



Dissertação

Mestrado em Engenharia Mecânica – Produção Industrial

***Dinâmica de Fluidos em Microcanais Aplicada a
Dispositivos Biomédicos de Diagnóstico***

Ricardo José Correia dos Santos

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Daniela Maria Barroso de Moura Cipreste Vaz, Professora da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico de Leiria e co-orientação do Doutor Joel Oliveira Correia Vasco, Professor da Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Leiria.

Leiria, *Setembro* de 2014

À Minha Família

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores, a Professora Doutora Daniela Vaz e o Professor Doutor Joel Vasco pela disponibilidade, a amabilidade e a orientação sempre demonstradas ao longo de todo o trabalho desenvolvido.

Agradeço ao Professor Joel Morgado pelos documentos facultados para o progresso da pesquisa sobre aspetos hemoreológicos.

Agradeço à Escola Superior de Tecnologia e Gestão e à Escola Superior de Saúde pelos recursos disponibilizados para o bom prosseguimento do trabalho.

Agradeço ao Engenheiro Carlos Matos e ao Engenheiro Luís Ribeiro, da CODI, pela disponibilidade e gentileza demonstradas quer no apoio técnico quer no fabrico do protótipo e das amostras.

Agradeço a todos os amigos e colegas de curso que me apoiaram e transmitiram conselhos e explicações de alguns aspetos que contribuíram para a escrita deste documento.

Agradeço à minha família e em especial aos meus Pais pelo suporte dado de diversa ordem quer nos momentos de adversidade quer nos momentos de felicidade pois sem eles não seria possível esta etapa académica.

Por fim, mas sendo tão ou mais importante, agradeço à minha amada Cristiana F. F. pelo amor, dedicação, conselho, espírito crítico, boa disposição e muitas outras qualidades que me foram muito importantes e inspiradoras para a elaboração do presente documento.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Resumo

A criação de dispositivos de monitorização de parâmetros fisiológicos, numa filosofia *point of care* (detecção no local), tem sofrido franca expansão nas últimas décadas. A detecção de moléculas biomarcadoras, em fluidos biológicos (saliva, urina, sangue) pelo próprio clínico e/ou utente, na monitorização de estados de saúde, tem-se mostrado ser de extrema relevância na prevenção de situações de emergência, que de outro modo poderiam causar danos irreversíveis. Esta dissertação pretende, através do estudo do escoamento sanguíneo, conceber uma arquitetura de microcanais de distribuição de fluidos biológicos (mais concretamente de um fluido não Newtoniano, o sangue) a utilizar em dispositivos de aplicação clínica ou médica. A investigação realizada compreendeu duas vertentes, designadamente, a primeira vertente, que consistiu na criação da arquitetura de um dispositivo de microcanais e realização de estudos de simulação virtual de escoamento no modelo desenhado; e uma segunda vertente que consistiu na materialização de um protótipo a partir de um modelo 3D, usado posteriormente na realização de testes experimentais de validação, de modo a identificar possíveis anomalias e efeitos inesperados.

O processo de construção e de execução dos ensaios de simulação na arquitetura de microcanais desenvolvida, teve por base as tecnologias BioMEMS (*Biomedical microelectromechanical systems*) e *Lab-on-a-Chip*, de modo a que a rede de microcanais desenvolvida apresentasse uma divisão igualitária de caudal, para um total de oito câmaras finais de reação, num circuito fechado. Posteriormente, a rede de microcanais arquitetada foi estudada virtualmente através da utilização do *software* ANSYS (*Simulation Driven Product Development*) e reequilibrada num processo iterativo, ou seja, depois de cada teste e análise de dados, são levadas a cabo várias remodelações geométricas, que se submetem posteriormente a nova simulação. Uma vez concluído o processo iterativo e otimizadas a geometria da arquitetura de microcanais, com análise dos diferentes parâmetros sob teste (caudal mássico, escoamento e velocidades de fluxo, entre outros), passou-se à materialização de um protótipo, através de um processo de fabrico de prototipagem rápida, com posterior realização de testes experimentais, que envolveram a determinação de velocidades de fluxo, distribuição de caudais, efeitos de vácuo e volume de amostra.

