionar uma atmosfera livre de oxigênio ao redor

do substrato. Com isso, o filme de resina não polimerizado que se encontra na superfície da tampa sofre polimerização, proporcionando uma adesão química direta (ou seja, intermolecular e sem camadas intermediárias) entre a tampa e a base, a Figura 5.35 ilustra este processo de selagem do microcanal.

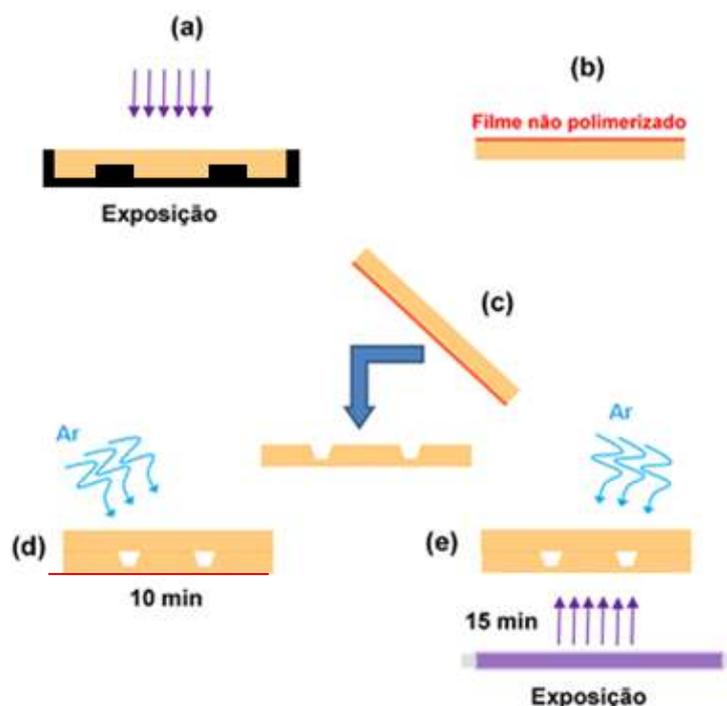


Figura 5.35: Esquema do procedimento de selagem. (a) Exposição da resina na fabricação da tampa; (b) tampa de resina com superfície não polimerizada; (c) união da tampa com placa contendo os canais; (d) aplicação do fluxo de argônio gasoso para geração de atmosfera livre de oxigênio; (e) exposição final para selagem irreversível do sistema (Jr, 2012) (Fonseca, 2008).

Após a selagem, o microdispositivo é conectado com o meio exterior utilizando aspiradores traqueais de número 04 (mangueiras) da Mark Med, para que ocorrerá através deles então a entrada e saída de fluido nos canais. Essas mangueiras foram encaixadas nos furos realizados pelo *punch* antes da selagem. Essas mangueiras têm diâmetro externo de 1,30 mm (Figura 5.36) que são encaixadas de maneira forçada pois seu diâmetro externo é maior que o orifício, isso fez com que fosse apresentado uma certa dificuldade para seu encaixe, o que vai lhe garantir uma melhor fixação e ajudar a evitar

possíveis vazamentos. A Figura 5.37 apresenta um desenho esquemático de como ficou o microdispositivo finalizado com as conexões e selagem.

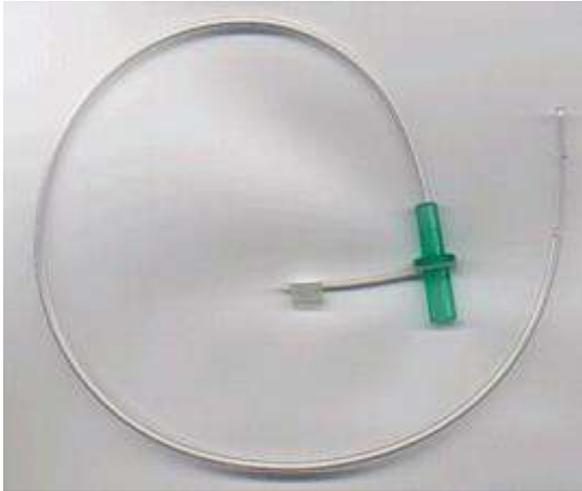


Figura 5.36: Sonda para aspiração traqueal número 04 da Mark Med com diâmetro externo de 1,3mm.

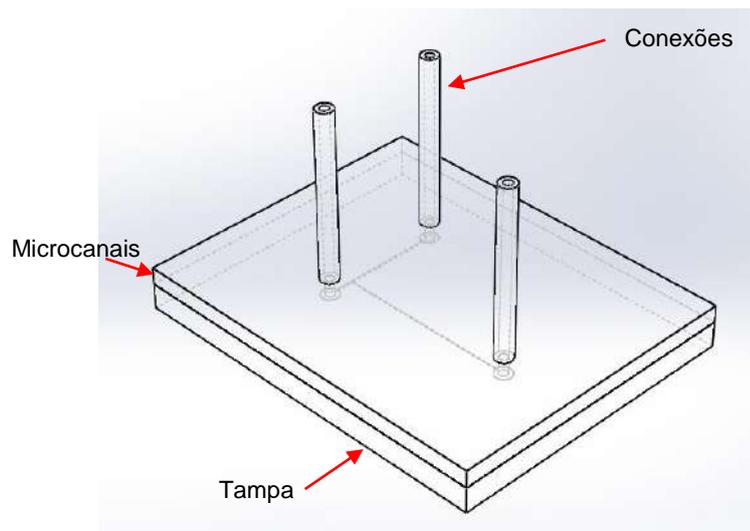


Figura 5.37: Desenho esquemático do microseparador depois de selado com as conexões de entrada e saída dos microcanais.

O aspirador traqueal (aqui chamado de conexões) é colocado pressionando no buraco feito pelo *punch* e para uma melhor fixação, é utilizada a própria UA como “cola”. Essa UA é aplicada ao redor dos tubos e o conjunto novamente sofre o processo de fotolitografia por um tempo menor, somente para que a fotorresina endureça e ofereça uma maior resistência ao desencaixe com o meio exterior. O dispositivo projetado

exposto anteriormente na Figura 5.37 é apresentado na Figura 5.38 depois de concluída a sua fabricação, selagem e comunicação com o mundo exterior.



Figura 5.38: Microdispositivo fabricado em UA através de molde em PMMA através de litografia macia e ligado com o meio externo.

A Figura 5.39 abaixo, ilustra na forma de fluxograma o procedimento de microfabricação aqui descrito para um microdispositivo fabricado em UA. Dentre as várias vantagens já comentadas anteriormente pode-se de forma resumida destacar aqui, que a principal vantagem no processo de fabricação proposto neste trabalho está na facilidade de obtenção de uma satisfatória selagem dos canais e conexões externas com a utilização de um único material para as estruturas (tampa e base), para a vedação e para adesão das partes. Uma vez que a etapa de selagem está em geral muito cara e difícil na maioria dos processos tradicionais de fabricação de dispositivos microfluídicos. Além disso, o fluido usado para limpeza dos canais neste processo de fabricação não é agressivo à saúde e ao meio ambiente, apresentando-se como uma outra vantagem desse processo de fabricação.

Etapas de microfabricação do microseparador em UA por litografia macia

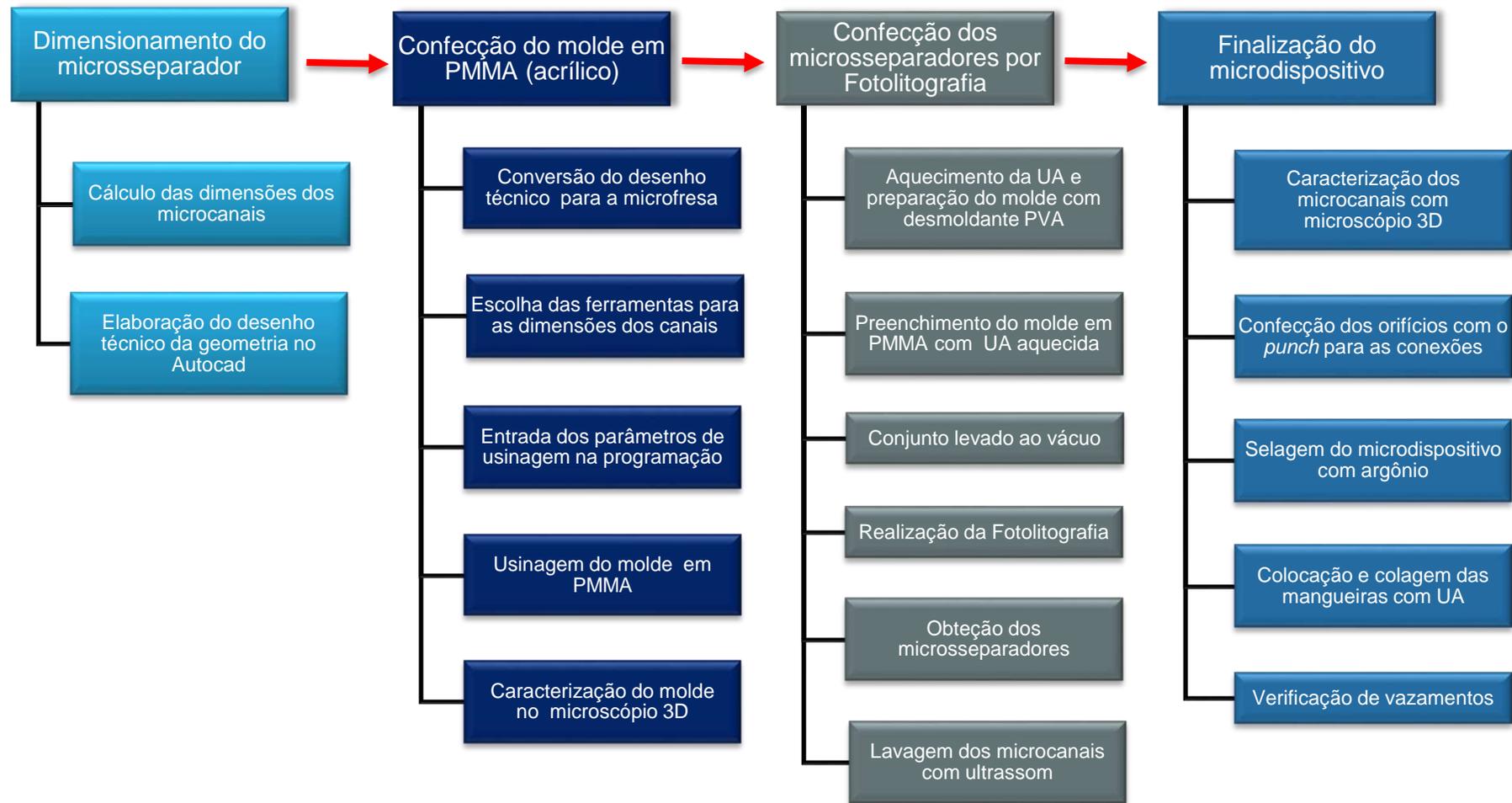


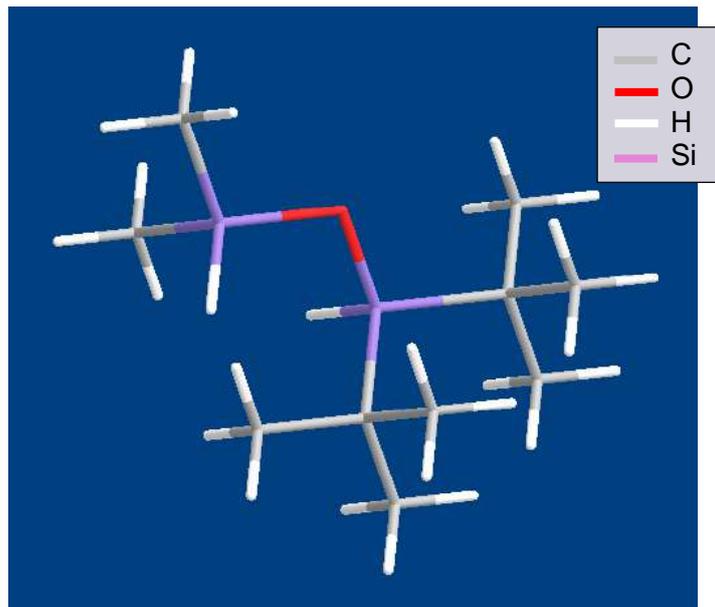
Figura 5.39: Fluxograma do processo de fabricação do microseparador em UA.

5.3 Microdispositivo em polidimetilsiloxano (PDMS)

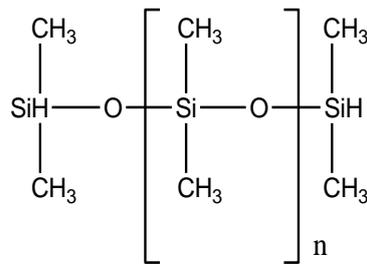
5.3.1 Fabricação em PDMS

O polidimetilsiloxano (PDMS) é um elastômero de silicone, sendo na atualidade um dos materiais poliméricos orgânicos mais utilizados na indústria biomédica devido às inúmeras características que apresenta nomeadamente a biocompatibilidade, é considerado inerte, termicamente estável, transparência a ondas eletromagnéticas na faixa do visível e UV próximo, flexibilidade mecânica, durabilidade, permeável a gases, facilmente manuseado à temperatura ambiente, podendo ainda ser aplicado como isolador dielétrico e ainda em estudos de biomicrofluidica, como por exemplo estudos do escoamento sanguíneo, visto que é um material ao qual o sangue não adere logo não se formam coágulos e é possível ser feito um estudo in vitro da microcirculação humana em laboratório. Entretanto alguns problemas podem surgir como: a permeabilidade a vapores de água, o que pode ser difícil de controlar considerando os pequenos volumes que são gerenciados no interior do dispositivo, moléculas hidrofóbicas podem adsorver em dispositivos de PDMS, sendo liberadas posteriormente nos líquidos que percorrem os canais, causando problemas em estudos biológicos. O PDMS apresenta baixa resistência química em presença de algumas soluções ácidas e básicas, tais como: hidróxido de potássio, ácido nítrico, ácido sulfúrico e etc (Kersaudy-Kerhoas, 2010).

O PDMS é um polímero de silício (constituente químico da base é dimetilvinil, terminada dimetilsiloxano), que por sua vez está inseridos no grupo dos polímeros orgânicos sintéticos, inerte, atóxico e não inflamável, cuja estrutura molecular apresenta silício e ligações de oxigênio na sua cadeia como apresentada na Figura 5.40ab. Por outro lado, o agente de cura é feito à base de siloxano e metildimetilo.



(a)



(b)

Figura 5.40: Estrutura química do polidimetilsiloxano, (a) espacial e (b) plana.

O polímero PDMS utilizado neste estudo foi o Sylgard[®] 184 da empresa Dow Corning (Figura 5.41), sendo este fornecido num kit composto pelo pré-polímero e pelo agente de cura, ambos em estado líquido, que serão misturados na proporção de 1 grama de agente de cura para 10 gramas de pré-polímero (proporção 10:1).

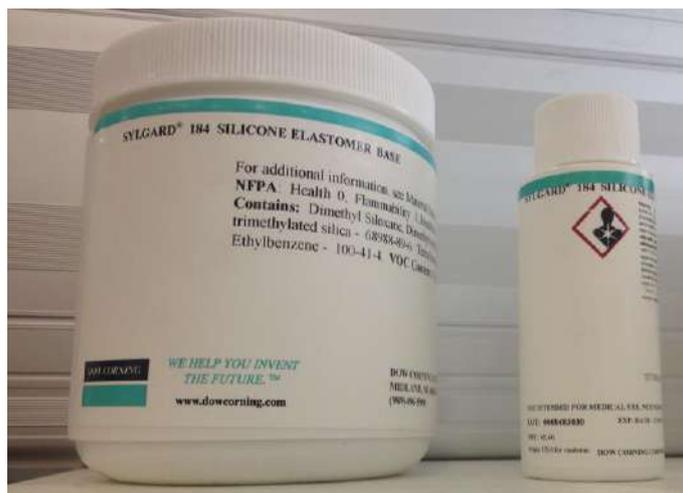


Figura 5.41: PDMS Sylgard 184 da empresa Dow Corning.

Após a pesagem das quantidades do agente de cura (1g) e do pré-polímero (10g), utilizando uma balança de precisão (Figura 5.42a), estes são misturados (Figura 5.42b). Enquanto a mistura ocorre, surgem bolhas de ar (Figura 5.43a) as quais são removidas num ambiente com vácuo (22 Tor, o mesmo usado para a UA) dentro de um dessecador já com o depósito realizado no molde (Figura 5.43b) durante 1h.

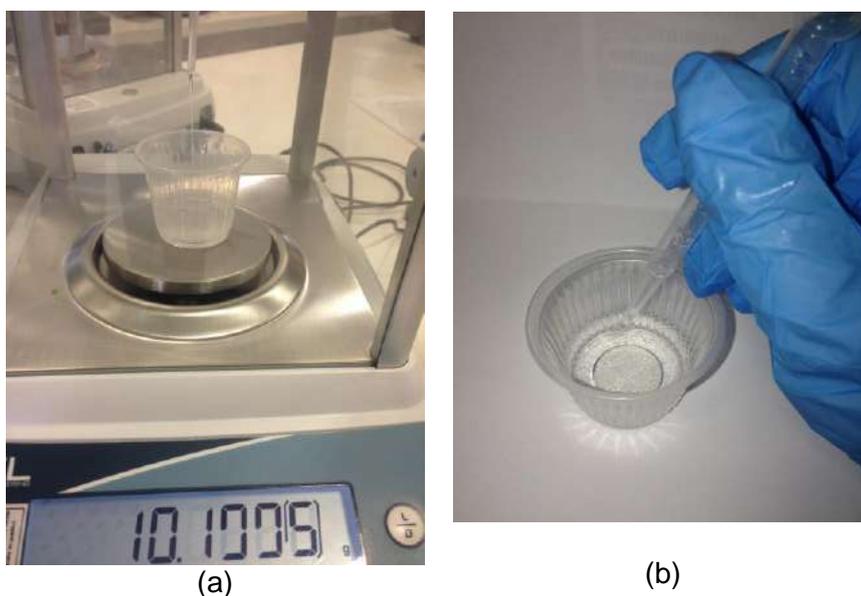


Figura 5.42: (a) Pesagem do pré-polímero com o agente de cura e (b) mistura de ambos.



Figura 5.43: (a) Bolhas resultantes da mistura entre o pré-polímero e o agente de cura para a formação do PDMS e (b) polímero levado ao vácuo durante 1h para a remoção destas bolhas.

Enquanto o polímero está no vácuo para a remoção das bolhas, o molde e a placa de vidro que foram utilizados na fabricação e selagem foram lavados dentro de uma capela fluxo laminar vertical da marca Filterflux, modelo: flv 656/3 (Figura 5.44) para evitar o acúmulo de poeira sobre as superfícies, facilitando assim a selagem final. A lavagem utilizou água deionizada com detergente específico para produtos de laboratório Isodert, da empresa Isofar, com ph 6,5 a 7,5; para a realizar o enxague utilizou-se água deionizada e, posteriormente, foi então aplicado álcool etílico, ilustrado na Figura 5.45a lavando o molde e Figura 5.45b para a placa de vidro.

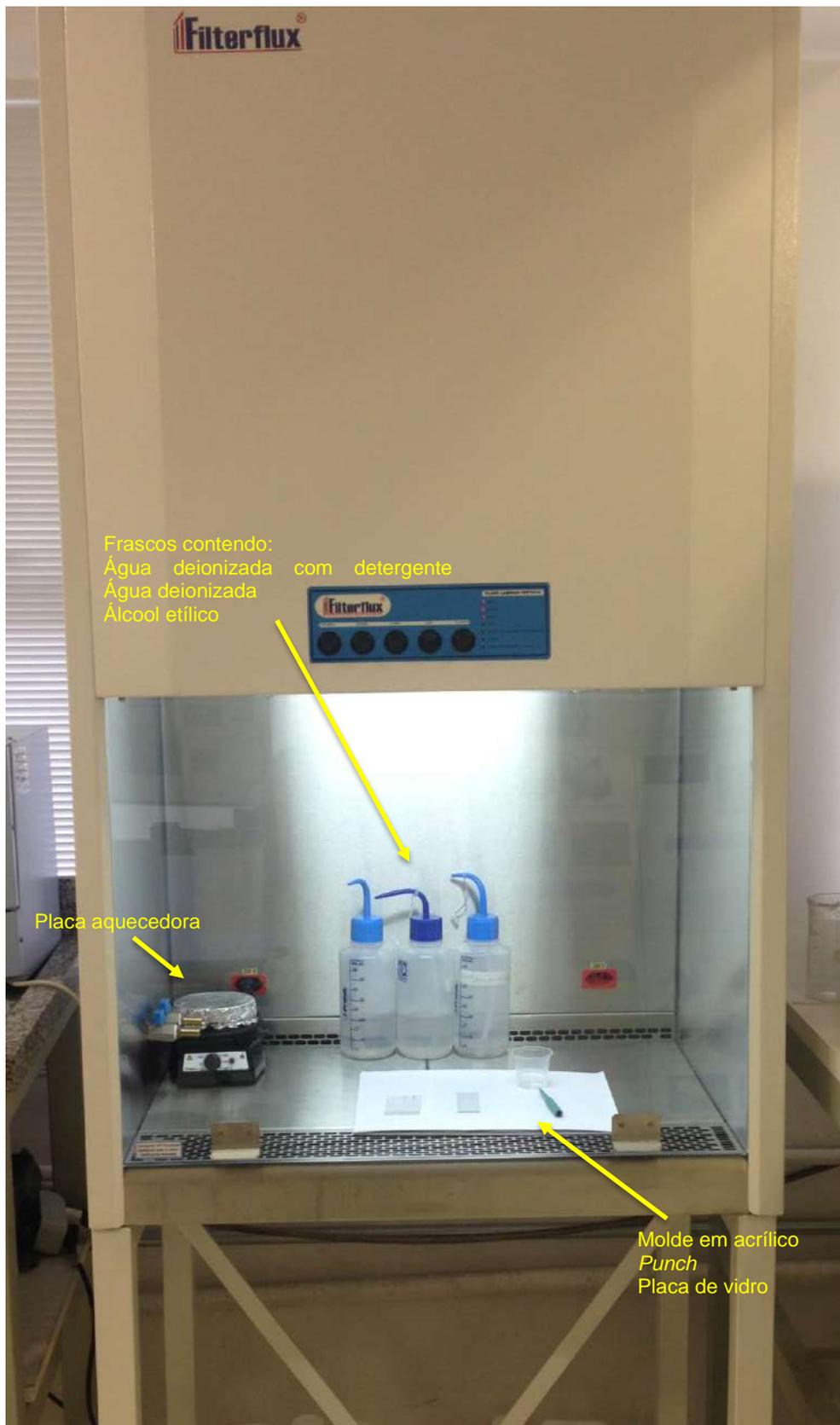


Figura 5.44: Capela de fluxo laminar vertical da marca Filterflux - modelo: flv 656/3, onde foram lavados os materiais e selados os microdispositivos fabricados em PDMS, mostrando a disposição dos equipamentos: chapa quente, frascos, molde em acrílico, vidro e *punch*.