Em termos de simulação, verificou-se que a divisão do caudal é feita de forma equitativa levando a concluir que conseguimos preencher as câmaras de reação com quantidades idênticas e suficientes para a reação.

Experimentalmente, pudemos concluir que a divisão equitativa de caudal e distribuição igualitária, se verificam, tal como previsto na simulação computacional. Funcionalmente, será ainda pertinente avaliar no futuro, condições de fronteira e fenómenos de adesão e tensão junto às superfícies/paredes do dispositivo. No que concerne à filtração, enquanto forma de separação do plasma, foram analisadas duas soluções, nomeadamente, a inclusão de membranas porosas de filtração e a adição de geometria ao modelo 3D base, sob a forma de pinos, que propiciasse a retenção das células. Foi observado que a arquitetura com pinos facilitava o escoamento, ou seja, a velocidade foi superior relativamente à utilização de membranas porosas de filtração, que podem causar entupimento devido à baixa velocidade de escoamento observada junto dos poros.

O modelo de microfluida proposto, embora apresente já uma boa geometria 3D, pode ainda ser melhorado, no que diz respeito a aspectos da pressão a exercer para a alcançar uma boa mistura sangue-soro, bem como, os efeitos de vácuo e escape de ar aprisionado no módulo.

Palavras-chave: Microfluidica, BioMEMS, Lab-on-a-chip, Microdispositivos

Abstract

The creation of devices for monitoring physiological parameters, according to a “*point of care*” philosophy, has been booming in the recent decades. The detection of biomarker molecules present in biological fluids (saliva, urine, blood) by the clinician himself and/or the patient, when monitoring states of health and disease, has shown to be extremely important in the prevention of situations of emergency, that otherwise would cause irreversible damage. This research aims of the present work include the design of an architecture of microchannels that would equally distribute and make flow biologic fluids, such as blood (a non-Newtonian fluid) in order to be used for clinical applications and in medical devices. The research has comprised essentially two aspects, namely, a first phase of development, which consisted in creating the architecture of a microchannel device and conducting studies of virtual simulation on the models designed; and a second stage of development which consisted on manufacturing a 3D model prototype, that would be later used for performing experimental validation tests, in order to identify possible inconsistencies and unexpected effects.

The process of building and running the simulation tests on the microchannel architecture developed was based on the BioMEMS (*Biomedical microelectromechanical systems*) method and on the Lab-on-a-Chip technology, so that the network of microchannels designed would present an equal division of flow, for a total of eight final reaction chambers, in a closed circuit. Subsequently, the network of microchannels was studied and engineered virtually using the ANSYS (*Simulation Driven Product Development*) software, and re-equilibrated through an iterative process, i.e. after each test and data analysis, various geometric remodeling procedures were carried, that would subsequently undergo new simulation runs. Once concluded the iterative process and optimized the mechanical properties, with analysis of the different parameters under test (mass flow rate, flow velocity and flow, among others), the research process underwent a phase of prototype building, by a process of rapid prototyping, with subsequent achievement of experimental tests, involving the determination of flow velocity, flow distribution, vacuum and sample volume effects. In terms of the simulation process, we manage to reach conditions of equal division of the flow, leading to the conclusion that with the design applied, we can fill the chambers of the device with similar sufficient quantities for the occurrence of the chemical reactions.

In what concerns the process of plasma/cell separation or filtering, we have chosen to apply to the architecture and test the effect of adding a separating chamber composed by sets of pins, as well as, to test the effect of introducing a porous 0.22 μm cellulose inert filter. Interestingly, from the simulations, we could observe that the flow was delayed when the porous filtration membranes were used, probably due to some clogging close to the pores of the filter.

Experimentally, it was possible to conclude that the fair and equitable distribution of flow occurs, as previously determined by the numerical simulations. Functionally, it might be relevant to assess boundary conditions in the future, as well as, test phenomena of adhesion and surface tension along the surfaces/walls of the device.

In what concerns the separation of plasma, from the filtering solutions analyzed virtually and experimentally, (this is the insertion of porous filter membranes and the addition of the 3D geometry to the base model, in the form of pins, in order to promote the retention of cell) we observed that the architecture with pins facilitated the flow. Thus, the velocity was higher with the chamber of pins, when compared with the separating solution based on the porous membranes filters, which may cause cell/blood clogging due to the low flow velocity observed close to the pores.

The model of microfluidic proposed, although already presenting a favorable 3D geometry, it can be improved, especially in what concerns the effects of the pressure needed to accomplish a homogenous blood/serum mixture, as well as, the effects of vacuum and air release from the module.

Key-Words: Microfluidics, Bio-MEMS, Lab-on-a-chip, Microdevices

Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema geral da filosofia de detecção e conversão de sinal proposta para o dispositivo biomédico	1
Figura 2 - Fluxograma iterativo do processo de I&D aplicado	2
Figura 3 - Perfil de velocidades.....	6
Figura 4 – Representação esquemática da composição do sangue	11
Figura 5 – Representação esquemática do fenómeno que conduz à formação de uma camada livre de células.....	12
Figura 6 – Glicosímetro.....	13
Figura 7 - Biochip para análise de proteínas	13
Figura 8 - Bomba de insulina para sistema de administração de substâncias terapêuticas	14
Figura 9 – Esquema de leitura da câmara.....	15
Figura 10 – Espessura em milímetros do dispositivo.....	16
Figura 11 - Dimensões máximas em milímetros onde a rede microfluídica deve estar compreendida	16
Figura 12 – Modelo CAD 3D da primeira iteração com uma bifurcação	17
Figura 13 – Modelo CAD 3D da segunda iteração com três bifurcações	17
Figura 14 – Modelo CAD 3D da terceira iteração com canais quadrangulares e três bifurcações com curvatura dos canais.....	18
Figura 15 – Modelo CAD 3D da quarta iteração com canais quadrangulares planos e três bifurcações com maior abertura e com curvatura dos canais.....	18
Figura 16 – Modelo CAD 3D da quinta iteração com sete bifurcações.....	18
Figura 17 – Modelo CAD 3D da sexta iteração com igual espaçamento entre canais de alimentação das 8 câmaras de reação	18
Figura 18 – Modelo CAD 3D da sétima iteração com adição da zona de admissão do sangue, zona de filtração e canal de transporte	19
Figura 19 – Modelo CAD 3D da oitava iteração com modificação da curva antes da primeira bifurcação.....	19
Figura 20 – Esquema do modelo CAD 3D do filtro de separação de celulose dos componentes figurados do sangue	20
Figura 21 – Esquema do modelo CAD 3D da filtração através de pinos espaçados dos componentes figurados do sangue	20
Figura 22 - Procedimento de simulação computacional.....	21
Figura 23 - Malha de elementos finitos.....	22
Figura 24 - Malha da solução com pinos.....	22
Figura 25 - Malha da solução com membrana	23
Figura 26 - Polímero Polidimetilsiloxano.....	23
Figura 27 - Modelo CAD 3D final.....	24
Figura 28 - Modelo Fabricado.....	25
Figura 29 - Modelo CAD 3D da amostra com diâmetro de pino 100 µm e 75 µm de espaçamento....	26
Figura 30 – Amostra física com diâmetro de pino 100 µm e 75 µm de espaçamento.....	26
Figura 31 - Impressão 3D.....	26
Figura 32 - Equipamento de microscopia Carl Zeiss AxioTech 100 HD.....	27