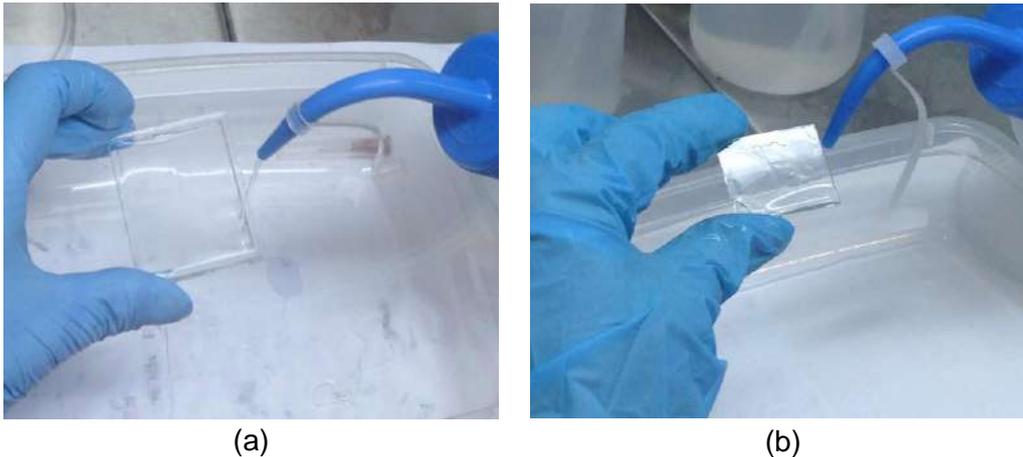


Figura 5.45: Uma das etapas de lavagem do (a) molde em acrílico e (b) placa de vidro, dentro da capela de fluxo laminar vertical.

Após a lavagem, os materiais (molde em PMMA e placa de vidro) foram secos em uma placa aquecedora Fisatom, modelo 501 (Figura 5.46); que se encontrava dentro da capela de fluxo laminar vertical, para que não houvesse deposição de poeira sobre os materiais e facilitando assim a selagem. Todo o processo de fabricação do microdispositivo fabricado em PDMS, utilizou-se luva sem talco, pois isso interfere na qualidade da selagem.



Figura 5.46: Placa aquecedora Fisatom utilizada para a secagem do molde e placa de vidro após a lavagem.

De posse do molde fabricado em PMMA (Figura 5.9) limpo e seco, a mistura do pré-polímero com o agente de cura na proporção 10:1 sem bolhas é depositada sobre este, como mostrado na Figura 5.47, semelhantemente ao que foi feito com o microdispositivo fabricado em UA.

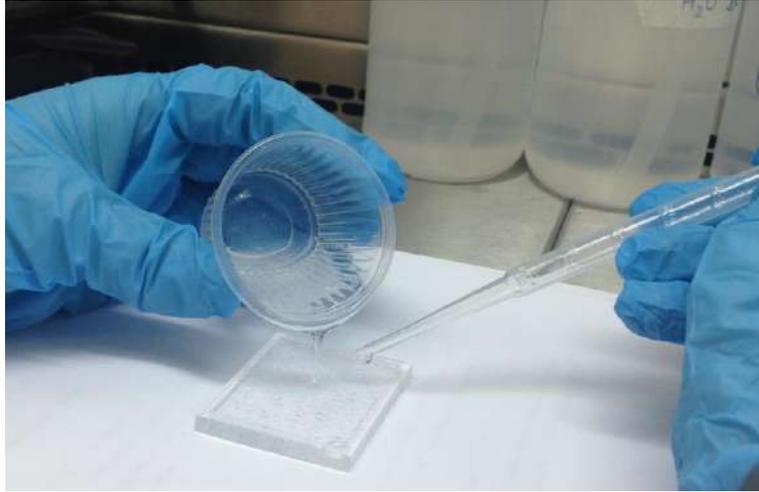


Figura 5.47: PDMS sendo depositado sobre o molde de acrílico, o mesmo usado para a fabricação dos microdispositivos em UA, dentro da capela de fluxo laminar vertical, com luvas sem talco.

Por fim o molde em acrílico contendo o PDMS foi colocado sobre placa aquecedora da marca Fisatom modelo 501 (Figura 5.46), durante 45min a 70^o C. Passado esse tempo, o polímero PDMS está endurecido (curado) estando pronto para ser removido do molde de acrílico (Figura 5.48abc). No caso da fabricação com PDMS, o uso de desmoldante não se faz necessário, pois após a polimerização, sua remoção do molde se faz com grande facilidade.

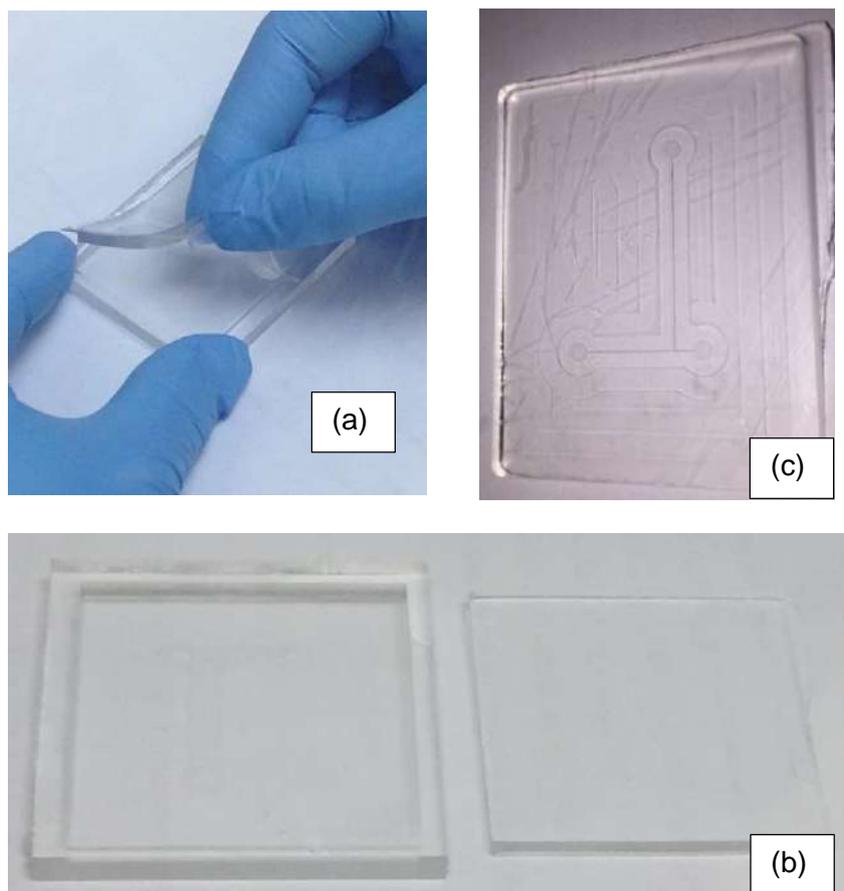


Figura 5.48: (a) PDMS sendo removido do molde após a cura em chapa quente, (b) após ser removido por completo comparado com o molde e (c) detalhe do microcanal fabricado.

Com o processo de cura já concluído, o microdispositivo é caracterizado utilizando o microscópio 3D digital *Hirox Digital Microscope* modelo *KH.8700* e somente posterior a isso ocorre a selagem.

5.3.2 Caracterização do microdispositivo em PDMS

Após o término da fabricação do microsseparator em PDMS, segue então para a etapa de caracterização geométrica das dimensões dos canais utilizando o mesmo microscópio digital *Hirox Digital Microscope* modelo *KH.8700* (Figura 5.12) o qual foi utilizado para a caracterização do molde em acrílico e do microdispositivo fabricado em UA. Os pontos para as caracterizações foram sincronizados com os mesmos pontos utilizados na caracterização do molde em acrílico e microsseparator em UA (Figura

5.13). Uma ideia preliminar de como ficou o microdispositivo em PDMS é apresentado na Figura 5.49, com uma altura uniforme de 50 μm para o microdispositivo e larguras de: entrada 400 μm , a bifurcação maior 400 μm e a bifurcação menor tem 100 μm , como projetado e apresentado na Tabela 4.2.

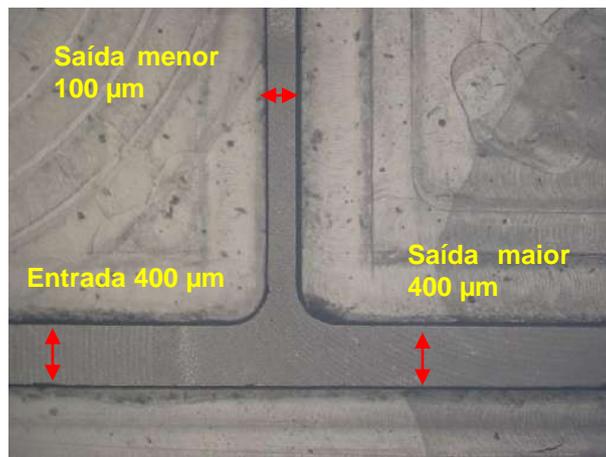


Figura 5.49: Visualização do microseparador fabricado em PDMS, cuja entrada possui 400 μm , a bif. maior tem dimensão de 400 μm e a bif. menor tem 100 μm , como projetado e apresentado na Tabela 3.2.

As medidas das dimensões de largura e profundidade foram realizadas ao longo de todo microseparador, como pontos coincidentes ao do molde fabricado em PMMA, como apresentados exemplos nas Figuras 5.50 a 5.52, as quais ilustram uma típica imagem gerada pelo microscópio 3D usado no presente trabalho, medidas obtidas próximo a região de bifurcação.

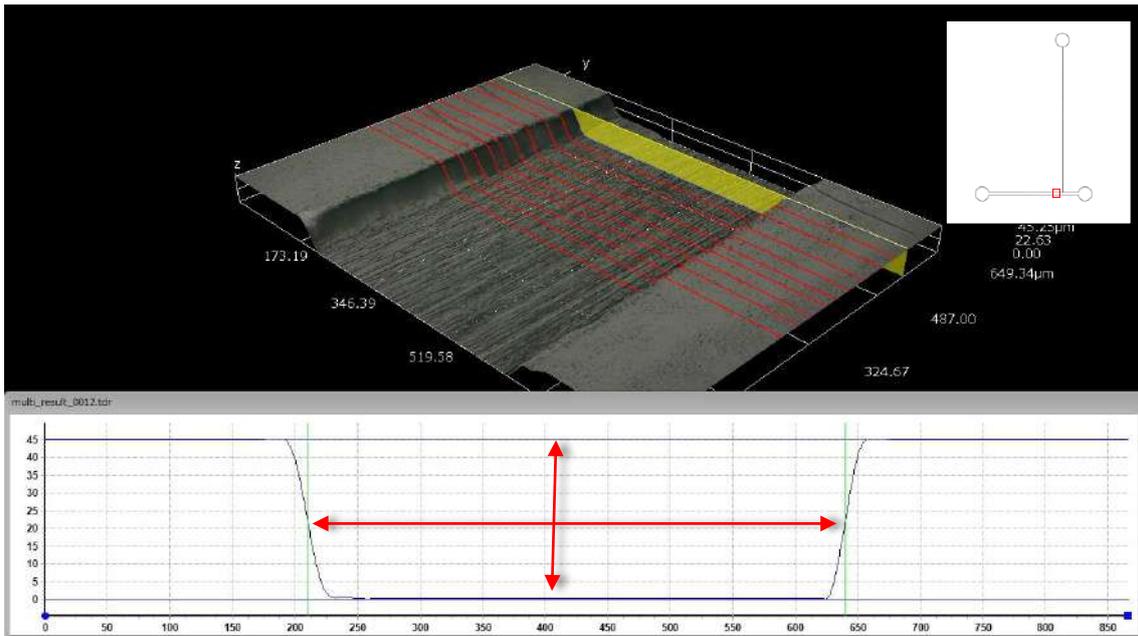


Figura 5.50: Microscopia 3D do canal da entrada de 400 μm (seta na horizontal) fabricado em PDMS do microseparador com profundidade de 50 μm (seta na vertical), medida tomada próximo a região de bifurcação e assinalado no canto superior esquerdo.

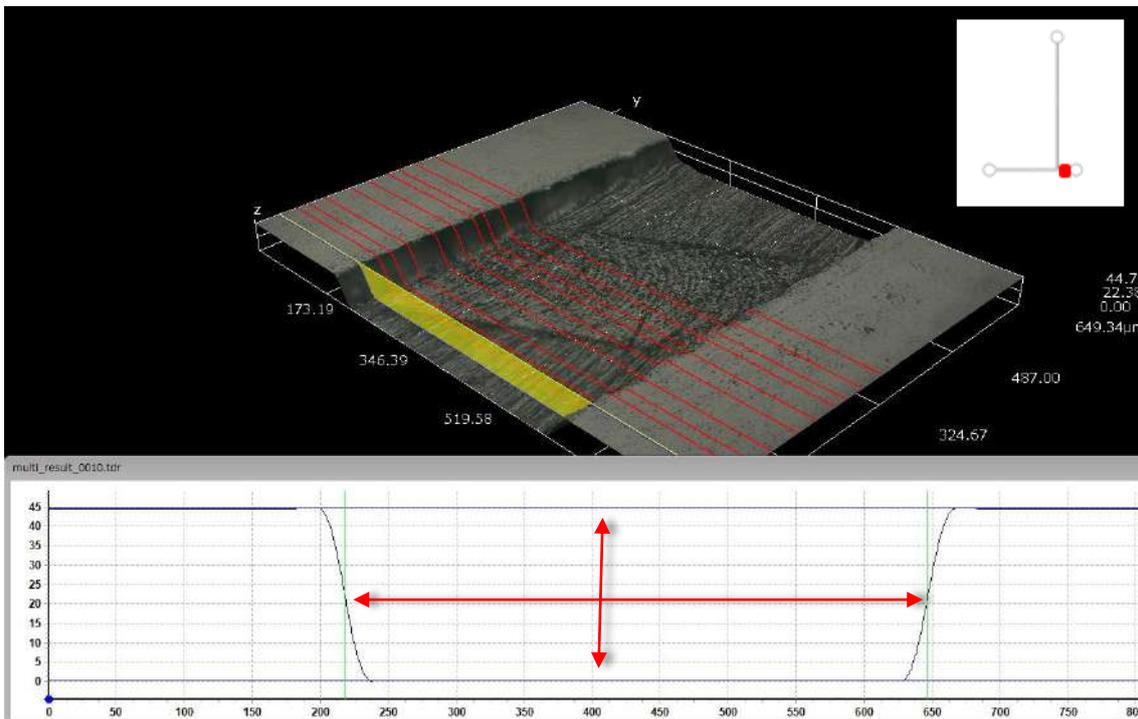


Figura 5.51: Microscopia 3D da bif. maior de 400 μm (seta na horizontal) fabricado em PDMS do microseparador com profundidade de 50 μm (seta na vertical), medida tomada próximo a região de bifurcação e assinalado no canto superior esquerdo.

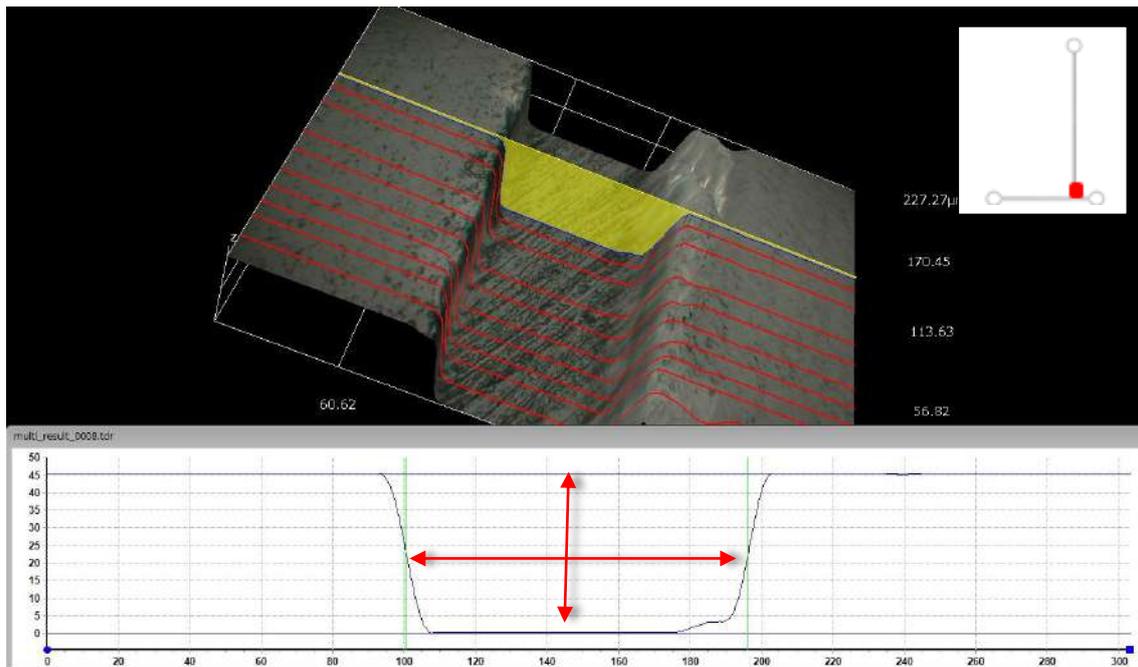


Figura 5.52: Microscopia 3D da bif. menor de 100 μm (seta da horizontal), próximo a região de bifurcação assinalado no canto superior esquerdo, fabricado em PDMS microseparador com profundidade de 50 μm (seta da vertical).

5.3.3 Selagem dos microseparadores em PDMS

A selagem tradicional para microdispositivo fabricado em PDMS com placa de vidro faz uso de plasma de oxigênio, que é um equipamento de alto custo e não disponível no laboratório do presente estudo. Foi então pesquisada uma alternativa para a selagem que fosse compatível com que havia disponível e fosse de fácil aquisição.

A alternativa encontrada foi o uso do próprio polímero PDMS, fazendo um “sanduíche” entre a base (a qual contém o microcanal), placa de vidro e mais PDMS para fazer uma tampa (Shiroma, 2016). Esse segundo depósito do polímero, consiste em colocar mais polímero sobre o vidro posicionado sobre o dispositivo. Para ter uma ideia de como ocorreu essa selagem, antes da ligação com o meio externo, a Figura 5.53 apresenta um desenho esquemático.

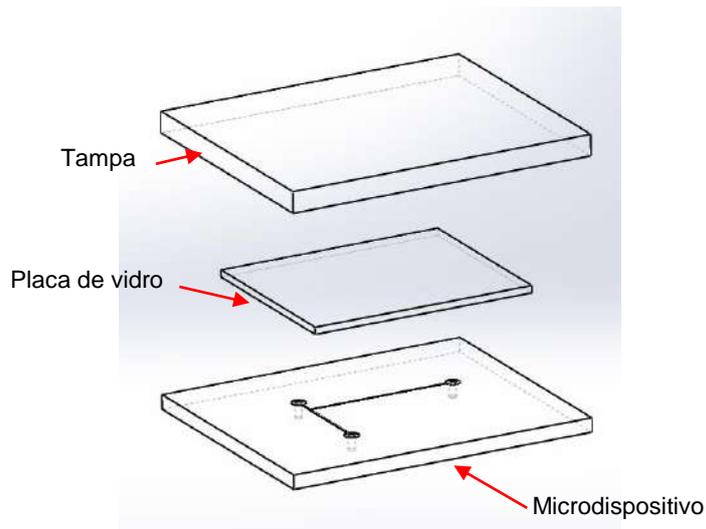
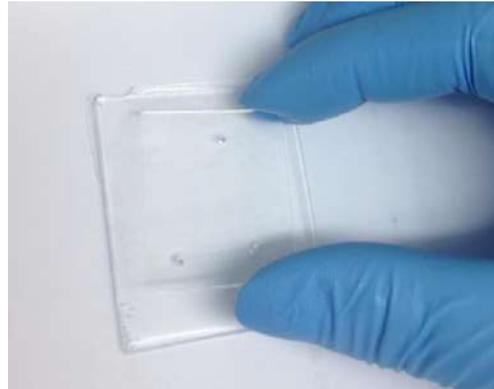
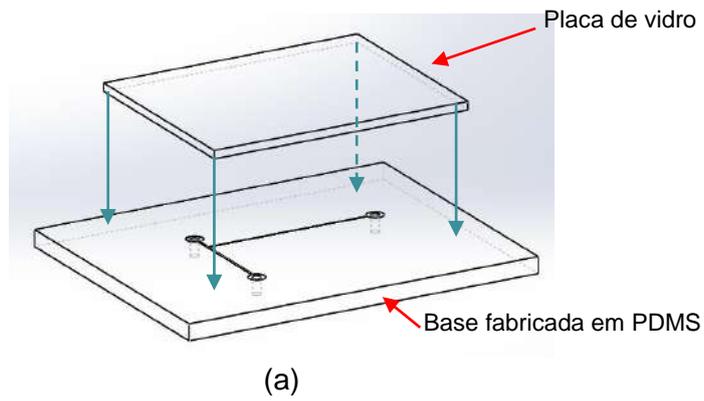


Figura 5.53: Desenho esquemático da selagem com PDMS, vidro e PDMS, ainda sem as ligações com o meio externo.

Antes de posicionar o vidro sobre os canais, foi realizado o furo utilizando o *punch* dermatológico, procedimento igualmente realizado na fabricação do microseparador em UA, para posteriormente encaixar as mangueiras para comunicação com o meio externo.

O vidro posicionado sobre os canais foi lavado com água deionizada, detergente apropriado para uso em laboratório e aplicado álcool etílico, posteriormente secado placa aquecedora, dentro de uma capela de fluxo laminar vertical, afim de deixar as superfícies mais livres de impurezas. Durante todo o processo de fabricação com o PDMS a luva utilizada era sem talco, pois isso interfere na qualidade da selagem.

O vidro foi posicionado de uma maneira que os microcanais que estão na base do PDMS ficasse com uma borda sobrando para que esse garantisse a selagem como mostrado no desenho esquemático na Figura 5.54a e como foi realizado dentro da capela de fluxo laminar vertical apresentado na Figura 5.54b.



(b)

Figura 5.54: (a) Desenho esquemático da colocação da placa de vidro sobre os microcanais na base fabricada em PDMS deixando uma borda, (b) foto do procedimento sendo realizado.

Após o posicionamento desse vidro, veio então mais deposição de PDMS afim de segurar essa placa de vidro e garantisse a selagem, como mostrado na Figura 5.55, cujo processo foi também realizado dentro da capela de fluxo laminar vertical.

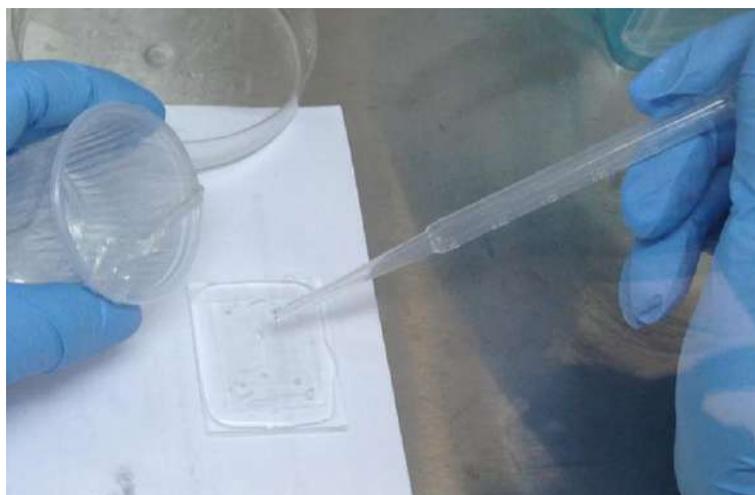


Figura 5.55: Deposição de PDMS sobre o conjunto: placa de vidro e base contendo o microdispositivo.