Figura 33 - Bomba peristáltica Gilson Minipuls 3	27
Figura 34 – Tubo de centrífuga com água destilada e corante alimentar	28
Figura 35 - Tubo de centrífuga com Na Cl a 0.9% e corante alimentar	28
Figura 36 – Película vedante de Parafilm	28
Figura 37 – Imagem de simulação ANSYS do perfil de velocidades no plano médio no modelo final sem filtração.....	29
Figura 38 – Imagem de simulação ANSYS do caudal mássico no plano das saídas do modelo final sem filtração.....	30
Figura 39 – Imagem de simulação ANSYS do perfil de velocidades no plano médio no modelo final com filtração através de pinos	30
Figura 40 – Imagem de pormenor simulação ANSYS do perfil de velocidades no plano médio junto aos pinos	31
Figura 41 - Imagem de simulação ANSYS do caudal mássico no plano das saídas no modelo final com filtração através de pinos	31
Figura 42 - Imagem de simulação ANSYS do perfil de velocidades no plano médio no modelo final com filtração através de membrana	32
Figura 43 - Imagem de pormenor de simulação ANSYS do perfil de velocidades junto à membrana	32
Figura 44 - Imagem de simulação ANSYS do caudal mássico no plano das saídas no modelo final com filtração através de membrana	33
Figura 45 - Esquema das seções observadas por microscopia ótica	33
Figura 46 – Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da saída da câmara do soro	34
Figura 47 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da entrada da amostra de sangue	34
Figura 48 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da câmara de admissão da amostra do sangue.....	34
Figura 49 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) do rasgo para membrana na câmara de filtração.....	35
Figura 50 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da parede exterior da curva C1 da Figura 45	35
Figura 51 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da parede interior da curva C1 da Figura 45	35
Figura 52 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da curva C2 da Figura 45	36
Figura 53 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da seção A da bifurcação 1 da Figura 45	36
Figura 54 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da seção B da bifurcação B1 da Figura 45	36
Figura 55 – Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) primeira bifurcação da Seção B2 da Figura 45	37
Figura 56 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da segunda bifurcação da Seção B2 da Figura 45.....	37
Figura 57 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da primeira bifurcação da Seção B3 da Figura 45.....	38
Figura 58 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da segunda bifurcação da Seção B3 da Figura 45.....	38
Figura 59 – Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da terceira bifurcação da Seção B3 da Figura 45.....	38
Figura 60 – Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da quarta bifurcação da Seção B3 da Figura 45.....	38
Figura 61 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da câmara de reação.....	39

Figura 62 – Vista lateral da amostra com diâmetro de pino de 600 μm e espaçamento de 250 μm	40
Figura 63 - Vista de topo da amostra com diâmetro de pino de 600 μm e espaçamento de 250 μm ...	40
Figura 64 – Imagem do processo de preenchimento com solução de água destilada e corante alimentar vermelho a um caudal de 4.16 $\mu\text{l.s}^{-1}$	41
Figura 65 – Imagem do preenchimento com aumento do caudal para forçar a saída do ar.....	41
Figura 66 - Imagem da entrada do fluido na câmara de admissão do sangue.....	42
Figura 67 - Imagem do preenchimento do canal.....	42
Figura 68 - Imagem do preenchimento da câmara da filtração.....	43
Figura 69 – Imagem da entrada do escoamento na curva C1	43
Figura 70 - Imagem da entrada do escoamento na bifurcação da seção B1	43
Figura 71 - Imagem da divisão do caudal após a bifurcação da seção B1	43
Figura 72 - Imagem da entrada do escoamento da segunda bifurcação da seção B2	44
Figura 73 - Imagem da entrada do escoamento na primeira bifurcação da seção B2.....	44
Figura 74 - Imagem da entrada do escoamento na terceira e quarta bifurcação da seção B3.....	44
Figura 75 - Imagem da entrada do escoamento na primeira e segunda bifurcação da seção B3	45
Figura 76 - Imagem do preenchimento do primeiro par câmaras de reação.....	45
Figura 77 - Imagem do preenchimento do segundo par de câmaras de reação.....	45
Figura 78 - Imagem do preenchimento do terceiro par de câmaras de reação.....	46
Figura 79 - Imagem do preenchimento completo das câmaras de reação.....	46
Figura 80 - Produto Final.....	48
Figura 81 – Imagem do processo de Micro-Fresagem.....	49
Figura 82 - Esquema de produção por Hot Embossing	49
Figura 83 – Esquema de Montagem	50
Figura 84 - Esquema Geral de Produção.....	50