Com a deposição dessa nova camada de PDMS, o conjunto precisava passar por um novo processo de cura. Neste ponto do processo o conjunto foi levado para uma estufa analógica de esterilização e secagem da marca Sterilifer modelo SX350, mostrada na Figura 5.56. Este processo foi mais rápido que o processo de cura do molde contendo o polímero, pois essa camada é bem mais fina, em torno de 20 min a 70^o C.



Figura 5.56: Estufa da marca Sterilifer utilizada para a segunda parte do processo de cura do PDMS.

A Figura 5.57 apresenta um resumo de como ocorre essa selagem utilizando vidro num microdispositivo fabricado em PDMS.

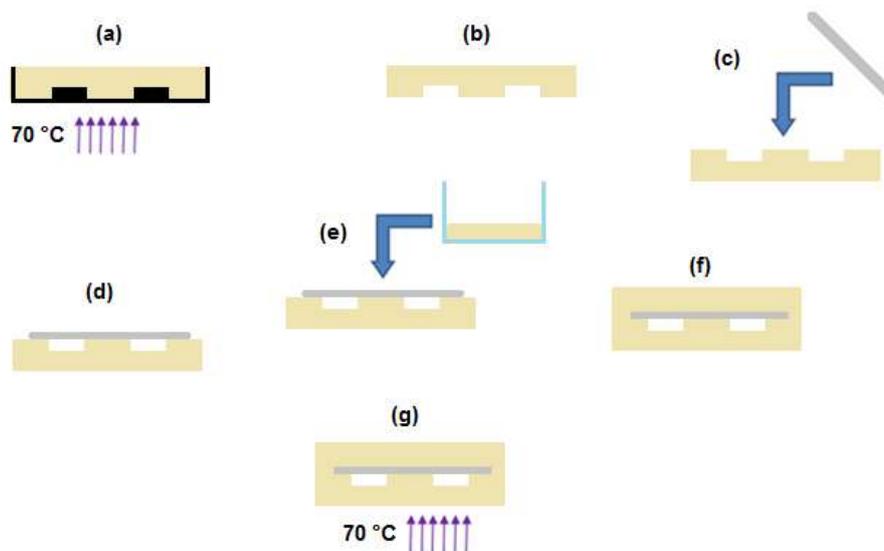


Figura 5.57: Resumo da selagem de PDMS utilizando vidro sem plasma.

Com a conclusão da segunda etapa de cura, vem a comunicação com o meio externo. Com o furo já realizado com o *punch* dermatológico (procedimento realizado antes do posicionamento do vidro), basta apenas encaixar o aspirador tranqueal número 04 da Mark Med. Essa etapa também foi realizada dentro da capela de fluxo laminar vertical, como mostrada na Figura 5.58.

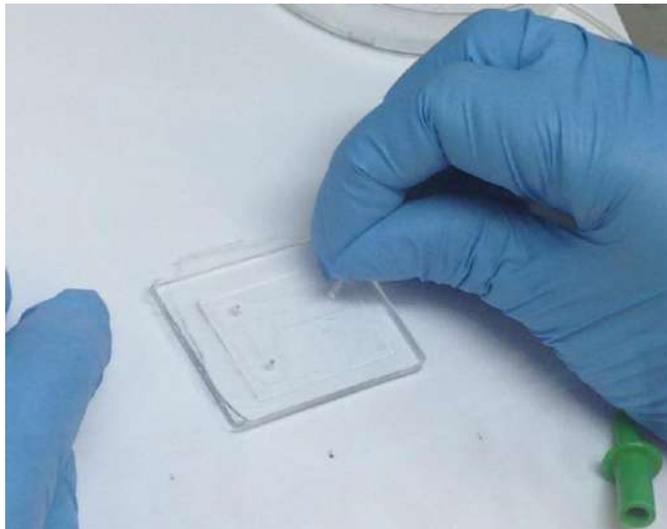


Figura 5.58: Encaixe da mangueira (sonda de aspiração traqueal) que fez a ligação com o meio externo.

Um desenho esquemático de como ficou o microdispositivo fabricado em PDMS seguindo as etapas descritas acima, é mostrado na Figura 5.59a e uma foto do mesmo depois de concluída a sua fabricação é mostrado na Figura 5.59b, selagem e comunicação com o mundo exterior aparece na Figura 5.59c.

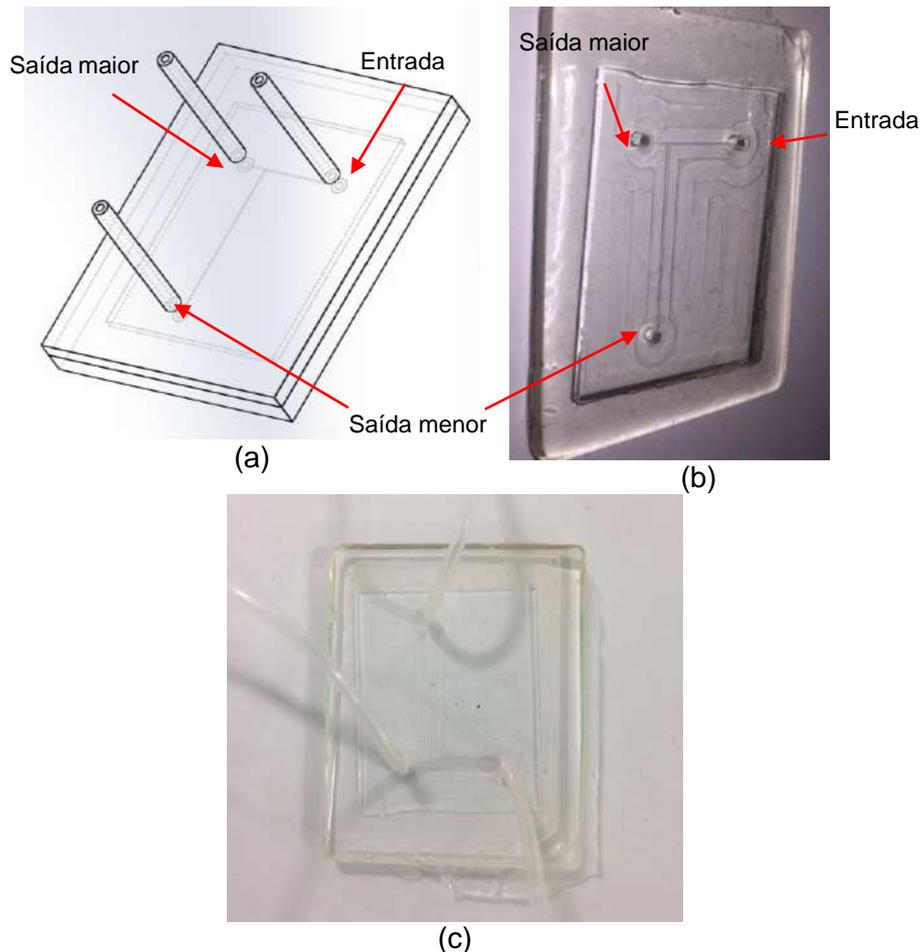


Figura 5.59: (a) Desenho esquemático da selagem com PDMS, vidro e PDMS já com as conexões, (b) foto do mesmo dispositivo ainda sem a ligação com o meio externo e (c) microdispositivo pronto para uso.

A Figura 5.60 ilustra na forma de fluxograma o procedimento de microfabricação aqui descrito para um microdispositivo fabricado em PDMS. Dentre as várias vantagens já comentadas anteriormente, pode-se de forma resumida destacar aqui, que a principal vantagem do polímero PDMS é a sua transparência, que facilita a observação e estudo do fluido, porém seu custo e dificuldade de obtenção são fatores serem considerados. Sua selagem também tem um alto custo, mas buscando alternativas, esse processo se torna acessível e satisfatório. A conexão com o meio externo realizada no microseparador em UA mostrou-se satisfatória e por esse motivo foi também aplicada ao microdispositivo fabricado em PDMS.

Etapas de microfabricação do microseparador em PDMS por litografia macia

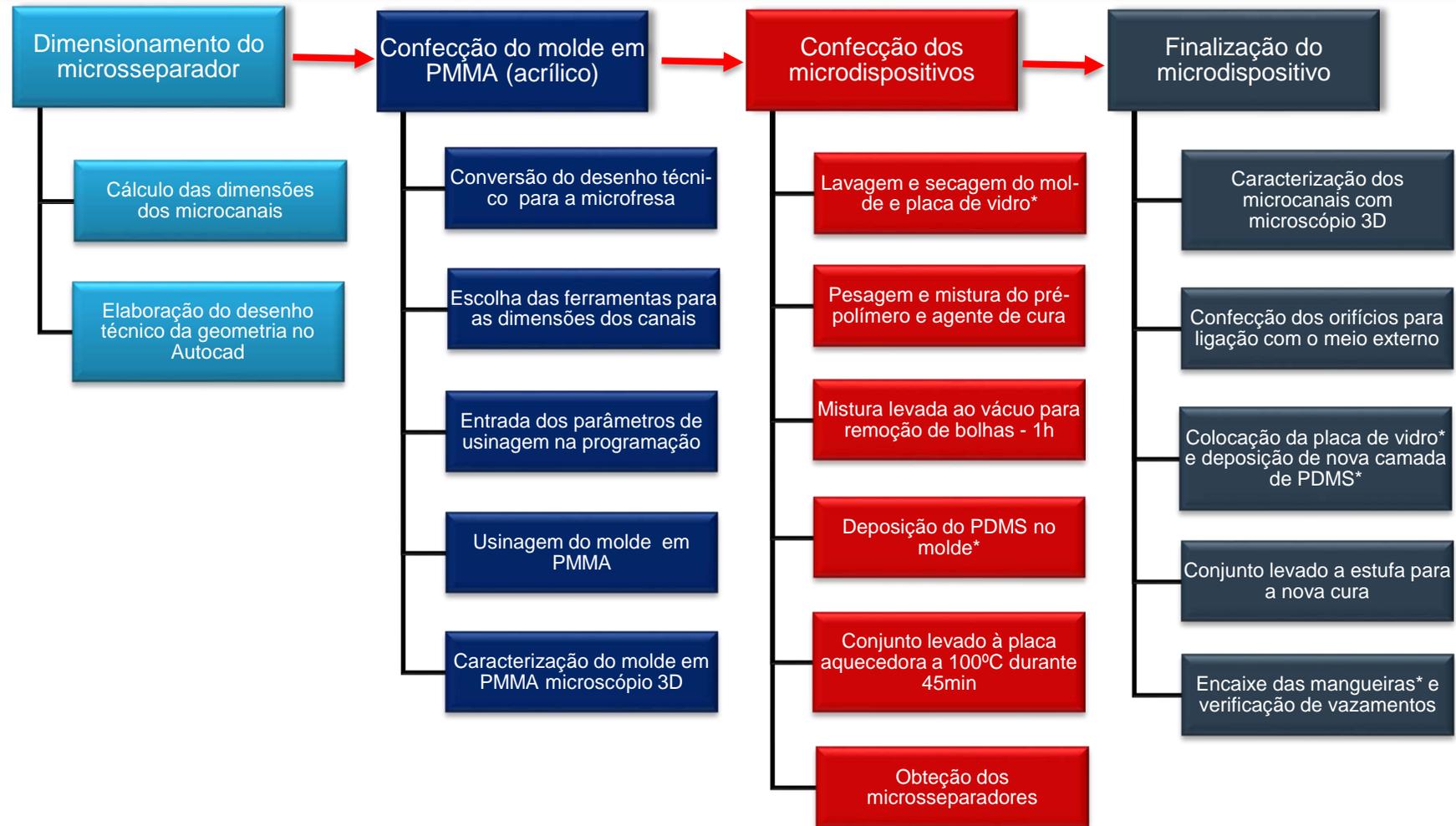


Figura 5.60: Fluxograma do processo de fabricação do microseparadores em PDMS (* dentro de capela de fluxo laminar vertical).

Ambos os polímeros utilizados nos microdispositivos tiveram processos de fabricação distintos. A UA por ser mais viscosa, passou pelo processo de aquecimento para se adaptar melhor aos contornos do molde fabricado em PMMA e sua cura foi realizada por incidência de luz ultravioleta. O PDMS tem um processo um pouco mais exigente, pois necessita ter suas etapas de fabricação utilizando uma capela de fluxo laminar. Sua viscosidade é melhor e por isso o processo de aquecimento não se fez necessário e sua cura é realizada justamente utilizando calor.

Os processos de selagem também foram distintos, porém a ligação com o meio externo seguiram processo utilizando os mesmos materiais.

6. ANÁLISE EXPERIMENTAL

A parte experimental do presente trabalho apresenta um estudo do escoamento do fluido utilizando balanço de massa para os microseparadores fabricados em ambos os polímeros, o micro-PIV para obter o perfil de velocidade do microseparador fabricado em PDMS.

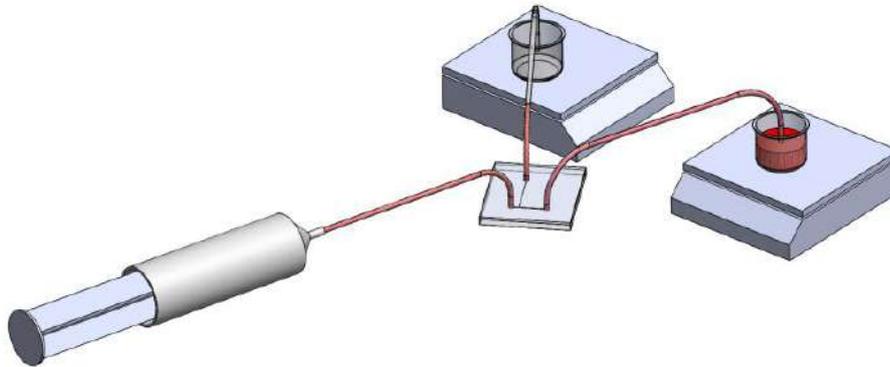
O material biológico humano utilizado no presente trabalho foi coletado de doadoras mulheres na faixa etária média de 24 anos. O sangue canino foi de uma fêmea da raça Shih tzu com 4 anos. Ambas as amostras sanguíneas foram coletadas no máximo de uma hora antes do experimento, todas foram diluídas utilizando o critério da porcentagem de hematócritos presente no sangue total, valores obtidos através de hemograma, com a mesma solução de diluição (PBS) e obtidos os resultados de microseparação por analisador hematológico automatizado.

6.1 Montagem da bancada experimental para o balanço de massa dos microseparadores fabricados em UA e PDMS

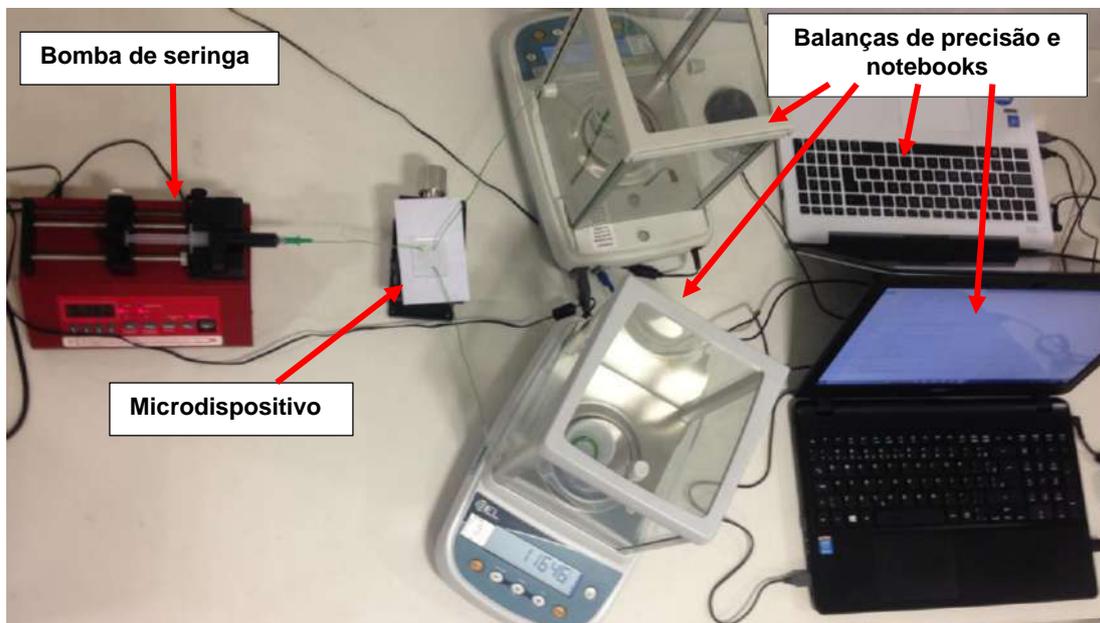
Depois de realizado o procedimento de caracterização das dimensões dos microcanais dos separadores, este dispositivo foi selado e ligado ao meio externo para realização de uma análise experimental preliminar de garantia de escoamento.

O aparato experimental montado no contexto do presente estudo pode ser visualizado na forma esquemática na Figura 6.1a. A Figura 6.1b, mostra uma foto da bancada, a qual conta com uma bomba de seringa (New Era NE-1000), duas balanças de precisão M333 Bel Mark e dois notebooks para a aquisição de dados através de um programa desenvolvido em Python. A bomba de seringa foi setada para uma vazão

proposta de 0,150 mL/min, para que a lei da bifurcação fosse satisfeita usando o microseparador, com 100 μm de largura na bifurcação menor.



(a)



(b)

Figura 6.1: Aparato experimental na montado para o balanço de massa dos microdispositivos fabricados em UA e PDMS, (a) mostrado de forma esquemática e (b) mostrado na forma de foto.

O balanço de massa, calculado através da equação da continuidade, nos permite encontrar a vazão em cada canal, pois relaciona a vazão com a massa da entrada com a massa da saída do sistema, para o presente trabalho, a equação se torna:

$$W_{\text{entrada}} = W_{\text{saída do canal maior}} + W_{\text{saída do canal menor}} \quad (6.1)$$

onde W é a vazão mássica em g/s. Lembrando que:

$$(\rho u A)_{\text{entrada}} = (\rho u A)_{\text{saída do canal maior}} + (\rho u A)_{\text{saída do canal menor}} \quad (6.2)$$

onde ρ é a massa específica do fluido g/m^3 , u é a velocidade média em m/s e A é a área da seção transversal do canal em m^2 .

Sabendo a vazão imposta na entrada (vazão essa que é prescrita na bomba pelo operador) e a vazão mássica medida nas saídas através da medida de variação de massa ao longo do tempo com ajuda de uma balança de precisão e aquisitado pelos notebooks.

A Figura 6.2 mostra o fluido (água com corante verde) entrado no microdispositivo e saindo pelo microcanal de $400 \mu\text{m}$ (bifurcação maior) e bifurcação menor ($100 \mu\text{m}$) passando através do aspirador traqueal até chegar a balança de precisão.

O balanço de massa foi realizado tomando três medidas de vazão cada uma com duração de uma hora, com iguais valores iniciais de vazão imposta à bomba de seringa de $0,150 \text{ mL/min}$, equivalente a $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ g/s}$.

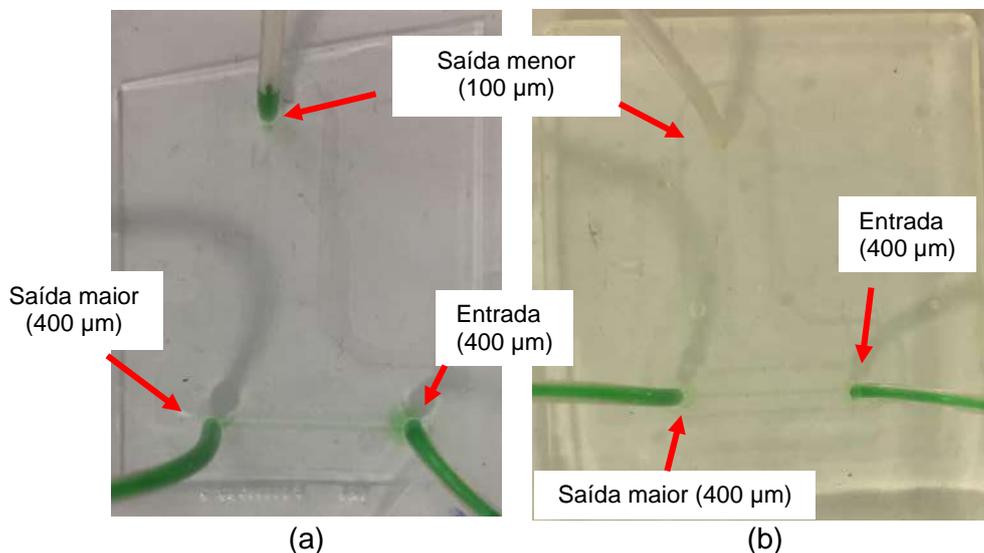


Figura 6.2: Microdispositivo sendo utilizado para o balanço de massa (a) fabricado em PDMS e (b) fabricado em UA.

6.2 Micro-PIV

A técnica de Velocimetria por Imagem de Partícula, do inglês Particle Image Velocimetry (PIV), é uma técnica globalmente usada para a obtenção de perfis de velocidade de escoamentos à escala macrométrica, sendo a aplicação da técnica a escoamentos à microescala designada por micro-PIV (Lopes, 2012).

Ambas as técnicas passam pela medição óptica experimental do escoamento, através de uma câmara de alta velocidade (CCD ou CMOS). São obtidas imagens de um plano do escoamento do fluido em estudo, que são, posteriormente, analisadas de modo a obter perfis de velocidade. Os campos de velocidades tridimensionais podem ser obtidos de duas formas distintas (Raffel, 2007) (Silva G. L., 2008) (Lopes, 2012).

A aquisição da velocidade do escoamento é feita com recurso de medição do deslocamento de partículas traçadoras num intervalo de tempo pré-estabelecido (conhecido). Em muitos dos casos, o fluido sob estudo não apresenta partículas suspensas, tendo estas de ser introduzidas, sendo escolhidas concordantes na ordem de grandeza com o escoamento a ser estudado (Raffel, 2007) (Abreu, 2011) (Bitsch, 2005) (Lopes, 2012) (Lima R. W., 2008).

As partículas são detectadas pela câmara de alta velocidade, através de diferenças na intensidade luminosa sob este aspecto existem duas possibilidades de iluminação. Ou as partículas são iluminadas por um feixe luminoso pulsado gerado por um sistema laser, ou as partículas são simplesmente iluminadas por um sistema de iluminação contínuo (lâmpada ou luz fria) (Lopes, 2012).