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1</i> - Forças e campos externos com os quais se pode controlar o escoamento.....	8
<i>Tabela 2</i> - Considerações de concepção para controlo dos escoamentos	9
<i>Tabela 3</i> – Valores de hematócrito considerados normais para o Homem.	12
<i>Tabela 4</i> - Especificações do modelo	15
<i>Tabela 5</i> - Condições de Fronteira	23
<i>Tabela 6</i> – Parâmetros dos pinos das amostras.....	25
<i>Tabela 7</i> – Tabela síntese dos desvios verificados entre cotas nominais e reais.....	40

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Lista de Siglas

3D – Three Dimensional

a – Aceleração (m.s^{-2})

ADN – Ácido Desorribonucleico

BioMEMS – Biological or Biomedical Micro Electro Mechanical System

CAD – Computer-Aided Design

CAE - Computer-Aided Engineering

CFD – Computational Fluid Dynamics

D – Coeficiente de difusão binária entre duas espécies ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)

g – Aceleração gravítica (9.81 m.s^{-2})

Ht – Hematócrito ou quantidade de glóbulos vermelhos (%)

L – Comprimento (m)

LED – Light Emitting Diode

MEMS – Micro ElectroMechanical System

P – Pressão (Pa)

Pe – Número adimensional de Peclet

PMMA - PoliMetil-Metacrilato

Q – Caudal ($\text{m}^3.\text{s}^{-1}$)

r - Raio (m)

Re – Número adimensional de Reynolds

RGB – Red Green Blue

UV – Ultravioleta

v - Velocidade (m.s^{-1})

z - Altura (m)

ρ – Densidade (kg.m^{-3})

τ – Tensão de corte (Pa)

μ - Viscosidade dinâmica (Pa.s)

∇ - Gradiente

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Índice

DEDICATÓRIA	I
AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
LISTA DE SIGLAS	XV
ÍNDICE	XVII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS	1
1.2 DESCRIÇÃO DO TRABALHO	3
2. ESTADO DA ARTE	5
2.1 DINÂMICA DE FLUIDOS	5
2.2 PRÍNCÍPIOS DE MICROFLUÍDICA	7
2.3 PROPRIEDADES REOLÓGICAS DO SANGUE	10
2.4 APLICAÇÕES DE MICROFLUÍDICA NA ENGENHARIA BIOMÉDICA	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 ESPECIFICAÇÕES	15
3.2 MODELAÇÃO COMPUTACIONAL	17
3.3 SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL	20
3.3.1 MALHA DE ELEMENTOS FINITOS	22
3.3.2 CONDIÇÕES DE FRONTEIRA	23
3.3.3 RESOLUÇÃO NUMÉRICA	24
3.4 PRODUÇÃO DO PROTÓTIPO	24
3.4.1 MODELO FÍSICO	24
3.4.2 PROCESSO DE FABRICO	26
3.4.3 MICROSCOPIA ÓTICA	27
3.5 TESTES DE VALIDAÇÃO	27
4. ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	29
4.1 ANÁLISE DOS RESULTADOS DA SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL	29
4.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS	33
4.2.1 RESULTADOS DA MICROSCOPIA	33
4.2.2 RESULTADOS EXPERIMENTAIS	41
4.3 COMPARAÇÃO DE RESULTADOS	46
5. INDUSTRIALIZAÇÃO	47