No primeiro caso, as partículas traçadoras são excitadas por um feixe laser pulsado a uma certa frequência, emitindo elas próprias radiação, o que permite adquirir as posições instantâneas de cada partícula em dois pulsos de luz consecutivos. Ao saber as posições das partículas, é possível saber o deslocamento de cada uma delas no intervalo de tempo entre dois pulsos de luz e, conseqüentemente, sua a velocidade. No caso de ser iluminação contínua, a câmara capta luz proveniente do espaço não

ocupado por partículas e as zonas onde não é detectada luz correspondem, à presença de partículas. Neste caso, o intervalo de tempo não pode ser definido pela frequência do feixe luminoso, sendo definido através do intervalo de aquisição de imagens da câmera, que indica quantas imagens são adquiridas por intervalo de tempo (geralmente contabilizada em frames/segundo). Após adquiridos, os frames são tratados para melhorar a sua qualidade de imagem através da subtração de cada par de frames da imagem média global, fazendo com que o contraste das partículas aumente uma vez que só restará as partículas na imagem, favorecendo a identificação do movimento das partículas pelo algoritmo de correlação, tal tratamento também reduz os pontos de reflexão excessiva, melhorando a imagem. De resto, o princípio é o mesmo, ou seja, são registadas as posições das partículas entre dois frames consecutivas para a obtenção do deslocamento de cada partícula. Em seguida, dividindo o deslocamento de cada partícula, para a quantidade total de frames consecutivas, pelo intervalo de tempo entre os frames, obtém-se a velocidade de cada partícula (Lopes, 2012).

A aquisição das velocidades é efetuada através da aplicação de um algoritmo de correlação (estatística), que processa as imagens de modo a obter os deslocamentos das partículas. Esse processo passa pela divisão das frames em áreas de análise. Em seguida, duas frames consecutivas são correlacionadas através de um algoritmo, que faz corresponder um vetor deslocamento (dado pela média dos deslocamentos das partículas presentes no interior de cada área de análise) a cada área de análise. Após a obtenção dos vetores de deslocamento, estes são divididos pela constante de tempo (definida pelo intervalo entre pulsos ou pelo intervalo entre frames), de modo a se adquirirem os vetores de velocidade para todas as áreas de análise, criando assim um mapa de vetores de velocidade (Lopes, 2012).

A metodologia até aqui apresentada é comum tanto à técnica PIV, como à técnica micro-PIV. A diferença mais evidente entre as duas técnicas reside na forma como é feita a iluminação do escoamento (Lopes, 2012).

Na técnica micro-PIV utiliza-se a iluminação por volume. Neste tipo de iluminação, a espessura do plano de análise é delimitada pela espessura focal que é menor que a espessura do volume iluminado. Assim, todas as partículas no interior do volume são iluminadas, independentemente de estarem ou não dentro dos limites de focagem (Lopes, 2012).

O sistema usado para verificar o perfil de velocidade no presente estudo, localizado no LabMEMS-COPPE-UFRJ, está apresentada na Figura 6.3, com o microdispositivo fabricado em PDMS. Para o microseparador fabricado em UA, não pode ser realizada essas medidas devido a sua baixa transparência.

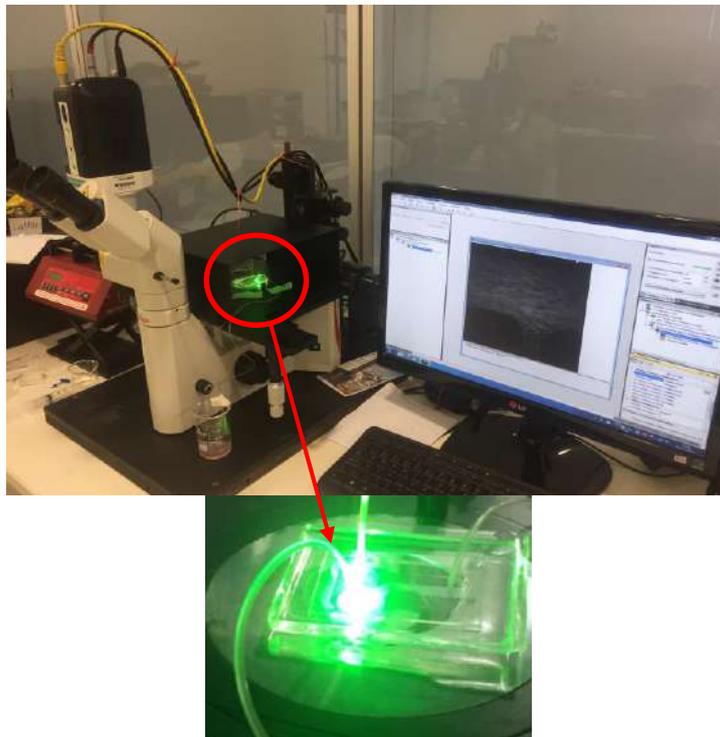


Figura 6.3: Medida do campo de velocidade utilizando o Micro-PIV no microseparador fabricado em PDMS.

As partículas que podem ser utilizadas no micro-PIV são partículas que se excitam em torno de 610 nm, como apresentadas na Figura 6.4. Essas partículas facilitarão a visualização da separação e a análise do perfil de velocidades do microdispositivo

fabricado em PDMS, pois a UA não é transparente o suficiente para que o laser consiga excitar a rodamina.



Figura 6.4: Partícula fluorescente, rodamina b, utilizada para medidas de velocidades no Micro-PIV.

A Figura 6.5 apresenta uma das telas típicas apresentadas durante a medida do campo de velocidade para o microseparador fabricado em PDMS.

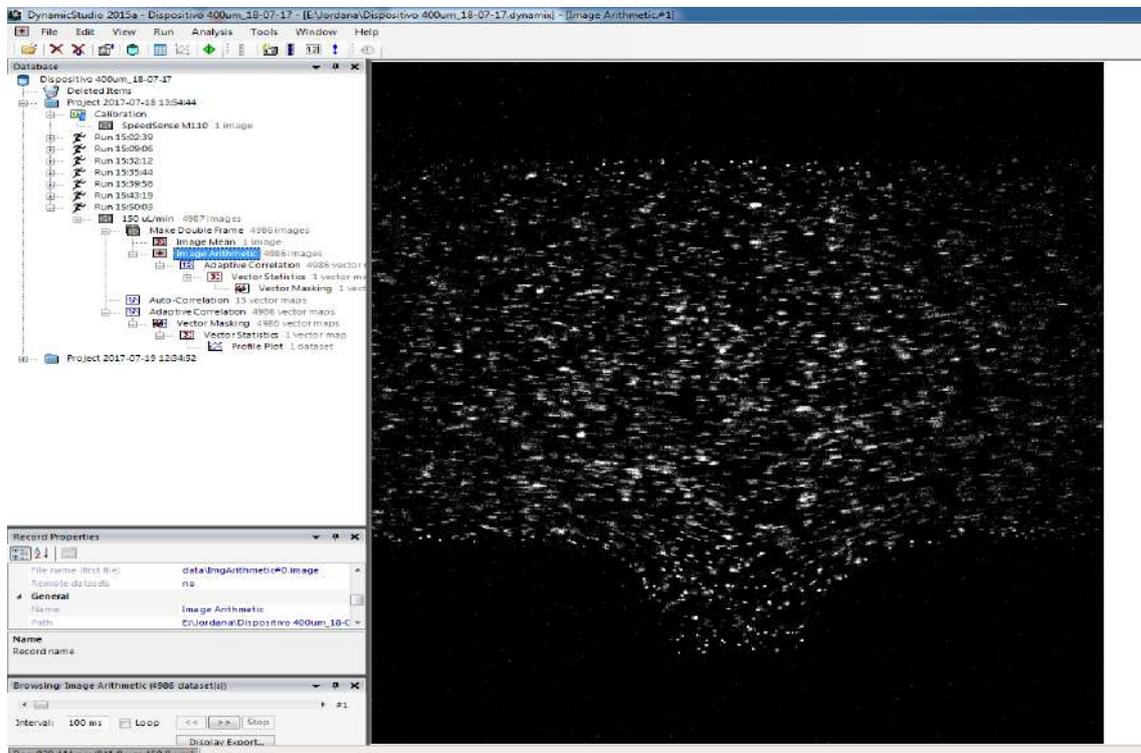


Figura 6.5: Tela típica do Micro-PIV capturando a imagem das partículas de rodamina para medir o campo de velocidade.

6.3 Verificação com material biológico

Uma forma de analisar e verificar a aplicabilidade do dispositivo fabricado foi utilizar então o material biológico: o sangue. Em busca desse material, o qual não poderia ser usado dentro do laboratório onde o estudo inicial foi desenvolvido, pois existem padrões para coleta, manipulação, armazenamento e descarte, verificou-se a possibilidade de uma parceria com laboratório que atendesse esses requisitos éticos e tecnológicos. Essa colaboração então foi realizada com a Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD), o qual está associado ao Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC) da UFRJ em apoio com a Profa Luciana Pizzatti e suas alunas Gabriela Poralla e Nicole Woldmar.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional do Câncer (INCA) com o número 114/04 e na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) com número 813/2006.

6.3.1 Coleta e preparação de material biológico

O material biológico utilizado no presente trabalho foi coletado de doadores do sexo feminino na faixa etária entre 23 a 27 anos. A quantidade doada foi de 2 mL por doadora e armazenado em um tubo de coleta apropriado contendo o anticoagulante EDTA. Após a coleta foi realizado um hemograma com um Analisador hematológico automatizado da marca Sysmex XT-2000iV (Figura 6.6) obtendo assim a quantidade de hemácias, leucócitos, hemoglobina, plaquetas, hematócritos, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos entre outros. Um dos resultados desse hemograma é mostrado na Figura 6.7, abaixo.



Figura 6.6: Analisador hematológico automatizado da marca Sysmex XT-2000iV, pertencente ao LBCD.

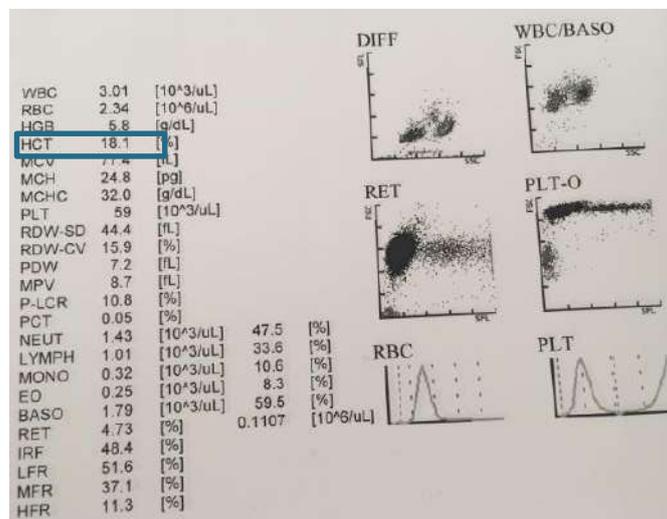


Figura 6.7: Resultado do hemograma do sangue total, gerado pelo analisador Sysmex XT-2000iV.

De posse dos valores de hematócritos, foi então realizada uma diluição de 5%, 10% e 16% de hemácias com PBS (fosfato-salino ou phosphate buffered saline) o qual é uma solução tampão comumente utilizada em Bioquímica. É uma solução salina, contendo cloreto de sódio, fosfato de sódio e, em algumas formulações, cloreto de potássio e fosfato de potássio.

Após calcular a quantidade de sangue e PBS necessário para realizar as diluições, foi então preparada a amostra contendo as diluições e quantidade final de amostra, essa preparação é mostrada na Figura 6.8 (a) e (b).

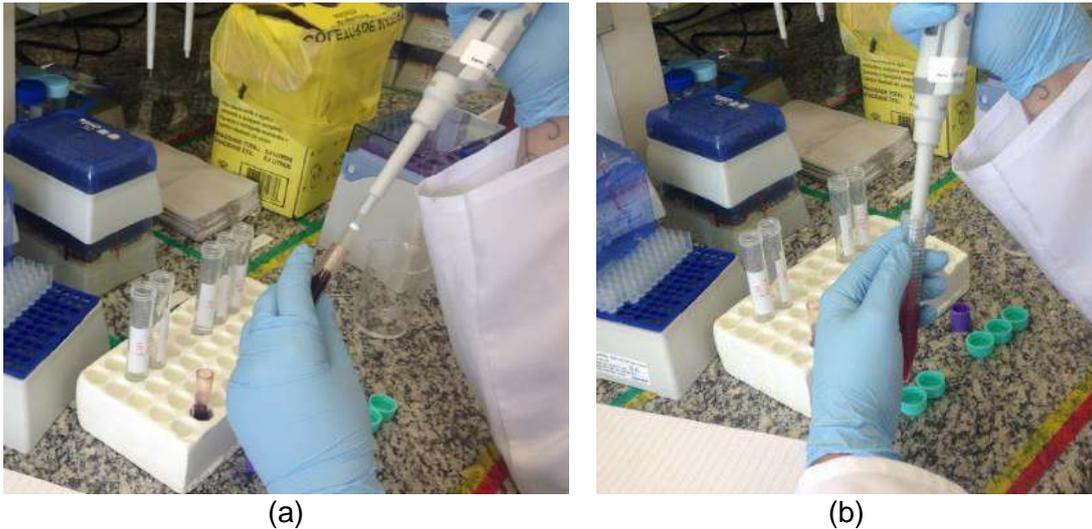


Figura 6.8: (a) Pipetando o sangue total e (b) adicionando o material biológico ao tubo contendo PBS na quantidade previamente calculada.

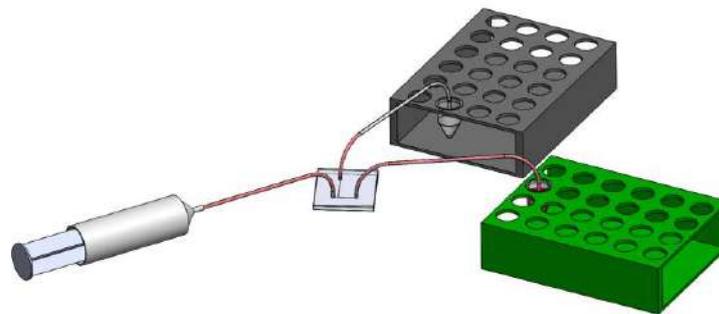
A amostra já pronta para ser aplicada no microsseparator é mostrada na Figura 6.9 nas concentrações de 5%, 10% e 16% de hematócritos, baseado no resultado do hemograma completo obtido pelo analisador hematológico.



Figura 6.9: Amostras já diluídas armazenadas em tubo tipo falcon e com as porcentagens de hematócritos identificadas em 5%, 10% e 16%.

De posse das amostras preparadas, foi então arrumada a bancada experimental para que o material biológico fosse separado. A bancada experimental continha uma bomba de seringa setada numa vazão de 0,150 mL/min, uma seringa de 10 mL com

diâmetro interno de 16 mm, microseparador, apoio para o dispositivo e para os microtubos de 2 mL onde foram coletadas as separações, mostrada de forma esquemática na Figura 6.10a e a montagem da bancada propriamente dita na Figura 6.10b.



(a)



(b)

Figura 6.10: Bancada experimental para a microseparação do material biológico diluído, (a) desenho esquemático e (b) a bancada em si.

Durante a microseparação foi observada a separação entre as hemácias e plasma no canal menor, como está destacado na Figura 6.11.

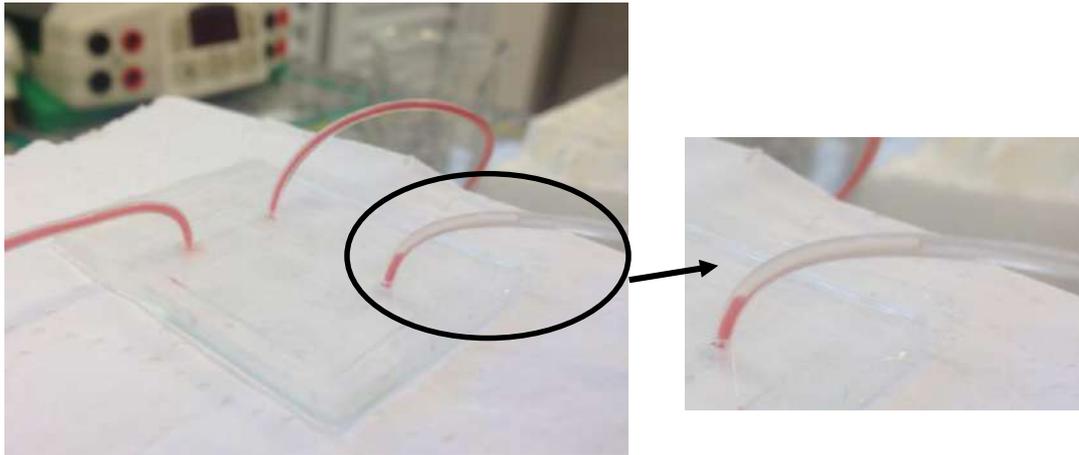


Figura 6.11: Separação entre hemácias e plasma podendo ser observada na saída do canal menor.

Após então a microseparação, obteve-se nos microtubos os materiais separados, como mostrados na Figura 6.12.



Figura 6.12: Resultado da microseparação de sangue humano para 5% de hematócitos.

Esse material separado foi levado novamente ao analisador hematológico para quantizar as partículas separadas em ambas as saídas para posteriormente quantificar a sua eficiência (η) pelo cálculo mostrado na Equação 3.23.

6.4 Uso do microdispositivo em sangue canino

O microdispositivo desenvolvido no presente estudo também foi utilizado para microseparar sangue canino. Foram coletadas amostras de sangue de uma fêmea Shih tzu de 4 anos e armazenado dentro de um frasco que continha o anticoagulante EDTA.

Posteriormente foram seguidos os mesmos procedimentos realizados em amostras de sangue humano. Após a coleta, as amostras foram levadas a um analisador hematológico automatizado para obter os parâmetros de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos, plaquetas e demais componentes do sangue canino. O hemograma realizado na amostra de sangue da fêmea Shih tzu está apresentado na Figura 6.13.



Figura 6.13: Resultado do hemograma do sangue canino de uma fêmea da raça Shih tzu de 4 anos de idade.

O sangue obtido foi diluído com solução de PBS, assim como foi realizado com sangue humano, para preparar amostras de sangue no nível desejado de hematócrito, ou seja, 10%.

Os microseparadores usados foram fabricados em PDMS e UA, assim como os utilizados para sua verificação com sangue humano. Essa fase da pesquisa foi desenvolvida em duas partes, ambas utilizando microseparadores fabricados em UA e PDMS, com 3 repetições de 2 mL. A primeira consistia em utilizar microseparadores de 400 µm de entrada e na bifurcação maior, 100 µm de largura na bifurcação menor e 50 µm de altura padrão com tempo de residência de 0,081 s com vazão de 0,150 mL/min ($2,5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s}$). Na segunda etapa, foi mantido o tempo de residência, mas foi alterado o microdispositivo utilizado, com vazão de 0,128 mL/min ($2,14 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s}$) e um volume

na entrada de 400 μm menor, cujo dispositivo apresenta barreiras na entrada, apresentado na Figura 3.7.

A bancada experimental montada para essa análise de eficiência do microdispositivo fabricado em PDMS e UA, aplicado a sangue canino é mostrada na Figura 6.14, os mesmos equipamentos utilizados com amostras de material biológico humano, mostrada esquematicamente na Figura 6.10a.

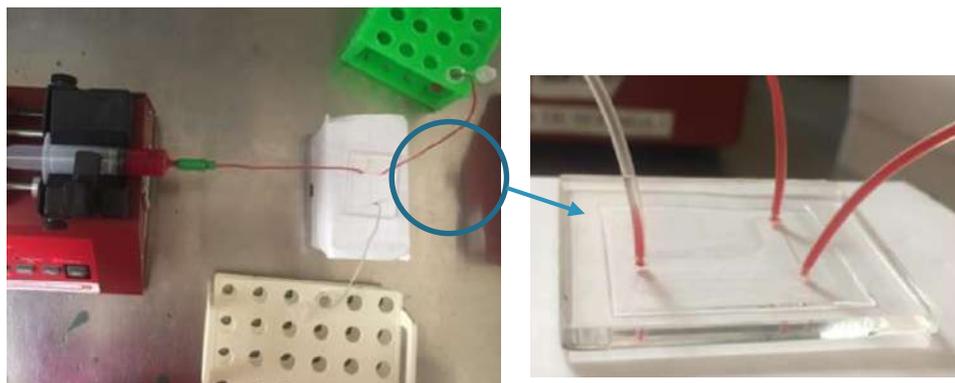


Figura 6.14: Bancada experimental montada para sangue canino.

A visualização da diferença de separação ocorrida entre os microdispositivos fabricados em PDMS e UA mesmo tempo de residência, porém diferentes vazões podem ser verificadas na Figura 6.15.



Figura 6.15: Resultado da separação entre microdispositivos fabricados em UA e PDMS.

Todas as amostras utilizadas no presente estudo, sangue humano e sangue canino, foram colhidas dos doadores momentos antes do experimento, armazenada em tubos que continham anticoagulate EDTA, analisadas com analisador hematológico automatizado, diluídas com base na quantidade de hematócritos usando a mesma solução salina (PBS), para assim garantir que componentes ou equipamentos pudessem influenciar os resultados.

7. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente capítulo são apresentados os resultados do estudo teórico realizado com a ferramenta computacional COMSOL para os diferentes ângulos entre os microcanais bifurcados, a simulação para o microdispositivo projetado e também com as geometrias obtidas após a fabricação com os polímeros UA e PDMS, para posterior comparação entre os valores de velocidade média, pressão e eficiência de separação.

Na parte experimental são apresentados os valores perfil de velocidade para o microseparador fabricado em PDMS, balanço de massa para os microseparadores fabricados em PDMS e UA, microseparação com sangue humano e canino.

7.1 Resultado Teórico

Depois de realizada a análise de convergência pode-se então passar para a análise física da simulação computacional do escoamento no microseparador. Para isso foi usada a malha 5 (Tabela 4.3) para calcular os valores de velocidade e pressão, visto que a diferença entre ela e a malha 6 apresenta um elevado tempo computacional e não resultando em grande erro entre os valores obtidos no estudo em ambos *studys*, mas principalmente as duas se encontram convergidas.

Utilizando a malha 5, a qual estava já refinada para o presente estudo, foi então verificado o quanto o ângulo entre as bifurcações pode influenciar na eficiência de separação. Os ângulos estudados foram: 5°, 10° a 40°, 45°, 50° a 90°, como mostrado na Figura 4.7.

Para este estudo de eficiência de separação, foi usado como base uma quantidade de $4,5 \cdot 10^6$ de hemácias por microlitro de sangue total o qual corresponde

aproximadamente 42% de hematócritos. O escoamento não foi estudado com 100% de hematócritos, pois isso seria o sangue somente em sua parte sólida. Esse dado foi retirado da literatura, o qual se baseou em dados de hemogramas de 20 homens e 20 mulheres com idade entre 20 a 40 anos de idade (Renato Failace, 2015). Com base em dados da literatura, chegou-se a quantidade de que $0,54 \cdot 10^6$ hemácias por microlitro para 5% de diluição; $1,07 \cdot 10^6$ hemácias por microlitro para a diluição de 10% e $1,71 \cdot 10^6$ hemácias por microlitrara a diluição de 16%. Esses dados foram inseridos no COMSOL quando realizado o “*study*” do escoamento com partículas, inserido também a densidade do sangue (1060 kg/m^3) e viscosidade sanguínea ($0,04 \text{ Pa.s}$), dados apresentados na Tabela 4.2.

Com as diferentes angulações entre os canais bifurcados, a eficiência de separação aumentava a medida que o ângulo também aumentava, apresentando a maior eficiência para o ângulo de 90° . Isso pode ser observado na Figura 7.1 para as diluições de 5%, 10% e 16% e ângulos variando entre 5° , 10° a 40° , 45° , 50° a 90° . Para todos esses ângulos a vazão de entrada foi de $0,150 \text{ mL/min}$ e a eficiência de separação foi calculada utilizando a Equação 3.18. A medida que o ângulo entre as bifurcações diminui o gradiente de pressão vem a sofrer um aumento. Isso implica que a partícula tende a se mover para a bifurcação com menor diâmetro hidráulico, em vez de entrar no canal de maior vazão (Zoltán Fekete, et al., 2011) fazendo assim baixar sua eficiência. A Tabela apresentada no apêndice 1, mostra os valores de velocidade, vazão e pressão verificados para cada ângulo estudado, com um número fixo de partículas (5% de hematócritos) e três diferentes velocidades médias de entrada: $0,0625 \text{ m/s}$, $0,125 \text{ m/s}$ e $0,25 \text{ m/s}$. Nesta Tabela apresentada no apêndice 1, podemos verificar que quanto menor o ângulo entre os canais bifurcados, o aumento do gradiente de pressão se confirma, como observado na Figura 7.2.

Essa variação da pressão, mostrado na Figura 7.2, não depende da velocidade de entrada, apenas do ângulo formado entre os canais e saída.

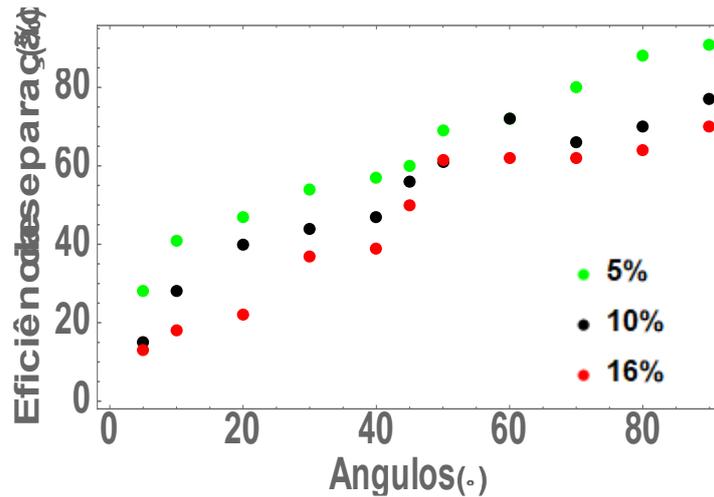


Figura 7.1: Eficiência de separação relacionado com os ângulos entre os canais bifurcados e porcentagem de diluição da amostra com base na quantidade de hematócritos.

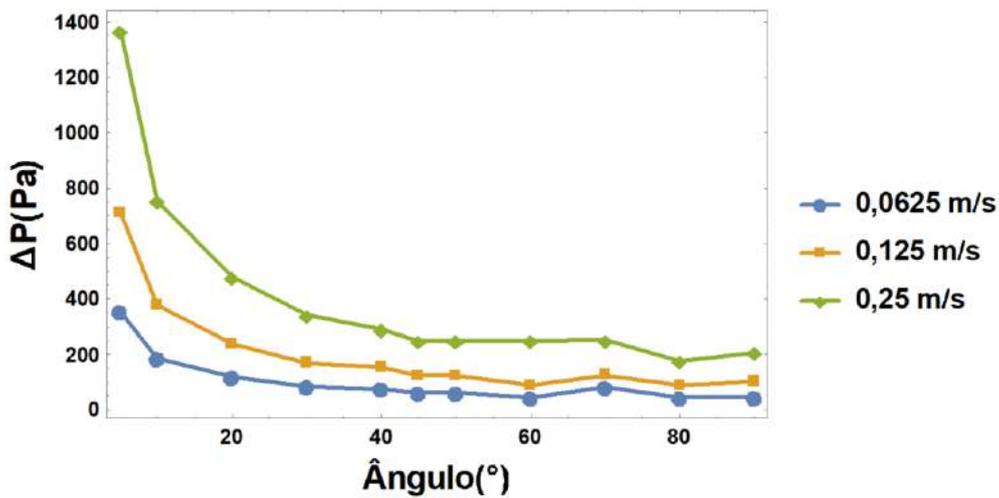


Figura 7.2: Variação da pressão, em Pa, entre o canal de entrada e o canal de saída de maior diâmetro hidráulico, ou seja, saída da bif. maior.

Uma análise da velocidade média na entrada também foi estudada teoricamente. Foi fixado o ângulo de 90°, pois mostrou-se a mais eficiente, com a uma solução de 5% de hematócritos, pois simula-se com uma quantidade menor de partículas e assim diminuindo o tempo computacional e variada a velocidade média de entrada em 3 valores: 0,0625 m/s, 0,125 m/s e 0,25 m/s. Os valores estão apresentados graficamente na Figura 7.3 e na Tabela 7.1. Esses dados mostram que se diminuímos muito a velocidade, sua eficiência é afetada e o contrário também é verdadeiro.

Tabela 7.1: Valores de eficiência de separação com o ângulo de 90° e 5% de hematócritos variando a velocidade média de entrada.

Velocidade média de entrada (m/s)	Eficiência de separação (%)
0,0625	87
0,125	91
0,25	89,9

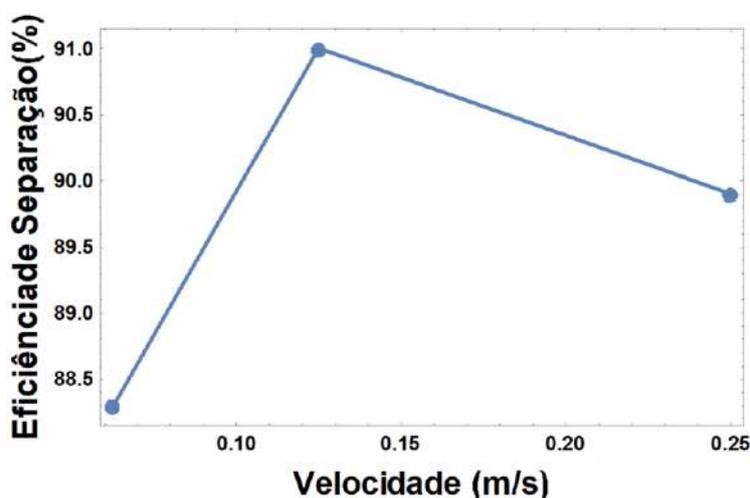


Figura 7.3: Eficiência de separação com ângulo de 90°, 5% de hematócritos e variação da velocidade média de entrada.

Os microseparadores que foram fabricados com UA e PDMS, apresentaram uma pequena diferença com as dimensões projetadas e para o molde em PMMA. Essas novas dimensões foram levadas em consideração e também foram simuladas utilizando o COMSOL, com a média de suas larguras obtidas na leitura 3D. Primeiramente foi gerada a malha com um número de elementos de 32163426 para o microseparador fabricado em UA (Figura 7.4) e de 35143979 para o microseparador fabricado em PDMS (Figura 7.5). Esses microdispositivos, que foram apresentados detalhadamente no capítulo anterior, os seus valores de velocidade e pressão estão apresentados nas Tabelas 7.2 e Tabela 7.3, considerando o sangue como fluido, analisados nos pontos assinalados na Figura 4.12, cujos pontos já foram analisados previamente para as dimensões projetadas no AutoCad. Os valores apresentados nas Tabelas 7.2 e 7.3 tiveram como dados de entrada os valores apresentados na Tabela 4.2: Propriedades e dados de entrada dos fluidos no sistema para estudo teórico.

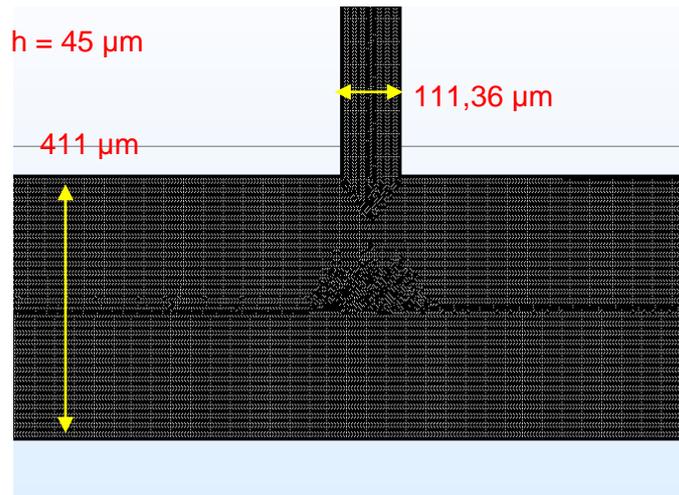


Figura 7.4: Estudo teórico as dimensões do para o microseparador fabricado em UA.

Tabela 7.2: Valores de velocidade média, vazão, pressão nos pontos ($-0,01$) mm $\leq x \leq 0,1$ mm e $0,01$ mm $\leq y \leq 0,4$ mm e $z=0,025$ mm e Re encontrados no estudo teórico para as dimensões do microdispositivo fabricado com UA, utilizando o sangue como fluido.

	Velocidade (m/s)	Vazão (mL/min)	Pressão (Pa)	Re
Entrada	0,174	0,170	1592,2	0,34
B. Maior	0,170	0,203	1431,6	0,40
B. Menor	0,032	0,010	1530,8	0,06

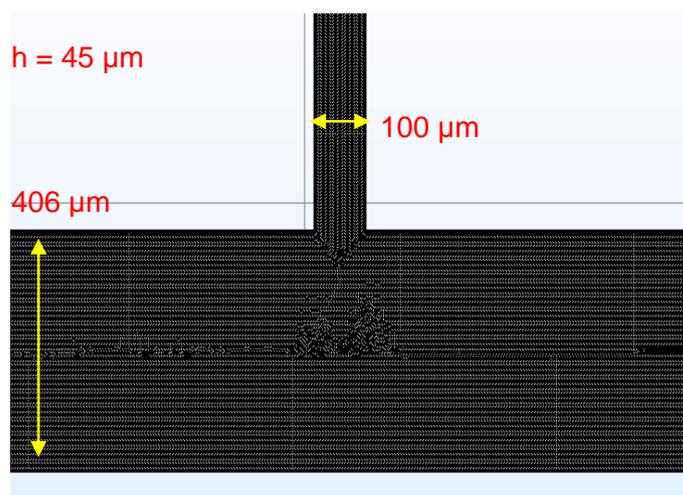


Figura 7.5: Estudo teórico para as dimensões do microseparador com fabricado em PDMS.

Tabela 7.3: Valores de velocidade média, vazão, pressão nos pontos ($-0,01$) mm $\leq x \leq 0,1$ mm e $0,01$ mm $\leq y \leq 0,4$ mm e $z=0,025$ mm e Re encontrados no estudo teórico para as dimensões do microdispositivo fabricado com PDMS, utilizando sangue como fluido.

	Velocidade (m/s)	Vazão (mL/min)	Pressão (Pa)	Re
Entrada	0,176	0,207	1596,7	0,40
B. Maior	0,1723	0,208	1435,0	0,40
B. Menor	0,029	$9 \cdot 10^{-3}$	1514,1	0,05

As comparações entre o estudo teórico para os valores de velocidade e pressão para o microdispositivo projetado, microdispositivos fabricados com polímeros levando em consideração as novas geometrias, estão apresentados na Tabela 7.4 e representados graficamente na Figura 7.6 para os valores de velocidade (m/s) e Figura 7.7 para os valores de perda de carga (Pa).

Tabela 7.4: Valores de velocidade e pressão para o microdispositivo projetado, novas dimensões dos microseparadores fabricados em PDMS e UA.

Microcanais	Projetado		Fabricado em PDMS		Fabricado em UA	
	V (m/s)	Pressão (Pa)	V (m/s)	Pressão (Pa)	V (m/s)	Pressão (Pa)
Entrada	0,179	1300,0	0,176	1596,7	0,174	1592,2
Bif. Maior	0,176	1195,6	0,1723	1435,0	0,170	1431,6
Bif. Menor	0,026	1262,5	0,029	1514,1	0,032	1530,8

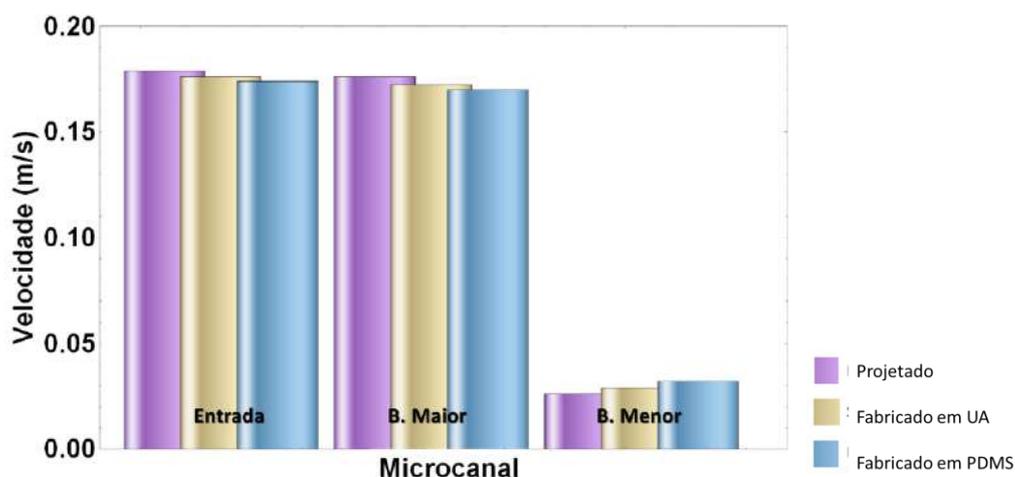


Figura 7.6: Valores de velocidade para os microcanais projetados, fabricados em UA e PDMS.

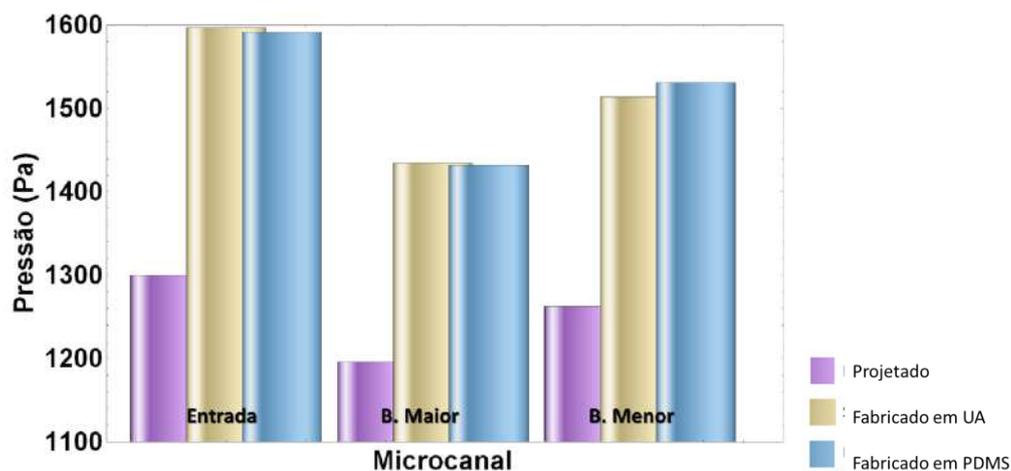


Figura 7.7: Valores de pressão para os microcanais projetados, fabricados em UA e PDMS.

Utilizando a Equação 3.15, as geometrias obtidas dos microseparadores fabricados com os polímeros, mostram que a proporção das vazões do microdispositivos em UA ficou em 52,7:1 e em PDMS 45,3:1.

Como sabemos o valor da vazão, diâmetro hidráulico de cada microcanal e sua velocidade média, podemos calcular o comprimento da entrada hidrodinâmica, o qual é o comprimento necessário para o fluxo se desenvolver, ou seja, depois deste comprimento a velocidade para variar com a direção principal do escoamento. Considerando o escoamento como laminar devido ao cálculo do número de Reynolds, o comprimento da região de entrada hidrodinâmica pode ser estimado pela seguinte correlação de duto de seção retangular (Robert W.Fox, 2001) para Re menor de 2300:

$$L_h \approx 0,054 \times Re \times D_H \quad (7.1)$$

onde L_h é o comprimento da entrada hidrodinâmica, Re é o número de Reynolds e D_H é o diâmetro hidráulico, cujo resultado está apresentado na Tabela 7.5 para o microseparador fabricado em UA e Tabela 7.6 para o microseparador fabricado em PDMS.

Tabela 7.5: Cálculo do comprimento da entrada hidrodinâmica para o microseparador fabricado em UA, sem barreiras.

Pontos	Velocidade (m/s)	Re	$D_{Hidr} (\mu m)$	$L_h (\mu m)$
Entrada	0,174	0,34	72,90	1,33
Bif. Maior	0,170	0,40	88,03	1,90
Bif. Menor	0,032	0,06	68,16	0,22

Tabela 7.6: Cálculo do comprimento da entrada hidrodinâmica para o microseparador fabricado em PDMS, sem barreiras.

Pontos	Velocidade (m/s)	Re	$D_{Hidr} (\mu m)$	$L_h (\mu m)$
Entrada	0,176	0,40	86,24	1,86
Bif. Maior	0,172	0,40	88,48	1,91
Bif. Menor	0,029	0,05	66,67	0,18

Após a fabricação, as dimensões obtidas foram levadas em consideração e voltando a etapa de estudo teórico, foram simuladas. Com os valores apresentados podemos notar que essas novas dimensões não afetam substancialmente os valores de velocidade média do canal e pressão.

7.2 Resultados da Fabricação dos Microcanais

7.2.1 Molde em PMMA

Obtido o molde fabricado em PMMA com a microfresa, vem então a etapa de caracterização geométrica. Após realizadas de 3 a 5 medidas nos pontos pré-determinados ao longo do microseparador como mostrado na Figura 5,14, medidas de largura (Tabelas 7.7) e profundidade obtidas por visualização 3D (Tabela 7.8) foram realizadas no molde fabricado em PMMA e usados para calcular média e desvio padrão (σ).

Tabela 7.7: Medidas de largura realizadas no molde em PMMA na entrada, bif. maior e bif. menor, comparando com as medidas apresentadas na Tabela 5.2.

Medida	Entrada (400 μm)	Bif. Maior (400 μm)	Bif. Menor (100 μm)
1	404,5	385,2	111,6
2	404,5	385,2	111,6
3	399,9	385,2	109,0
4	400,7	385,2	110,9
5	399,6	385,2	110,3
6	404,9	385,2	111,5
7	404,1	384,8	111,6
8	403,7	384,8	109,4
9	403,7	384,8	109,4
10	399,9	384,8	110,9
Média	402,55	385,04	110,62
σ	2,22	0,21	1,03
Diferença com a projetada (μm)	2,55	14,96	10,62

Tabela 7.8: Medidas de profundidade realizadas no molde em PMMA na entrada, bif. maior e bif. menor, comparando com as medidas apresentadas na Tabela 5.2.

Medida	Entrada (50 μm)	Bif. Maior (50 μm)	Bif. Menor (50 μm)
1	48,4	46,3	50,9
2	45,6	46,3	50,9
3	43,7	46,3	50,9
4	43,5	46,3	50,9
5	43,5	46,3	50,9
6	43,5	46,3	50,9
7	45,8	46,3	50,9
8	45,8	46,3	50,9
9	45,8	46,3	50,9
10	44,9	46,3	50,9
Média	45,05	46,3	50,9
σ	1,57	0	0
Diferença com a projetada (μm)	4,95	3,70	0,90

Essas diferenças apresentadas se deve ao fato de que a fabricação do molde apresentar algum erro ao fazer o refinamento da peça no final do processo.

7.2.2 Microdispositivo fabricado em UA

Com a etapa da fotolitografia concluída, veio a caracterização geométrica do microcanal obtido após a lavagem. As medidas das dimensões de largura foram realizadas ao longo de todo microseparador, como pontos coincidentes ao do molde fabricado em PMMA. As Figura 7.8abc (apenas exemplos de um dos pontos mais próximos da região de bifurcação), mostram exemplos de medidas realizadas na largura de um dos pontos apresentados para a entrada, bifurcação maior e bifurcação menor, respectivamente. De posse dos valores das medidas de larguras em todos os microcanais, foi montada a Tabela 7.9 e calculada a média e desvio padrão, assim como realizado para a caracterização do molde.

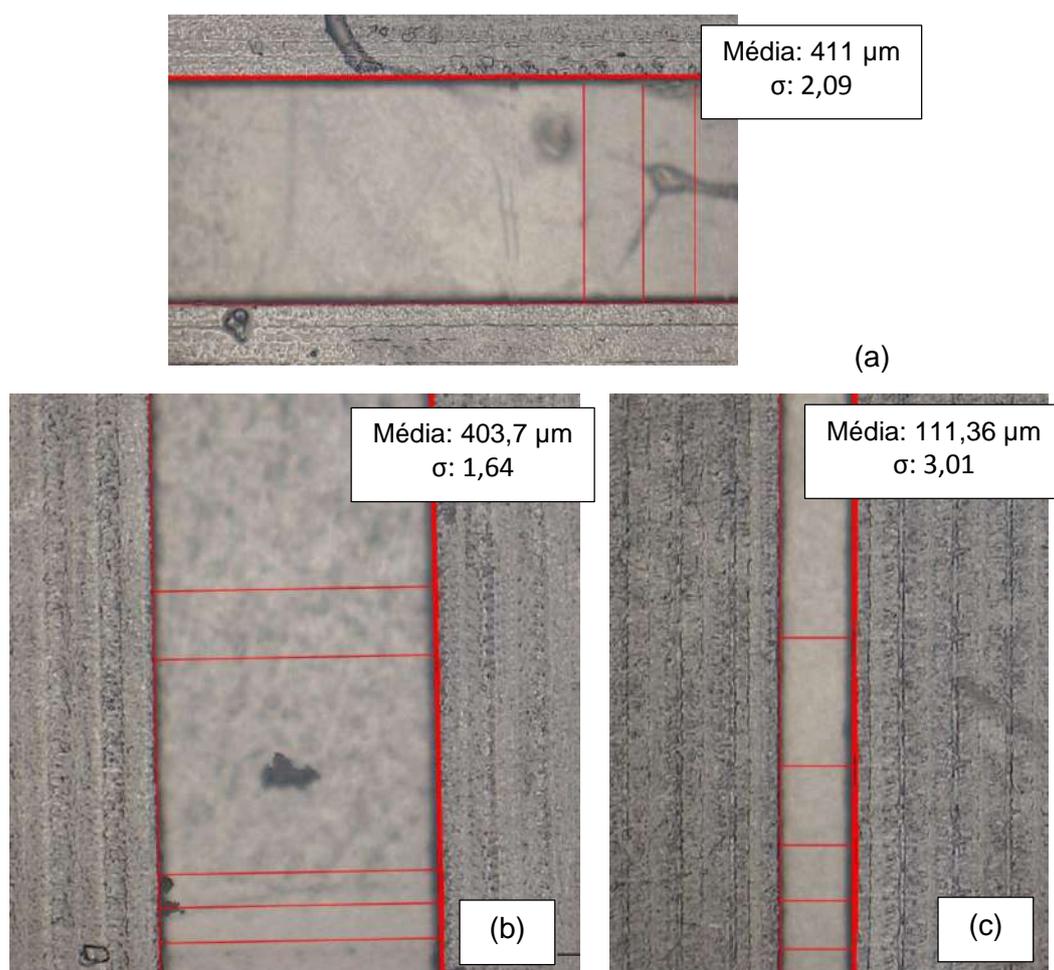


Figura 7.8: Medidas de largura do microseparador em UA: (a) entrada de 400 μm , (b) bif. maior de 400 μm (saída de células) e (c) bif. menor de 100 μm (saída de plasma) quais são apresentadas na Tabela 3.2.