5.1	PRODUTO FINAL	47
5.2	PROCESSOS DE FABRICO	48
5.2.1	PRODUÇÃO DAS FERRAMENTAS	48
5.2.2	PRODUÇÃO EM MASSA	49
6.	CONCLUSÕES	51
	BIBLIOGRAFIA	55
	ANEXOS	59

1. Introdução

1.1 Enquadramento e Objetivos

A aplicação de dispositivos de microcanais, para distribuição de fluidos biológicos, em sistemas de detecção clínica e médica tem-se vindo a tornar cada vez mais frequente [1]. A presente dissertação descreve a investigação e os trabalhos experimentais que foram necessários ao desenvolvimento de um módulo de micro-fluídica que possa ser utilizado em dispositivos biomédicos, destinado à detecção e/ou monitorização em simultâneo de vários parâmetros fisiológicos, indicadores de determinadas patologias ou condições específicas. Condições como hipoglicemias, estados de alergia, estados anémicos, entre outras, cuja detecção requer habitualmente análises clínicas morosas e colheitas desconfortáveis para o paciente, podem através de dispositivos médicos mais simples e autónomos, acelerar e simplificar o processo de detecção, e torná-lo mais confortável para o utente. Assim, a metodologia de operacionalização subjacente a este dispositivo inclui a deposição de uma pequena amostra de sangue do paciente no módulo de micro-fluídica, onde se encontram já adsorvidos os reagentes necessários à reação das várias detecções bioquímicas, com respetiva conversão de sinal, e visualização de resultados em poucos minutos (Figura 1). O sistema proposto apresenta ainda a vantagem de se poderem multiplicar o número de ensaios e validações realizadas pelos dispositivos.

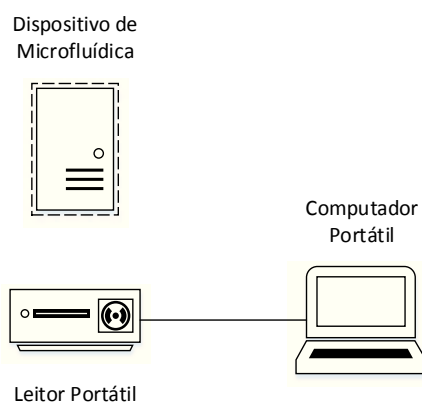


Figura 1 - Esquema geral da filosofia de detecção e conversão de sinal proposta para o dispositivo biomédico

No que concerne ao objeto deste trabalho, o módulo de micro-fluídica recorre a técnicas de separação do plasma e de divisão de caudal para preencher as câmaras de reação, cujo funcionamento é necessário validar com recurso a protótipos funcionais, e a fluidos com propriedades equiparáveis às que serão utilizadas no produto final.

A investigação realizada estudou a dinâmica de fluídos à escala microscópica e, com base nesse estudo, foi concebido um modelo CAD tridimensional, tendo em conta os modelos existentes no mercado e analisado o mesmo virtualmente através da simulação computacional. O desenvolvimento passará pelo fabrico de um protótipo a fim de validar a simulação e verificar o comportamento do escoamento, nomeadamente, o preenchimento correto das câmaras, onde ocorre a reação, e a correta divisão de caudal ao longo da rede microfluídica. O protótipo será produzido através de um processo de prototipagem rápida, cujas características em termos de geométricos e superficiais serão previamente avaliadas com vista à rápida obtenção de um modelo adequado para a realização de testes. A comparação entre os resultados da simulação e os resultados experimentais terá em vista a avaliação de três fatores: a divisão equitativa de caudal, a opção de filtração e a pressão necessária para gerar o escoamento adequado. A Figura 2 representa o fluxograma de ações que se tornaram necessárias realizar para chegar a um modelo físico para efetuar ensaios experimentais, tal como previsto para qualquer projeto de concepção e desenvolvimento.