Com os resultados apresentados na Tabela 7.9, encontrou-se uma dimensão média de largura para entrada de 411 μm , para a saída menor de 111,36 μm e saída maior de 403,7 μm com desvio padrão, de 2,09 μm ; 3,01 μm e 1,64 μm respectivamente. As diferenças das medidas obtidas entre o projetado e os microseparadores confeccionados com molde de PMMA foram de 11 μm para a entrada; 3,7 μm para a saída maior e 11,36 μm para a saída menor. Essas diferenças encontradas são justificadas pela dificuldade de encontrar o zero da ferramenta da microfresa, ou seja, de posicionar a fresa de pequena dimensão, 50 μm , sobre a superfície faceada da placa em acrílico, o qual é transparente, dificultando seu posicionamento e um somatório a esse erro, pode ser o mau posicionamento das linhas de medidas no microscópio Hirox e uma baixa temperatura da UA quando depositada no molde.

Tabela 7.9: Resultado das medições de largura do microdispositivo fabricado em UA, como apresentado na Tabela 3.2, com a média e desvio padrão (σ).

Medida	Entrada (400 μm)	Bif. Maior (400 μm)	Bif. Menor (100 μm)
1	412	403	115,90
2	411	401	113,19
3	414	403	114,27
4	413	405	114,27
5	411	404	111,02
6	412	404	107,23
7	407	406	114,27
8	408	406	111,02
9	409	403	103,98
10	411	402	108,52
Média	411	403,7	111,36
σ	2,09	1,64	3,01
Diferença com a projetada (μm)	11	3,7	11,36

Uma comparação entre as dimensões das larguras dos microcanais projeto no AutoCad e o molde fabricado pela microfresa e o moldado em UA são apresentados na Tabela 7.10.

Tabela 7.10: Comparação da largura da entrada para o microdispositivo projetado em AutoCad, fabricado em PMMA e moldado em UA.

Largura Projetada	Largura medida no Molde PMMA	Largura medida no dispositivo em UA
Entrada (400 μm)	402,55 \pm 2,22	411,0 \pm 2,9
Bif. Maior (400 μm)	385,04 \pm 0,21	403,7 \pm 1,64
Bif. Menor (100 μm)	110,65 \pm 1,03	111,36 \pm 3,01

Essa diferença entre os resultados de altura entre o medido e do projetado se deve ao fato da viscosidade do fotopolímero UA, manuseio do microscópio para as medições e elevações no molde.

Para medição da profundidade dos canais foi necessário gerar uma imagem em 3D no software do *Hirox Digital Microscope* dos canais do microseparador fabricado com o polímero UA, como mostradas nas Figuras 5.30 a 5.32, onde o plano em amarelo representa a seção do canal onde será extraído o perfil tridimensional.

O resultando na disparidade de 10,27 μm para a entrada; 0,63 μm para a saída maior e 0,92 μm para a saída menor. Como visto na Tabela 7.11 abaixo, para os resultados de profundidade encontrou-se uma média para entrada de 39,73 μm , para a saída menor de 49,08 μm e saída maior de 49,37 μm com desvio padrão respectivamente, de 1,62 μm ; 2,96 μm ; e zero.

Tabela 7.11: Medidas de profundidade no microseparador projetado, apresentado na Tabela 3.2, média e desvio padrão (σ) calculados para o microdispositivo em UA.

Medida	Entrada (50 μm)	Saída Maior (50 μm)	Saída Menor (50 μm)
1	40,46	49,37	51,26
2	40,46	49,37	51,26
3	40,46	49,37	51,26
4	40,46	49,37	51,26
5	40,46	49,37	51,26
6	40,46	49,37	51,26
7	40,46	49,37	49,00
8	40,46	49,37	45,99
9	38,36	49,37	44,83
10	35,24	49,37	43,45
Média	39,73	49,37	49,08
σ	1,62	0	2,96
Diferença com a projetada (μm)	10,27	0,63	0,92

Uma comparação entre as dimensões de altura na entrada entre o microdispositivo projetado no AutoCad e o molde fabricado pela microfresa e o moldado em UA, são apresentados na Tabela 7.12.

Tabela 7.12: Comparação da largura para o microdispositivo projetado em AutoCad, fabricado em PMMA e moldado em UA.

Altura Projetada	Altura medida no molde PMMA	Altura medida no dispositivo em UA
Entrada (50 μm)	45,05 \pm 1,57	39,73 \pm 1,62
Bif. Maior (50 μm)	46,3 \pm 0	49,37 \pm 0
Bif. Menor (50 μm)	50,9 \pm 0	49,08 \pm 2,96

Diante das novas dimensões apresentados após a fotolitografia, novos valores de diâmetro hidráulico, resistência hidráulica, vazão, velocidade do fluido no canal e número de Reynolds são calculados e apresentados na Tabela 7.13.

Tabela 7.13: Novos valores de diâmetro hidráulico, resistência hidráulica, vazão, velocidade e número de Re para os microseparadores fabricados com a UA, usando como base os valores apresentados nas Tabelas 7.11 e 7.13.

μcanal	Largura (μm)	Compr. (mm)	Altura (μm)	Q (mL/min)	D_H (μm)	$R_{\text{Hidri.}}$ (Pa.s/m ³)	V (m/s)	Re
Entrada	411 \pm 2,1	10	39,7 \pm 1,7	0,150	72,90	1,96.10 ¹⁴	0,153	0,29
B. maior	403,7 \pm 1,6	2	49,4 \pm 0	0,146	88,03	2,14.10 ¹³	0,122	0,28
B. menor	111,4 \pm 3	20	49,1 \pm 3	0,004	68,16	1,01.10 ¹⁵	0,012	0,022

7.2.3 Microdispositivo fabricado em PDMS

De posse dos microcanais fabricados em PDMS, os valores das medidas de larguras obtidas no microscópio 3D. A Tabela 7.14 mostra os valores de 10 pontos medidos ao longo do dispositivo, cálculo da média e desvio padrão, assim como realizado para a caracterização do molde em acrílico e do microdispositivo fabricado em UA.

Tabela 7.14: Resultado das medições de largura do microdispositivo fabricado em PDMS, como apresentado na Tabela 3.2, com a média e desvio padrão (σ) calculados.

Medida	Entrada (400 μm)	Bif. Maior (400 μm)	Bif. Menor (100 μm)
1	404	405	98
2	401	408	98
3	410	403	98
4	408	410	94
5	408	410	99
6	405	409	102
7	409	404	102
8	407	402	101
9	405	407	105
10	405	405	103
Média	406,2	406,3	100
σ	2,7	2,9	3,2
Diferença com a projetada (μm)	6,2	6,3	0

Com os resultados apresentados na Tabela 7.15, encontrou-se uma dimensão média de largura para entrada de 406,2 μm , para a saída menor de 100 μm e saída maior de 406,3 μm com desvio padrão, de 2,6998 μm ; 2,9078 μm respectivamente. As diferenças das medidas obtidas entre o projetado e os microseparadores confeccionados com molde de PMMA foram de 6,2 μm para a entrada; 6,3 μm para a saída maior. As diferenças encontradas são justificadas pela dificuldade encontrada no momento da microusinagem, ou seja, de posicionar a fresa de pequena dimensão, 50 μm , sobre a superfície faceada da placa em acrílico, o qual é transparente, dificultando seu posicionamento e um somatório a esse erro, pode ser o mau posicionamento das linhas de medidas no microscópio Hirox.

Uma comparação entre as dimensões das larguras dos microcanais projeto no AutoCad, o molde fabricado pela microfresa e o moldado em PDMS, são apresentados na Tabela 7.15 para a largura da entrada.

Tabela 7.15: Comparação da largura para o microdispositivo projetado em AutoCad, fabricado em PMMA e moldado em PDMS.

Largura Projetada no AutoCad	Largura do molde fabricado em PMMA	Largura do microdispositivo em PDMS
Entrada (400 μm)	402,55 \pm 2,2	406,2 \pm 2,7
Bif. Maior (400 μm)	385,04 \pm 0,2	406,3 \pm 2,9
Bif. Menor (100 μm)	110,65 \pm 1,0	100 \pm 3,2

Para medição da profundidade dos canais foi necessário gerar uma imagem em 3D no software do *Hirox Digital Microscope* dos canais do microseparador fabricado em PDMS, assim como foi realizado para o molde e o dispositivo em UA, como mostradas nas Figuras 5.50 a 5.52, onde o plano em amarelo representa a seção do canal onde será extraído o perfil tridimensional.

Essa diferença entre os resultados de altura entre o medido utilizando o Hirox e do projetado se deve ao fato de uma dificuldade no manuseio do microscópio para as medições e elevações no microdispositivo fabricado em PDMS devido a sua transparência. Como visto na Tabela 7.16 abaixo, para os resultados de profundidade encontrou-se uma média para entrada de 48,423 μm , para a saída menor de 51,51 μm e saída maior de 49,65 μm com desvio padrão de 5,71 μm , 1,8969 μm e zero, respectivamente.

Tabela 7.16: Medidas de profundidade no microseparador projetado, apresentado na Tabela 3.2, média e desvio padrão (σ) calculados para o microdispositivo em PDMS.

Medida	Entrada (50 μm)	Saída Maior (50 μm)	Saída Menor (50 μm)
1	51,12	49,65	52,39
2	51,12	49,65	52,39
3	51,12	49,65	52,39
4	51,12	49,65	52,39
5	51,12	49,65	52,39
6	51,12	49,65	52,39
7	51,12	49,65	52,39
8	51,12	49,65	52,39
9	36,52	49,65	48,83
10	38,75	49,65	47,15
Média	48,423	49,65	51,51
σ	5,7	0	1,9
Diferença com a projetada (μm)	1,577	0,35	1,51

Uma comparação entre as dimensões de altura na entrada entre o microdispositivo projeto no AutoCad, o molde fabricado pela microfresa e o moldado em PDMS, são apresentados na Tabela 7.17.

Tabela 7.17: Comparação da largura para o microdispositivo projetado em AutoCad, fabricado em PMMA e moldado em PDMS.

Altura Projetada (50 μm)	Altura medida no molde PMMA	Altura medida no dispositivo em UA
Entrada	45,05 \pm 1,6	48,423 \pm 1,577
Bif. Maior	46,3 \pm 0	49,65 \pm 0
Bif. Menor	45,05 \pm 1,6	51,51 \pm 1,9

Diante das novas dimensões apresentados após a fotolitografia e obtidas pelo microscópio 3D, novos valores de diâmetro hidráulico, resistência hidráulica, vazão, velocidade do fluido no canal e número de Reynolds são calculados e apresentados na Tabela 7.18.

Tabela 7.18: Novos valores de diâmetro hidráulico, resistência hidráulica, vazão, velocidade e número de Re para os microseparadores fabricados com PDMS, usando como base os valores apresentados nas Tabelas 5.11 e 5.13.

μcanal	Largura (μm)	Compr. (mm)	Altura (μm)	Q (mL/min)	D_H (μm)	R_{Hidr.} (Pa.s/m³)	V (m/s)	Re
Entrada	406,2 \pm 3	10	48,24 \pm 1,6	0,150	86,24	1,1.10 ¹⁴	0,127	0,29
B. Maior	406,3 \pm 3	2	49,65 \pm 0	0,146	88,48	2,1.10 ¹³	0,120	0,28
B. Menor	100 \pm 0	20	51,51 \pm 2	0,004	66,67	1,04.10 ¹⁵	0,013	0,03

Um dos modos apropriados para comparar as dimensões dos microcanais obtidos entre os polímeros UA e PDMS com as dimensões do molde fabricado em PMMA para a largura do microcanal da entrada, bifurcação maior e bifurcação menor estão apresentadas comparativamente na Tabela 7.19 e nas Figuras 7.9 a 7.11, respectivamente.

Tabela 7.19: Comparação da largura do microdispositivo projetado em AutoCad, fabricado em PMMA e moldado em UA e PDMS.

Largura Projetada	Molde PMMA	Dispositivo em UA	Dispositivo em PDMS
Entrada (400 μm)	402,55 \pm 2,22	411,0 \pm 2,1	406,2 \pm 2,7
Bif. Maior (400 μm)	385,04 \pm 0,21	403,7 \pm 1,6	406,3 \pm 2,9
Bif. Menor (100 μm)	110,65 \pm 1,03	111,36 \pm 3,0	100 \pm 3,2

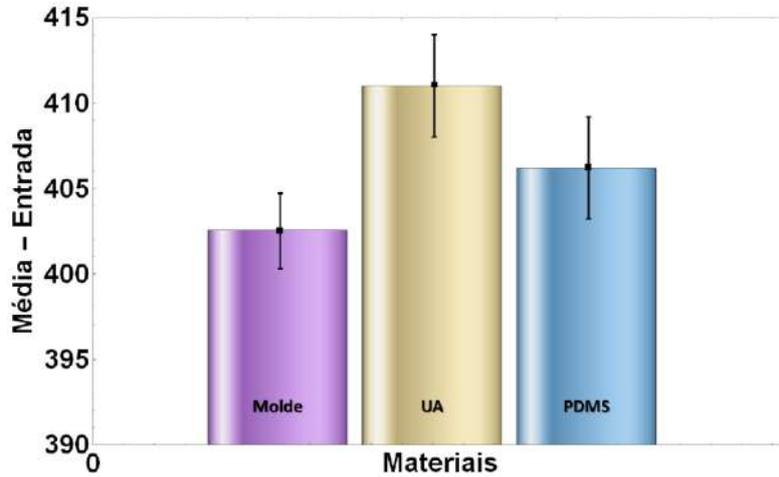


Figura 7.9: Gráfico com as medidas de largura no microcanal de entrada comparativas entre o molde fabricado em PMMA e os microcanal de entrada fabricado em UA e PDMS por fotolitografia.

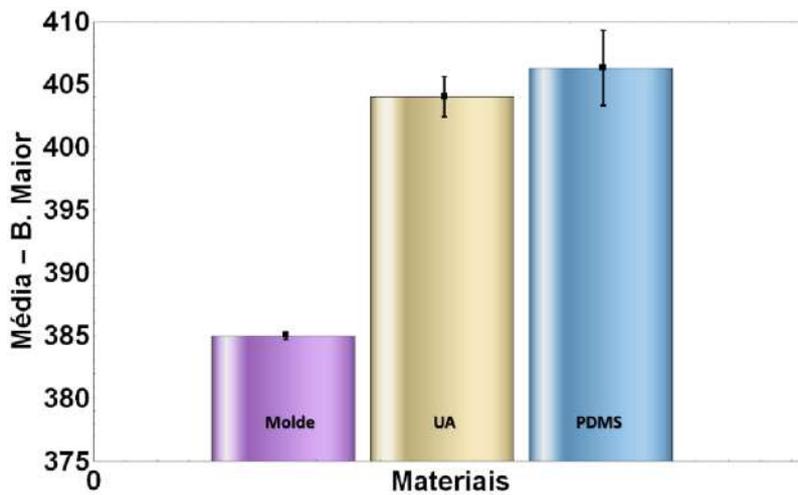


Figura 7.10: Gráfico com as medidas de largura no microcanal da bifurcação maior comparativas entre o molde fabricado em PMMA e os microcanal de entrada fabricado em UA e PDMS por fotolitografia.

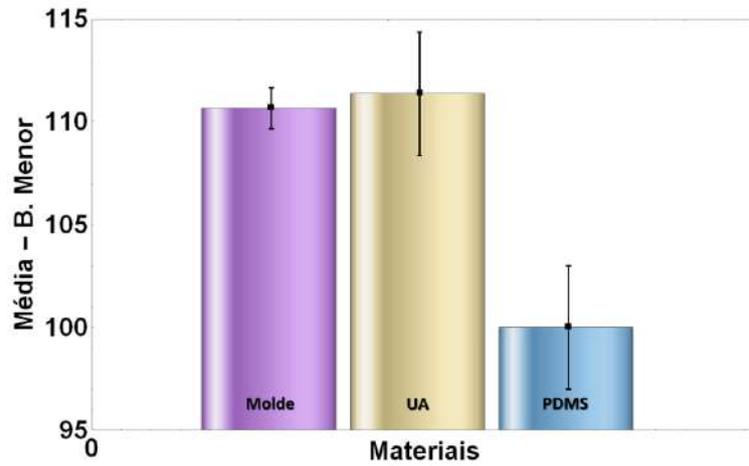


Figura 7.11: Gráfico com as medidas de largura no microcanal da bifurcação menor comparativas entre o molde fabricado em PMMA e os microcanal de entrada fabricado em UA e PDMS por fotolitografia.

Do mesmo modo, a altura dos microdispositivos podem ser comparadas entre o molde em PMMA e a fabricação com os polímeros UA e PDMS para a entrada, bifurcação maior e bifurcação menor comparativamente na Tabela 7.20 e apresentadas na Figura 7.12 a 7.14, respectivamente.

Tabela 7.20: Comparação da altura do microdispositivo projetado em AutoCad, fabricado em PMMA e moldado em UA e PDMS.

Altura Projetada (50 μm)	Molde PMMA	Dispositivo em UA	Dispositivo em PDMS
Entrada	45,05±1,6	39,73±1,6	48,24±5,7
Bif. Maior	46,3±0	49,37±0	49,65±0
Bif. Menor	50,9±0	49,08±3	51,51±2

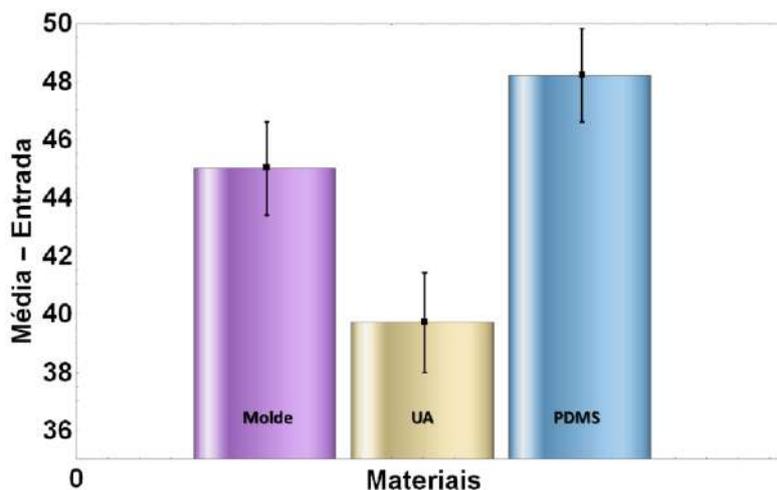


Figura 7.12: Medidas de profundidade no microcanal de entrada comparativas entre o molde fabricado em PMMA e o microdispositivo fabricado em UA e PDMS.

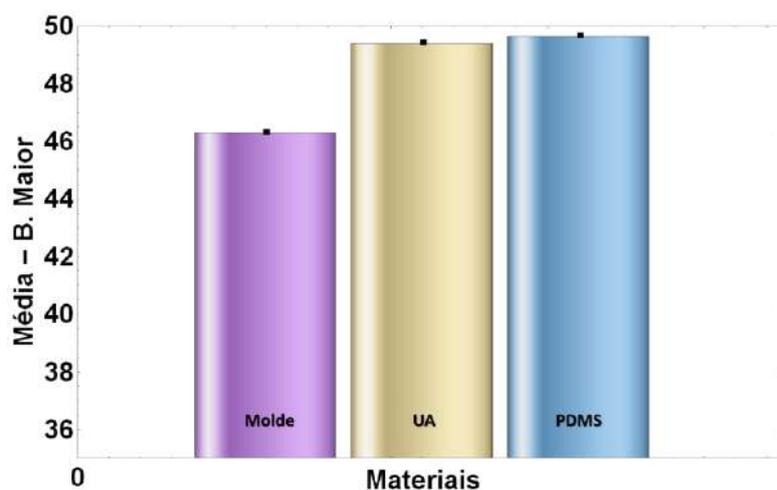


Figura 7.13: Medidas de profundidade no microcanal da bifurcação maior comparativas entre o molde fabricado em PMMA e o microdispositivo fabricado em UA e PDMS.

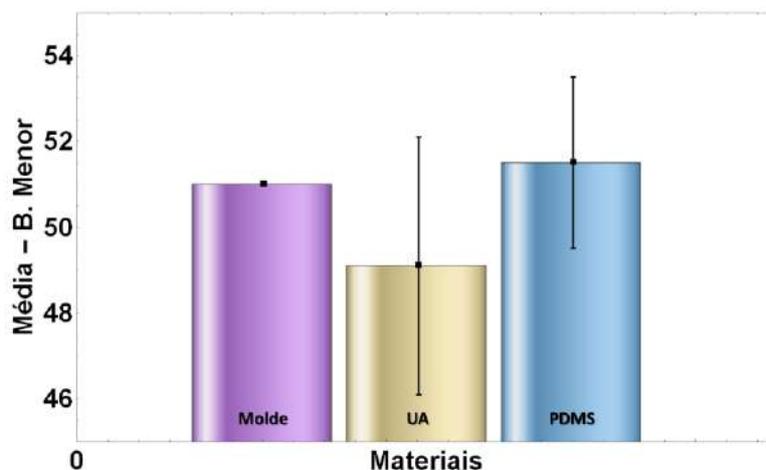


Figura 7.14: Medidas de profundidade no microcanal da bifurcação menor comparativas entre o molde fabricado em PMMA e o microdispositivo fabricado em UA e PDMS.

Dados os resultados da caracterização geométrica de altura e largura realizadas no molde em PMMA, microdispositivo em UA e microdispositivo em PDMS, nota-se uma pequena discrepância entre os valores obtidos. Isso se deve ao fato de não conseguir obter sempre os mesmos pontos no momento da localização deste no Hirox e também a viscosidade dos polímeros. Por mais que a UA foi aquecida para que essa característica fosse minimizada, em determinados pontos esse polímero de baixo custo se mostrou ainda um pouco mais afetado mas não trazendo grandes discrepâncias na média; mostrando assim que no requisito dimensão ela pode ser aplicada satisfatoriamente.

Com esses novos valores calculando novamente valores de velocidade média nos canais, diâmetro hidráulico, resistência hidráulica, vazão e número de Reynolds para verificar a diferença entre o projeto inicial e o que foi obtido após a fabricação com ambos os polímeros, os valores se diferenciam. Mas o estudo teórico mostra que isso não fará uma grande diferença no objetivo final, pois os valores de desvio padrão não são de grande ordem de grandeza.