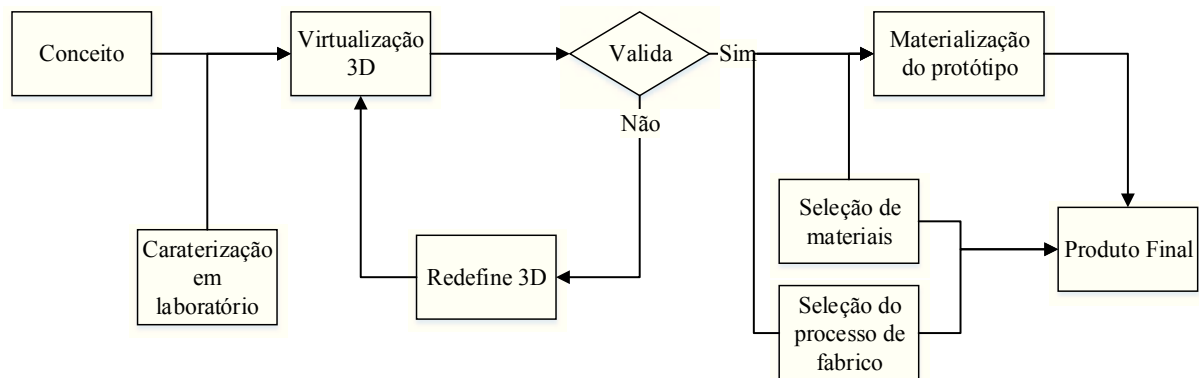


Figura 2 - Fluxograma iterativo do processo de I&D aplicado

1.2 Descrição do Trabalho

No Capítulo 2. Estado da Arte, descreve-se a recolha e análise do estado da arte e produtos semelhantes no mercado. Adicionalmente, abordam-se os aspetos teóricos de dinâmica de fluídos à escala macroscópica e procura-se estudar a mesma à escala microscópica. Ainda, no mesmo capítulo, caracteriza-se o fluido, o sangue, que será aquele que escoará nos canais. Com base na recolha de informação e no estudo dos aspetos dinâmicos do escoamento, procurar-se-á desenvolver, em CAD, uma rede micro-fluídica com várias divisões ou ramos para dividir o caudal inicial equitativamente para oito câmaras de reação.

No Capítulo 3. Materiais e Métodos, analisam-se as especificações e materiais usados na concepção e validação do modelo físico. São descritos também os métodos computacionais e laboratoriais usados para o desenvolvimento de todo o trabalho de investigação. Após a concepção do modelo CAD tridimensional, este foi submetido a simulação em ambiente virtual, através de programa de elementos finitos, seguido de análise de resultados. Para efetuar a simulação estudaram-se e determinaram-se as condições de fronteira, ou seja, propriedades dos materiais, caudal, pressão, entre outros. Ultrapassada a fase de testes de simulação computacional, os materiais foram selecionados, bem como, o processo de fabrico a usar na impressão o protótipo funcional. O modelo físico fabricado foi analisado ao microscópio e posteriormente ensaiado, recorrendo a uma bomba peristáltica, usada na produção de um caudal adequado ao tamanho do modelo.

No Capítulo 4. Análise e Discussão dos Resultados, analisaram-se os resultados obtidos na simulação computacional, bem como, os resultado obtidos nos ensaios experimentais. De seguida procedeu-se a uma análise comparativa para verificar se os resultados na situação real correspondem aos resultados obtidos em ambiente virtual, e proceder à apresentação de justificações possíveis para as disparidades encontradas.

No Capítulo 5. Industrialização, incidiu-se sobre os passos a seguir no futuro para uma produção em massa do modelo. Apresenta-se uma análise geral dos processos de fabrico para produção das ferramentas que, por sua vez, poderão ser usadas para produzir o modelo em massa. Apresenta-se ainda, a sequência de fabrico do módulo e as condições ambientais quer de produção quer de montagem e embalamento.

Por fim, no Capítulo 6. Conclusões, apresentam-se as considerações sobre o modelo testado e aspetos a serem melhorados. Neste capítulo discutem-se ainda características a serem estudadas posteriormente, uma vez que o modelo ainda pode ser sempre alvo de melhoramentos.