7.3 Resultados Experimentais

7.3.1 Micro-PIV aplicado ao microdispositivo fabricado em PDMS

A técnica de velocimetria por imagem de partículas da Dantec Dynamics foi empregada para se obter o campo de velocidade do escoamento no interior do microseparador. Uma câmera de alta resolução e alta velocidade com sensor CMOS (SpeedSense M110 com resolução máxima de 1280 x 800 pixels, 12 bit de profundidade de pixel, taxa de aquisição de 1630 fps) e uma fonte contínua de luz de laser verde (532 nm, RayPower 2000), foram adaptados ao microscópio invertido (Leica Microsystems, modelo DM-IL-M-LED) para iluminar e visualizar o escoamento utilizando uma lente de ampliação de 20x. Partículas traçadoras de Rodamina (PMMA-Rhodamine B-Particles de diâmetro médio de 1 μm) foram diluídas em solução com água deionizada e injetadas

no microseparador através de uma seringa com capacidade de 10 mL. Uma bomba de seringa (a mesma utilizada para os estudos de balanço de massa e verificação sanguínea) promoveu o deslocamento do êmbolo da seringa contendo o fluido de trabalho (água deionizada e partículas traçadoras), para a vazão desejada. Aplicando-se a vazão de 0,150 mL/min, 5000 frames consecutivos do escoamento foram capturados, a uma frequência de aquisição de 4000 Hz, cuja imagem pode ser visualizada na Figura 7.15.

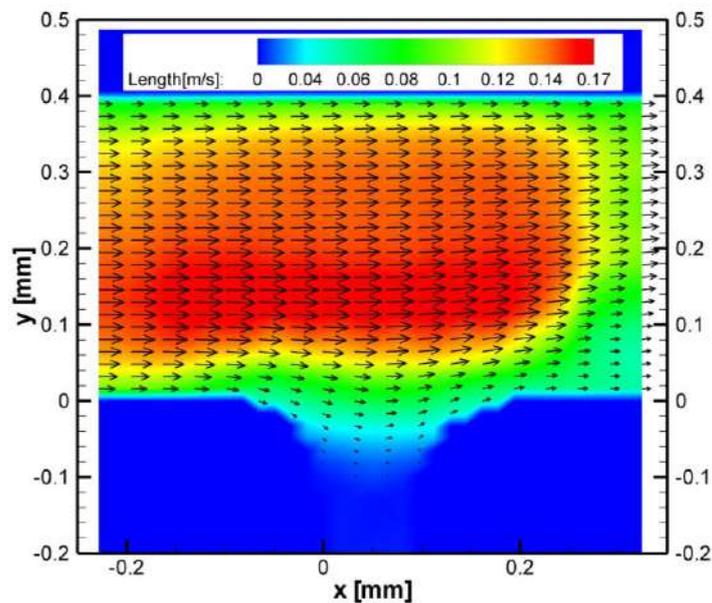
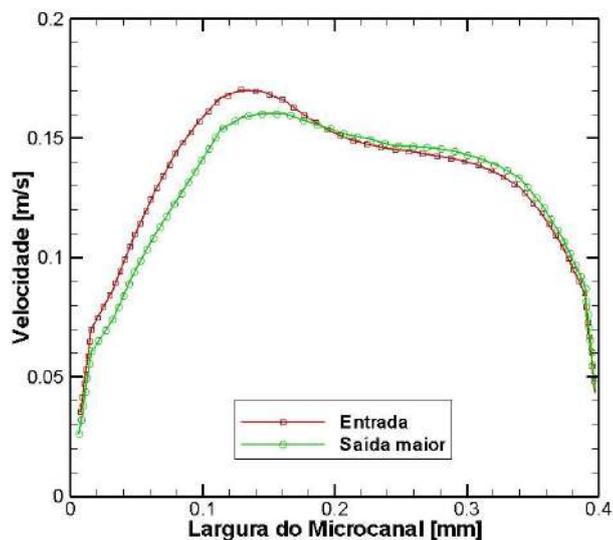


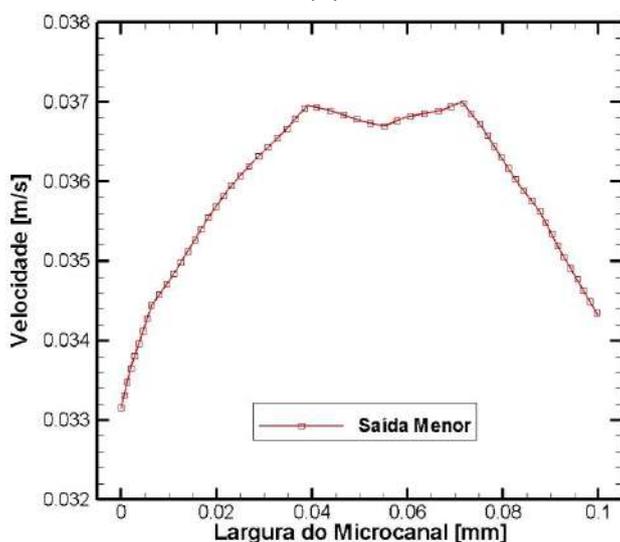
Figura 7.15: Campo de velocidade resultante para a vazão de $Q=0,150$ mL/min.

As imagens foram tratadas para melhorar sua qualidade e posteriormente essas foram processadas utilizando um algoritmo de correlação cruzada adaptativa, que divide cada imagem em janelas de interrogação medindo 32×32 pixels e com uma sobreposição de janelas de 50%, gerando os campos de velocidade instantâneos. A média dos 5000 campos de velocidade instantâneos resultou no campo de velocidade médio apresentado na Figura 7.16a para o microcanal de entrada e microcanal da bifurcação maior do dispositivo próximo a bifurcação e Figura 7.16b para o microcanal

de bifurcação menor também próximo a bifurcação. O erro associado a essa medida experimental realizada gira em torno de 5%.



(a)



(b)

Figura 7.16: Perfil de velocidade (a) para a entrada e bifurcação maior e (b) bifurcação menor próximos a bifurcação dos canais do microdispositivos.

7.3.2 Balanço de massa para os microseparadores fabricados com os polímeros UA e PDMS

Após adquirir os valores de vazão mássica durante uma hora, três vezes, foi então realizada uma média dos valores e calculado seu desvio padrão tanto para o dispositivo fabricado em UA como para o dispositivo fabricado em PDMS. Foi então realizada uma

transformação de medidas de vazão mássica para vazão volumétrica, calculado média, desvio padrão, velocidade e número de Reynolds, cujos valores estão apresentados na Tabela 7.21, tanto para o dispositivo fabricado em UA como em PDMS.

Tabela 7.21: Balanço de massa, utilizando água com corante como fluido, medindo a massa na saída de 400 μm (bif. maior) e na saída de 100 μm (bif. menor), utilizando os dispositivos fabricados em UA e PDMS.

μcanal	UA			PDMS		
	Q (mL/min)	Velocidade (m/s)	Re	Q (mL/min)	Velocidade (m/s)	Re
Entrada	0,150	$0,125 \pm 2,5 \cdot 10^{-3}$	0,272	0,150	$0,125 \pm 3,2 \cdot 10^{-3}$	0,272
Bif. Maior	$0,146 \pm 1,95 \cdot 10^{-3}$	$0,124 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$	0,277	$0,147 \pm 4,9 \cdot 10^{-3}$	$0,124 \pm 2,8 \cdot 10^{-3}$	0,272
Bif. Menor	$0,013 \pm 9,02 \cdot 10^{-3}$	$5,06 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-3}$	0,01	$0,0016 \pm 6,8 \cdot 10^{-4}$	$5,1 \cdot 10^{-3} \pm 1,8 \cdot 10^{-3}$	0,02

Depois do balanço de massa realizado para os microdispositivos fabricados em UA e PDMS apresentados na Tabela 7.21, uma comparação entre o Micro-PIV realizado no dispositivo fabricado em PDMS foi realizada e apresentada na Tabela 7.22. O experimento de Micro-PIV não foi realizado no dispositivo fabricado em UA devido a sua baixa transparência e assim não possibilitando tal estudo.

Tabela 7.22: Valores comparativos entre experimento de balanço de massa e Micro-PIV para o dispositivo fabricado em PDMS.

μcanal	Balanço de massa			Micro-PIV		
	Q (mL/min)	Veloc. (m/s)	Re	Q (mL/min)	Veloc. (m/s)	Re
Entrada	0,150	0,125	0,272	0,150	$0,17 \pm 5,6 \cdot 10^{-3}$	0,39
B. Maior	$0,147 \pm 4,9 \cdot 10^{-3}$	$0,124 \pm 2,8 \cdot 10^{-3}$	0,272	0,193	$0,16 \pm 8,2 \cdot 10^{-3}$	0,37
B. Menor	$0,0016 \pm 6,8 \cdot 10^{-4}$	$5,1 \cdot 10^{-3} \pm 1,8 \cdot 10^{-3}$	0,02	0,012	$0,04 \pm 1,05 \cdot 10^{-3}$	0,07

Uma comparação entre as simulações realizadas com os microseparadores com dimensões adquiridas após a fabricação, estão apresentados nas Tabelas 7.23 para o microseparador fabricado em PDMS e na Tabela 7.24 para o microdispositivo fabricado em UA.

Tabela 7.23: Valores comparativos entre a simulação utilizando água como fluido no COMSOL, balanço de massa e Micro-PIV para o dispositivo fabricado em PDMS.

Microcanal	Simulado			Balanço de massa			Micro-PIV		
	Q (mL/min)	Velocidade (m/s)	Re	Q (mL/min)	Velocidade (m/s)	Re	Q (mL/min)	Velocidade (m/s)	Re
Entrada	0,150	0,176	0,40	0,150	$0,125 \pm 3,2 \cdot 10^{-3}$	0,272	0,150	$0,17 \pm 5,6 \cdot 10^{-3}$	0,39
Bif. Maior	0,208	0,172	0,40	$0,147 \pm 4,9 \cdot 10^{-3}$	$0,124 \pm 2,8 \cdot 10^{-3}$	0,272	0,193	$0,16 \pm 8,2 \cdot 10^{-3}$	0,37
Bif. Menor	0,009	0,029	0,05	$0,0016 \pm 6,8 \cdot 10^{-4}$	$5,1 \cdot 10^{-3} \pm 1,8 \cdot 10^{-3}$	0,02	0,012	$0,04 \pm 1,05 \cdot 10^{-3}$	0,07

Tabela 7.24: Valores comparativos entre a simulação utilizando água como fluido no COMSOL e balanço de massa para o dispositivo fabricado em UA.

Microcanal	Simulado			Balanço de massa		
	Q (mL/min)	Velocidade (m/s)	Re	Q (mL/min)	Velocidade (m/s)	Re
Entrada	0,150	0,174	0,33	0,150	$0,125 \pm 2,5 \cdot 10^{-3}$	0,272
Bif. Maior	0,203	0,170	0,39	$0,146 \pm 1,95 \cdot 10^{-3}$	$0,124 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$	0,277
Bif. Menor	0,010	0,032	0,06	$0,013 \pm 9,02 \cdot 10^{-3}$	$5,06 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-3}$	0,01

7.3.3 Verificação com sangue humano

Após obter o hemograma completo, o sangue coletado foi diluído em 5%, 10% e 16% com base na quantidade de hematócritos e utilizando PBS. Então foi preparada a bancada experimental, a qual foi composta de uma bomba de seringa, microdispositivo e microtubos para as coletas da separação, como mostrado na Figura 6.11 anteriormente. Foram realizadas 18 coletas sanguíneas e preparadas nas diferentes diluições. Como resultado final, foram analisados 60 resultados de microseparação.

A parte experimental foi composta de cinco etapas: na primeira etapa, para um mesmo dispositivo, foi utilizada a concentração de 5% de hematócrito de uma mesma amostra de material biológico de um mesmo indivíduo; na segunda parte, uma mesma amostra (sangue de um outro indivíduo) foi diluída em 5%, 10% e 16% e utilizado o mesmo dispositivo; na terceira etapa, o mesmo dispositivo foi utilizado para diferentes amostras de sangue, ou seja, de diferentes indivíduos, com a mesma concentração de 5%, na quarta etapa, foi utilizado diferentes dispositivos para uma mesma concentração de um mesmo material biológico coletado. Na quinta e última etapa, foi utilizado três microdispositivos com as diluições de 5%, 10% e 16%. Essas etapas ilustrada na Figura 7.17, foram realizadas para garantir que a eficiência de separação não estivesse ligada nem a concentração sanguínea e nem ao microdispositivo fabricado em PDMS. Em todas as etapas foram realizadas, três repetições de medidas para obter uma média e desvio padrão do resultado obtido, ou seja, 6 mL (sangue total + PBS) divididas em 3 partes.



Figura 7.17: Sequência das etapas experimentais utilizando material biológico humano.

Como resultado da primeira etapa, que consistiu em utilizar 6 mL (sangue total + PBS), dividido em 3 partes, de uma mesma amostra de 5% de hematócrito em um único microdispositivo fabricado em PDMS. Obteve-se uma eficiência de separação de $96\% \pm 2,43$, comparando esse valor com o apontado na literatura (97%) (Tripathi, Siddhartha, et al., 2013), tem-se a Figura 7.18.

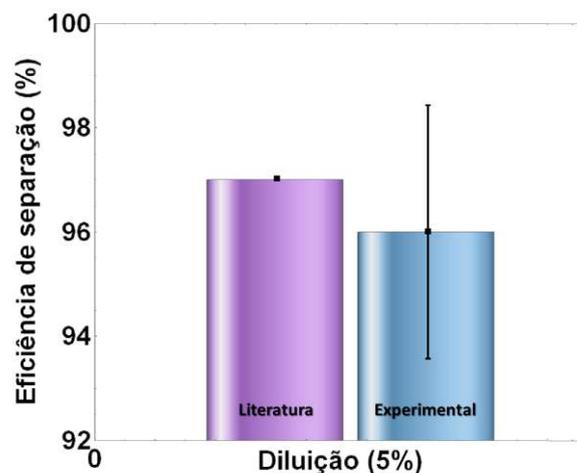


Figura 7.18: Valor da eficiência de separação obtida para 5% de hematócrito.

Na segunda etapa, que consiste em pegar uma segunda amostra e diluir em 5%, 10% e 16% com base na quantidade de hematócritos e usar um único microseparador, obteve-se a eficiência de separação de $96,3\% \pm 3,2$ para 5%, para a diluição com base em 10% dos hematócritos a eficiência de separação foi de $80,2\% \pm 4,1$, e a eficiência obtida para a concentração de 16% foi de $70,6\% \pm 5,02$. Os valores apresentados pela

literatura são (Tripathi, Siddhartha, et al., 2013): eficiência de 97% para 5% de hematócritos, 75% de eficiência de separação para 10% de hematócritos e 65% para 16% de hematócritos. Já para a simulação realizada no COMSOL os resultados foram: 93%, 77% e 68% de eficiência de separação para 5%, 10% e 16% de hematócritos, respectivamente, esses valores estão apresentados na Tabela 7.25 e Figura 7.19.

Tabela 7.25: Valores de eficiência de separação obtidas por simulação, experimentalmente e apresentadas pela literatura.

% de hematócritos	Literatura (%)	Simulação (%)	Experimental (%)
5	97	92	96,3±3,2
10	72	74	80,2±4,1
16	65	69	70,6±5,02

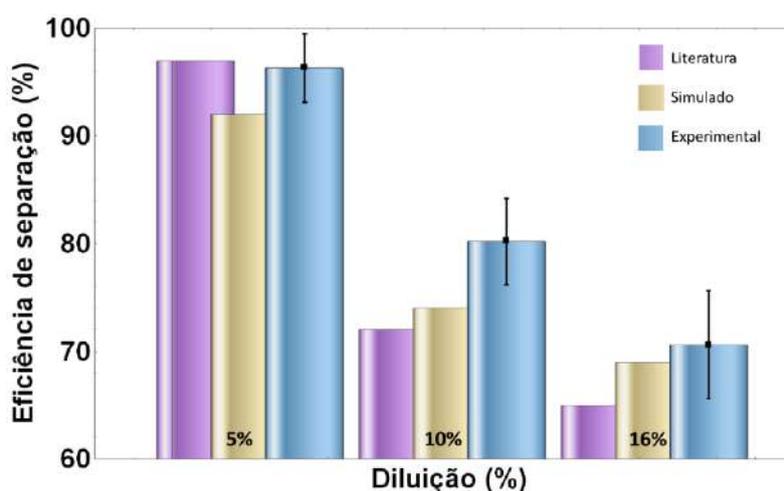


Figura 7.19: Valor da eficiência de separação obtida experimentalmente, simulados e apresentados na literatura (Tripathi, Siddhartha, et al., 2013) para 5%, 10% e 16% de hematócrito de uma única amostra em um único microseparador.

Para a terceira parte experimental, a qual foi realizada diluindo três diferentes amostras sanguíneas em 5% e microseparando com um mesmo dispositivo, obteve-se a eficiência de separação de 96,2%±1,8, 95,6%±2,3 e 97,2%±0,9, como mostrado na Figura 7.20.

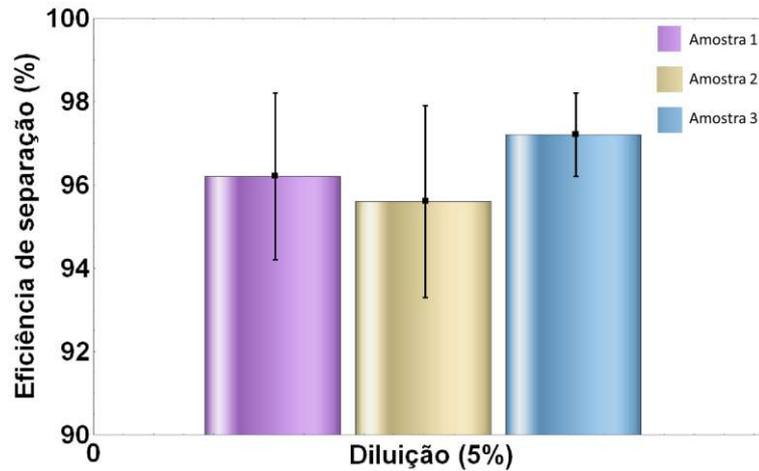


Figura 7.20: Resultado da terceira etapa experimental, um único microdispositivo para 3 amostras sanguíneas diferentes.

Na quarta etapa, verificou-se a eficiência de separação com 3 dispositivos, mas uma única concentração de diluição de 16% de hematócritos. O resultado desta etapa é apresentado na Figura 7.21, onde foram obtidas as eficiências de 62,5%±4,8, 66,1±5,1 e 68,3%±6,4 para os microseparadores 1, 2 e 3 respectivamente.

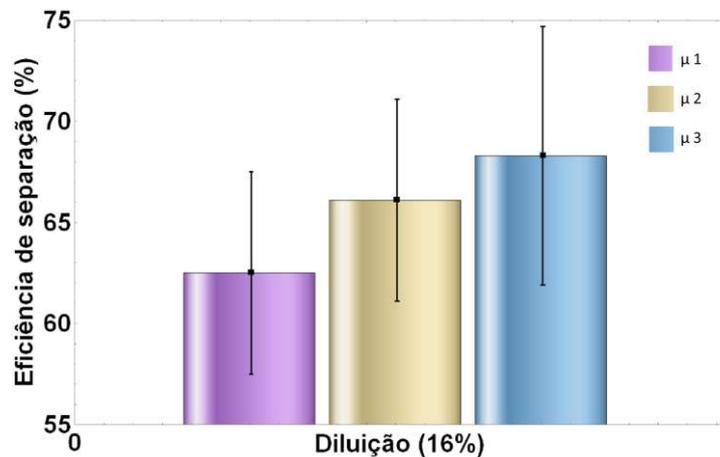


Figura 7.21: Resultado da microseparação com uma mesma concentração de 16% aplicada em três diferentes dispositivos.

Na quinta e última etapa, foi então usado diferentes microseparadores e diferentes concentrações de diferentes doadores para verificar experimentalmente os resultados, como mostrado na Figura 7.22, assim se diferenciando da segunda etapa a qual fez-se o uso de um único dispositivo para uma única amostra em diferentes concentrações. Nesta última etapa chegou-se as eficiências de 95,8%±1,9 para 5%, 78,1%±3 para 10% e 68,0%±2,1 para 16% de hematócritos.

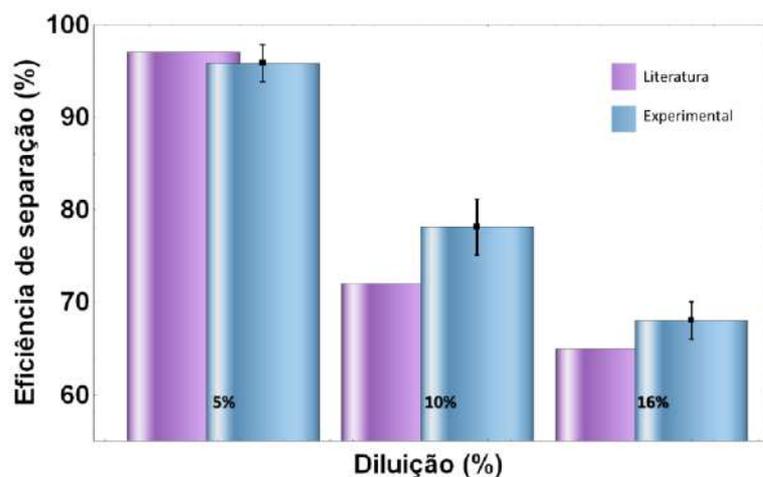


Figura 7.22: Resultado da quinta etapa experimental, onde foi utilizado diferentes microseparadores com diferentes concentrações.

Para o microdispositivo fabricado em UA, sendo aplicados diferentes dispositivos com a mesma diluição de 10% da qualidade de hematócritos através do hemograma do sangue completo. Foi escolhida essa porcentagem porque um tubo de sangue coletado contendo EDTA daria para fazer a quantidade necessária para o experimento, assim não necessitando coletar mais sangue e nem perdendo grande quantidade de amostra. O resultado da eficiência de separação do microdispositivo fabricados em UA foi de $79,03\% \pm 3,9$. Mostrando que esse valor está em concordância com o valor de eficiência de separação com o microseparador fabricado em PDMS que foi de $80,2\% \pm 4,1$, como podemos observar na Figura 7.23.

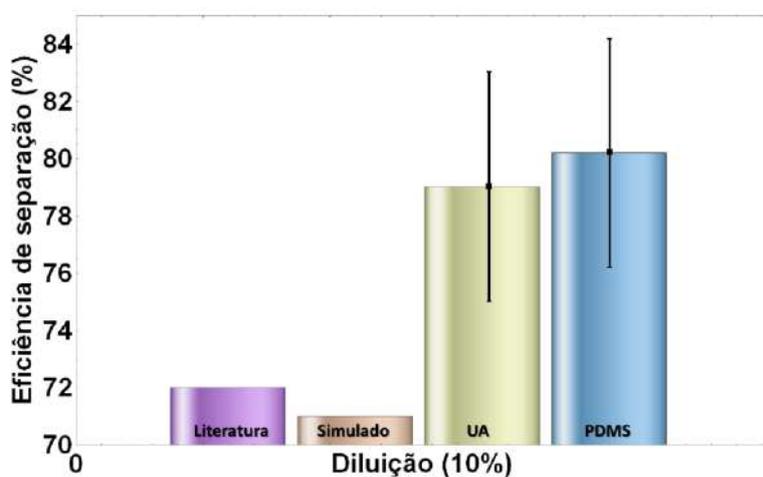


Figura 7.23: Gráfico comparativo entre os valores de eficiência de separação entre os microseparadores fabricados em PDMS, UA e simulação para 10% do valor de hematócritos.

7.3.4 Análise de microseparação em sangue canino

Os microseparadores também foram testados em sangue canino. Após a coleta de sangue de um exemplar da raça Shih tzu fêmea de 4 anos, a amostra passou pelo analisador hematológico automatizado para obter o hemograma do sangue total, para assim realizar a diluição de 10% com base na quantidade de hematócritos, assim como realizado com amostras de sangue humano.

Após a amostra ser preparada com PBS, essa então foi microseparada pelos dispositivos fabricados em PDMS e UA. Para esse teste obteve-se o resultado de eficiência de separação de $87,6\% \pm 6,5$ fabricado em PDMS e de $79,03\% \pm 3,6$ para o microseparador fabricado em UA, como pode ser observado na Figura 7.24.

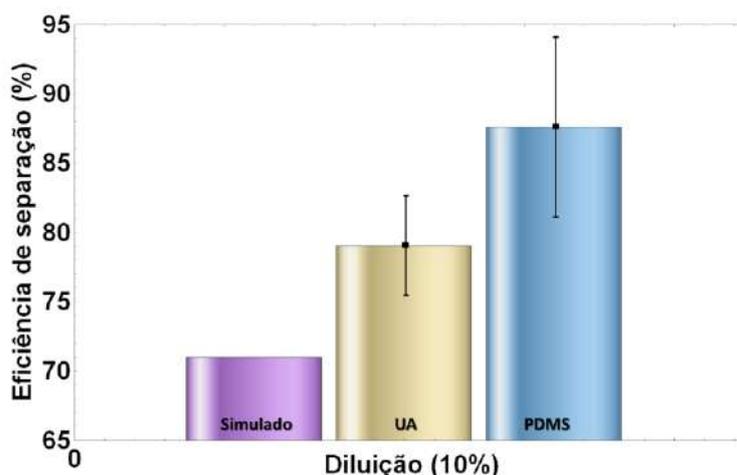


Figura 7.24: Resultado da microseparação com 10% de hematócrito de sangue canino, utilizando o dispositivo fabricado em PDMS e UA.

Os valores de eficiência de separação apresentados pelo microseparador testado em sangue humano e sangue canino estão próximos, tanto para microdispositivos fabricados em PDMS como em UA. Isso pode ser observado na Tabela 7.26.

Tabela 7.26: Valores obtidos da eficiência de separação de 10% de hematócritos para sangue humano e canino, comprando com o estudo teórico, experimental e com dados da literatura.

Sangue (10%)	Literatura	Simulado	PDMS	UA
Humano	72%	70,9	$80,2\% \pm 4,1$	$79,03\% \pm 3,9$
Canino	-	70,9	$87,6\% \pm 6,5$	$79,03\% \pm 3,6$

Após dimensionalizar os microcanais do dispositivo para separação de células do plasma, verificou-se através do estudo teórico que a angulação poderia influenciar a eficiência de separação. O ângulo que melhor apresentou o valor de eficiência foi o de 90°. Levando em consideração o pré-requisito que a proporção entre os canais bifurcados deveria respeitar a proporção 2,5:1.

A fabricação utilizando molde fabricado em um microfresa apresentou dimensões maiores que o projeto inicial. Isso foi verificado fazendo a caracterização geométrica utilizando um microscópio 3D. Com os valores obtidos de altura e largura na caracterização tridimensional, foram utilizados para calcular média e desvio padrão, e com esses valores, voltou-se ao Autocad e para reajustar o projeto e simular novamente, agora com as novas dimensões, para só então posteriormente comparar os resultados de estudo teórico e experimental.

Com a comparação de estudos de bancada e simulação, verificou-se que as novas dimensões obtidas estavam concordantes e não oferecendo grande prejuízo ao estudo que se tinha como objetivo inicial.

No estudo experimental para verificar o estudo teórico, foram realizados experimentos para analisar o escoamento. Cada microdispositivo apresentava uma característica marcante em relação a transparência, sendo assim necessário montar bancadas para cada um deles.

O balanço de massa realizado em ambos os dispositivos mostrou que existe a possibilidade de verificar o escoamento mesmo com o dispositivo não podendo ser aplicado no micro-PIV.

Os experimentos realizados com sangue humano, comparados com o estudo teórico e valores da literatura (Tripathi, Siddhartha, et al., 2013), estão de comum acordo. Como pode-se observar os resultados, quanto mais diluído o sangue com uma solução salina, maior será sua eficiência de separação. Para diluições com maior concentração de hematócritos, esses valores de eficiência reduzem. Isso aparece no estudo teórico também, observando então que por mais que varie a velocidade média de entrada do

fluido sanguíneo, a eficiência de separação não muda, ou seja, o fator mais importante para encontrar uma eficiência maior com um microdispositivo com dimensões fixas, seria diminuir a concentração de hematócritos e não a vazão de entrada.

No estudo com sangue canino, as eficiências de separação com a diluição de 10% de hematócritos, ficou próximo as valores do estudo com material biológico humano, verificando que o microseparador projetado pode ser aplicado ao uso veterinário.

8. CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS

Os métodos de microseparação sanguínea, tanto passiva, ativa ou a combinação de ambas, se mostra eficaz e podendo apresentar diagnósticos instantâneos e utilizando uma menor quantidade de amostra. Um dos meios de microseparação é o método passivo baseado na Lei da bifurcação ou Efeito Zweifach-Fung, o qual se iniciou fazendo justamente estudos da microcirculação humana.

Com aparelhos menores, seria mais fácil e rápido diagnosticar e tratar doenças em lugares remotos e de difícil acesso. Assim não necessitando de uma grande equipe de profissionais. E por necessitar de pequenas quantidades de amostras, podem ser utilizados em organismos debilitados e frágil como, por exemplo, recém-nascidos, paciente de unidade de tratamento intensivo e animais de pequeno porte.

Um dos requisitos para que esse método passivo pudesse ser aplicado seria a proporção entre as vazões dos canais bifurcados. Isso também foi comprovado através de experimentos, o qual utilizou uma proporção de 2:1, ou seja, proporção menor que o citado na literatura, e foi observado o escoamento do fluido saindo apenas pelo canal de menor diâmetro hidráulico, o que fere as leis da mecânica. Com o estudo para projetar o microseparador, as dimensões de largura e comprimento devem ser calculadas adequadamente para respeitar a proporção de vazão de 2,5:1 entre os canais bifurcados, pois sem esse padrão não se terá escoamento de separação e assim também não se aplica a Lei de Zweifach-Fung.

Para construir um microdispositivo capaz de microseparar o sangue, um dos meios é a fabricação utilizando polímeros. O microdispositivo utilizado no presente estudo, foi confeccionado técnica de litografia macia, com dois diferentes polímeros, UA e PDMS,

os quais tem diferentes polimerizações e selagens. Utilizando molde fabricado em PMMA através de uma microfresa.

Esse molde se mostra como um bom padrão de repetibilidade nas geometrias do microdispositivo e também a facilidade de manuseio. Com um molde fabricado em acrílico, podemos também inovar fazendo diferentes dimensões, configurações e alturas dentro de uma única fabricação. A fabricação utilizando molde em PMMA mostrou que uma pequena variação na geometria acontece, mas não oferecendo modificações no estudo de escoamento e separação.

A fabricação desses microseparadores em UA mostrou-se tão eficiente quanto a fabricação em PDMS, que são os mais utilizados na literatura. Assim tendo um custo menos elevado e podendo ser aplicado em estudos iniciais de separação de amostras sanguíneas, pois este material não interage com a amostra como pudemos observar nos resultados comparados em ambos polímeros.

Os estudos experimentais de escoamento, micro-PIV e balanço de massa estavam em ordem de concordância com os valores obtidos na simulação utilizando a ferramenta computacional COMSOL.

Outros requisitos que também se fazem importantes neste estudo, foram simular os ângulos e a velocidade média de entrada. Neste estudo teórico, observou-se que a variação angular entre os canais bifurcados influenciará na sua eficiência de separação, pois quanto menor o ângulo, maior será o gradiente de pressão. A velocidade média de entrada, também terá sua influência sobre os resultados da microseparação, pois se for menor que um determinado valor, essa não apresentará um separador eficiente.

Outra grande contribuição do presente trabalho, foi realizar o estudo com sangue canino, pois este microdispositivo mostrou-se tão eficiente quanto quando aplicado com sangue humano para a mesma diluição de 10% de hematócritos.

O presente trabalho abre ramos de extensão da presente pesquisa, tanto sob aspectos fundamentais como na aplicação. Algumas sugestões para a continuação do presente trabalho são listadas a seguir:

- Fabricar um molde em PMMA com dimensões menores que as projetadas, com diferentes alturas ao longo do microseparador, para verificar se isso pode influenciar a separação;

- Testar o microdispositivo com células tumorais e analisar os resultados de separação destas, pois se trata de uma aplicação importante do presente trabalho;

- Envolver diferentes técnicas de separação passiva num mesmo microdispositivo e analisar essa eficiência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, C. W. (2011). "Kinematic characterization of blood flows and blood flow simulators in passive microvalves using flow visualization techniques and the Lattice Boltzmann method". *Elsevier*(05), 291-307.
- AL-DHUBABAIAAN, A. A. (2005). *Production of biodiesel from Soybean Oil in a Micro Sacle Reactor*. Oregon State University, Corvallis, OR, USA.: Thesis (M. Sc.).
- AUTEBERT, Julien, et al. (2012). Microfluidic: An innovative tool for efficient cell sorting. *Elsevier*(07), 297-307.
- BEECH, Jason P., et. al. (2012). Sorting cells by size, shape and deformability. *Lab on a Chip*, 1048-1051.
- BI-FENG, Liu, et al. (2005). Micro-separation toward systems biology. *Elsevier*, 1006, 19-28.
- BITSCH, L. O. (2005). Micro particle-image velocimetry of bead suspensions and blood flows. *Experiments in Fluids*, 39, 505-511.
- BOUSKELA, E. (1999). Vasomotricidade e Endotélio: Alguma Relação? Observação na Microcirculação da Bolsa da Bochecha de Hamster. Tese apresentada à UERJ em concurso.
- BRUUS, H. (2008). *Theoretical Microfluidic*. Oxford University Press.
- CARLO, D. D. (2009). Inertial microfluidics. *Lab Chip*(DOI: 10.1039/B912547G).
- CARVALHO, Jonas Antonio Albuquerque de; OLIVEIRA, Tiago Tolentino de. (2006). MECÂNICA DOS FLUIDOS APLICADA A ESCOAMENTO DO SANGUE. 16° POSMEC. FEMEC/UFU, Uberlândia-MG.
- CHANGQING, Yi, et al. (2005). Microfluidics technology for manipulation and analysis of biological cells. *Elsevier*(12), 1-23.
- CHOCALHEIRO, A. L. (2014). *Lab on Paper: biossensores colorimétricos de papel para a detecção de membros do complexo Mycobacterium tuberculosis*. Lisboa: Faculdade de Ciências e tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.

- COLTRO, W. et al. (2007). Microssistemas de análises químicas: Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. *Química Nova*, 30(Novembro), 1986-2000.
- COSTA, J. (2009). Caracterização cinemática e dinâmica de escoamentos estacionários em micro-canais rectos e micro-válvulas com recurso à técnica micro-PIV e à simulação numérica. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal.
- CHEN, Jian, et al. (2012). Microfluidic approaches for cancer cell detection, characterization, and separation. *Lab-on-a-chip*, 12, 1753-1767.
- DOYEUX, V., et al. (2011). Spheres in the vicinity of a bifurcation elucidating the Zweifach-Fung effect. *Journal of fluid mechanics*(674), 359-388.
- FAILACE, Renato; F. F. (2015). *Hemograma - Manual de interpretação*. Porto Alegre: Artmed.
- FAIVRE, M., et al. (2006). Geometrical focusing of cells in a microfluidic device: an approach to separate blood plasma. Em *Biorheology*.
- FERNANDES J. C. B. e FERREIRA L. O. S. (2006). Manufacturing of miniature fluidic modules for lab-on-a-chip using UA photoresin form flexographic platemaking process. 17, 643-647.
- FERRAZ, M. H., & Murao, M. (2007). Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos e após o sexto mês de vida. *Rev. bras. Hematologia e hemoterapia*, 218-222.
- FEKETE, Zoltán et al. (2011). Performance characterization of micromachine particle separation system based on Zweifach-Fung effect. *Elsevier*(12), 89-94.
- FLEMING, B. P. (1985). Measurement of Erythrocyte velocity by use of periodic differential detector. H899-H905.
- FONSECA, A. (2008). *Construção e Avaliação de Microssistemas para Análise em Fluxo*. Campinas, SP, Brasil: Instituto de Química/UNICAMP.
- FOX, Robert W. (2001). *Introdução a Mecânica dos Fluidos*. Rio de Janeiro: LTC.
- FUNG, Y. C., & ZWEIFACH, B. W. (1971). Microcirculation: Mechanic of blood flow in capillaries. *Vol. 3:189-210 (Volume publication date January 1971)* , 189-225.

- GLOSSETT, D. R., Westbrook, W. M., & al., e. (2010). Label-free cell separation and sorting in microfluid systems., (pp. 3249-3267).
- JUNIOR, J. Martim. (2012). *Fabricação por Fotolitografia e Análise Teórico-Experimental de Micromisturadores por Transformação Integral e Termografia por Infravermelho*. XVII, 127.
- JUNIOR, J. M. (2006). Instrumentação para análise da velocidade de células vermelhas na microcirculação de pequenos animais. Rio de Janeiro.: XXCBEB.
- KERSAUDY-KERHOAS, M. (2010). *Design, test and biological validation of microfluidic systems for blood plasma separation*. Heriot-Watt University - School of Engineering an Pysical Sciences.
- KIRBY, B. J. (2010). *Micro- and Nanoscale Fluid Mechanics: Transport in Microfluidic Devices*. New York: Cambridge University Press.
- KUNDU, Pijush K.; COHEN, Ira M.; David R Dowling Ph.D. (2012). *Fluid Mechanics*. USA: Elsevier.
- Li X; Popel A. S; Karniadakis, G.E. (2013). Blood-plasma separation in Y-shaped bifurcating microfluidic channels: a dissipative particle dynamics simulation study. *Phisycal Biology*(doi:10.1088/1478-3975/9/2/026010.).
- LIMA, R. I. (2012). Blood flow behavior in microchannels: Past, current and future trends. 1-2.
- LIMA, R. W. (2008). In vitro blood flow in a rectangular PDMS microchannel: experimental observations using a confocal micro-PIV system. *Biomedical Microdevices*, 10(2),153-67.
- LIMA, Rui; et al. (2007). In vitro blood flow in a rectangular PDMS microchannel: experimental observations using a confocal micro-PIV system. *Biomed Microdevices*.(DOI 10.1007/s10544-007-9121-z).
- LOPES, D. A. (2012). Caracterização experimental da dinâmica e da organização celular de escoamentos estacionários de sangue animal em microcanais rectos. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal.
- MAHDOKHT, Masaeli, et. al. (2012). Continuous Inertial Focusing and Separation of Particles by Shape. *American Physical Society* (doi:10.1103/PhysRevX.2.071017).

- MEHER, L. C. (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10, 248-268.
- NOVAES, S. C. (2012). *Desenvolvimento de um microdispositivo biomédico para a separação e deformação de eritrócitos*. Instituto Politécnico de Bragança.
- OH, Kwang W., et al. (2012). Design of pressure-driven microfluidic network using electric circuit analogy. *Lab Chip*, 12, 515-545.
- RAFFEL, M. W. (2007). *Particle Image Velocimetry - A practical guide*. Second Edition, Springer.
- SAJEESH, P., & Sen, A. K. (2014). Particle separation and sorting in microfluidic devices: a review. *Microfluid and Nanofluid*, (pp. 52-60). DOI 10.1007/s10404-013-1291-9, 1-52.
- SANTOS, N. A. (2008). *Estudo da Reologia de Fluidos*. Porto - Portugal: Universidade do Porto.
- SHEVKOPLYAS, S.S., et al., et al. (2005). Biomimetic auto separation of leukocytes from whole blood in a microfluidic device. *s.l. : Anal Chem*.
- SHIROMA, L. S. (2016). Self-regenerating and hybrid irreversible/reversible PDMS microfluidic device. *Scientific Reports*, doi:10.1038/srep26032(Novembro 2016), 35-43.
- SOARES, Bruno Ferreira, et al. (2012). Estudo comparativo entre o hemograma humano e veterinário. *Ensaios e Ciência. Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde.*, 16(4), 87-100.
- SHIELDS, Wyatt C. IV, et al. (2015). Microfluidic Cell Sorting: A Review of the Advances in the Separation of Cells from Debulking to Rare Cell Isolation. *Lab Chip*(doi:10.1039/c4lc01246a.), 1-44.
- TRIPATHI, Siddhartha, et al. (2013). Blood plasma separation in elevated dimension T-shaped microchannel. *Biomed Microdevices*(15), 415-425.
- SILVA, A. C. (2015). *Nanotecnologia em diagnóstico e terapia no Brasil*. São Paulo : USP. Thesis (M. Sc.).
- SILVA, G. L. (2008). Micro-PIV and CFD characterization of flows in a microchannel: Velocity Profiles, Surface Roughness and Poiseuille Numbers. *International Journal of Heat and Fluid Flow*, 29, 1211-1220.

- SILVA, J. A. (1984). Aspectos hemorreológicos da circulação humana. Em *Biopatologia sanguínea e vascular* (pp. 279-337). Lisboa.
- SILVA, J. et al. (1997). Factores intervenientes no controle da microcirculação e da oxigenação tecidual. *O médico*, 108, 319-328.
- SINTON, D. (s.d.). Microscale flow visualization. Em *Microfluidic e Nanofluidic* (pp. November 2004, Volume 1, Issue 1, pp 2-21).
- SisNANO. (2016). Disponível em: <http://www.mcti.gov.br/sisnano>, acessado em: Ago, 2016.
- SOLLIER, R. E., & al, e. (2009). Passive microfluidic devies plasma extration from whole human blood., (pp. 617-624).
- TAMAYO, Javier, et al. (2012). Biosensors based on nanomechanical systems. *The Royal Society of Chemistry*, 42, 1287-1311.
- YAMAGUCHI, T. I. (2006). Computacional blood flow analysis - new trends and methods. *Journal of Biomechanical Science and Engineering* , 29-50.
- YANG, Sung, et al. (2006). A microfluidic device for continuous, real time blood palsma separation. *The Royal ociety of Chemistry*(6), 871-880.
- YC, F. (1993). *Biomechanic: Mechanical Properties of living tissues*. New York: Springer.
- ZHAOXIN Geng et al. (2011). A PLASMA SEPARATION DEVICE BASED ON CENTRIFUGAL EFFECT AND ZWEIFACH-FUNG EFFECT. *15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. Seattle, Washington, USA*(978-0-9798064-4-5/μTAS 2011/\$20©11CBMS-0001).

APÊNDICE 1

Valores de velocidade média de entrada, velocidade média, vazão e pressão nos pontos pontos ($-0,01$) mm $\leq x \leq 0,1$ mm e $0,01$ mm $\leq y \leq 0,4$ mm e $z=0,025$ mm para diferentes ângulos e 5% de hematócritos.

	Velocidade (m/s)			Vazão (mL/min)			Pressão (Pa)		
	Entrada	B. Maior	B. Menor	Entrada	B. Maior	B. Menor	Entrada	B. Maior	B. Menor
$\Theta=5^\circ$									
0,0625	0,088866	0,088165	0,044918	0,1066392	0,105798	0,013475	617	261,28	394,2
0,125	0,17774	0,17636	0,09002	0,213288	0,211632	0,027006	1235,4	523,09	791,81
0,25	0,35536	0,35478	0,18028	0,426432	0,425736	0,054084	2479	1111,1	1599,9
$\Theta=10^\circ$									
0,0625	0,088513	0,087206	0,04132	0,1062156	0,1046472	0,012396	630,37	442	521
0,125	0,17702	0,1744	0,082798	0,212424	0,20928	0,024839	1261,3	884,45	1045,1
0,25	0,35384	0,34857	0,16532	0,424608	0,418284	0,049596	2527,7	1772,2	2105,5
$\Theta=20^\circ$									
0,0625	0,088563	0,086987	0,033474	0,1062756	0,1043844	0,010042	636,93	517,01	582,44
0,125	0,17712	0,17394	0,066805	0,212544	0,208728	0,020042	1274,4	1034,6	1168,4
0,25	0,35405	0,34764	0,1312	0,42486	0,417168	0,03936	2553,6	2073,2	2353,1
$\Theta=30^\circ$									
0,0625	0,088589	0,086907	0,027265	0,1063068	0,1042884	0,00818	638,71	553,15	601,74
0,125	0,17718	0,173778	0,054002	0,212616	0,2085336	0,016201	1277,9	1106,9	1207
0,25	0,35417	0,34728	0,10365	0,425004	0,416736	0,031095	2560,6	2218,1	2429,8
$\Theta=40^\circ$									
0,0625	0,08573	0,086901	0,022607	0,102876	0,1042812	0,006782	639,48	562,1	610,73
0,125	0,17714	0,17377	0,044415	0,212568	0,208524	0,013325	1279,5	1124,8	1224,8
0,25	0,35412	0,347	0,083482	0,424944	0,4164	0,025045	2563,6	2272,5	2464,4
$\Theta=45^\circ$									
0,0625	0,08855	0,086842	0,020771	0,10626	0,1042104	0,006231	639,67	577,24	613,44
0,125	0,1771	0,17365	0,040652	0,21252	0,20838	0,012196	1279,9	1155,1	1230,1
0,25	0,35403	0,34707	0,075758	0,424836	0,416484	0,022727	2564,9	2314,8	2482
$\Theta=50^\circ$									
0,0625	0,088531	0,08686	0,01918	0,1062372	0,104232	0,005754	639,84	577,19	615,5
0,125	0,17707	0,17369	0,037409	0,212484	0,208428	0,011223	1280,2	1155	1234,2
0,25	0,035396	0,34707	0,069215	0,0424752	0,416484	0,020765	2564,9	2314,8	2482
$\Theta=60^\circ$									
0,0625	0,088546	0,08685	0,017135	0,1062552	0,10422	0,005141	640,15	595,31	618,53
0,125	0,1771	0,017363	0,033244	0,21252	0,0208356	0,009973	1280,8	1191,7	1240
0,25	0,35404	0,34714	0,060907	0,424848	0,416568	0,018272	2566,1	2314,6	2492,6

$\Theta=70^\circ$									
0,0625	0,088504	0,086832	0,015476	0,1062048	0,1041984	0,004643	640,12	577,07	619,85
0,125	0,1771	0,17364	0,029868	0,21252	0,208368	0,00896	1280,7	1154,8	1245,5
0,25	0,35387	0,34701	0,054203	0,424644	0,416412	0,016261	2565,9	2314,3	2496,9
$\Theta=80^\circ$									
0,0625	0,088522	0,086826	0,017412	0,1062264	0,1041912	0,005224	640,16	595,31	620,69
0,125	0,17705	0,1736	0,027606	0,21246	0,20832	0,008282	1280,8	1191,3	1244,1
0,25	0,35395	0,34682	0,049541	0,42474	0,416184	0,014862	2566,1	2387,6	2499,6
$\Theta=90^\circ$									
0,0625	0,088543	0,08684	0,01652	0,1062516	0,104208	0,004956	640,16	594,42	619,9
0,125	0,179	0,176	0,026	0,2148	0,2112	0,0078	1300	1195,6	1262,5
0,25	0,35412	0,346695	0,43581	0,424944	0,416034	0,130743	2565,8	2356,7	2498,3