2. Estado da Arte

2.1 Dinâmica de Fluidos

A Dinâmica de Fluidos é uma área do conhecimento da Mecânica de Fluidos, que estuda as problemáticas relativas a escoamentos, seus regimes e propriedades. O estudo de um escoamento pode ser externo, em casos de aerodinâmica em transportes aéreos e terrestres, ou interno, em casos de tubagens, condutas, entre outros dispositivos e recipientes [2], [3].

Adicionalmente, para que se possa fazer o estudo de um escoamento é necessário perceber que abordagem se deve fazer ao problema, tendo por base a escala de estudo macroscópica ou microscópica. A maioria dos problemas de engenharia de mecânica dos fluidos enquadra-se na escala macroscópica, o que leva a admitir a validade da “Hipótese do Continuum” [2], [3]. A “Hipótese do Continuum” teoriza que as propriedades de um fluido variam regularmente de ponto para ponto de volume elementar, quer no domínio espacial quer no domínio temporal. Assim sendo, perante esta observação, admite-se que o fluido é um meio contínuo e como tal possibilita a utilização do conceito de derivada na formulação matemática. Contudo, excluem-se desta assunção os gases rarefeitos pois requerem um estudo do comportamento estatístico das moléculas individuais [2].

Os escoamentos são regidos por três leis: Lei da conservação de massa (equação de continuidade), a Lei da conservação da energia (primeira lei da termodinâmica) e a Lei de conservação da quantidade de movimento (segunda lei de Newton). A derivação destas leis, permite obter as Equações de Navier-Stokes que permitem descrever um escoamento de um fluido e estudar a sua distribuição da pressão e a sua da velocidade. Estas equações podem ser apresentadas na forma simplificada como mostra a Equação 1 [2], [3].

$$\vec{\nabla}P = \rho(\vec{g} - \vec{a}) + \mu \nabla^2 \vec{V} \quad (1)$$

A forma simplificada como as equações são apresentadas são válidas para viscosidade dinâmica (μ , Pa.s) constante e densidade (ρ , kg.m⁻³) constante. As mesmas podem adquirir variações consoante o tipo de fluido e o tipo de escoamento em estudo.

Um escoamento pode ser classificado como escoamento laminar ou escoamento turbulento, sendo este identificado através do número de Reynolds (Re) como referência, presente na Equação 2 [2].

$$Re = \frac{\rho * v * L}{\mu} \quad (2)$$

O número de Reynolds é um número adimensional composto pelo quociente entre o produto da densidade (ρ , kg.m^{-3}), velocidade característica do escoamento (v , m.s^{-1}), comprimento característico (L , m) e pela viscosidade dinâmica do fluido (μ , Pa.s). Um número de Reynolds inferior ou igual a 2300 classifica o regime do escoamento como laminar e, quando superior a 2300, como turbulento [2]. Podemos observar na Figura 3 que mediante o tipo de escoamento, o perfil de velocidades varia, ou seja, é uniforme em regime laminar e parabólico em regime turbulento [4].

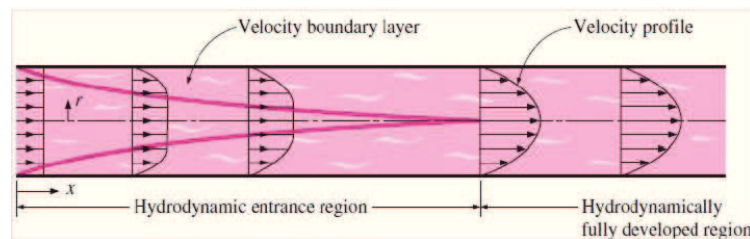


Figura 3 - Perfil de velocidades (Adaptado de Wasim) [4]

Para além do regime de escoamento ser classificado como turbulento ou laminar, ainda podemos classificar o mesmo como permanente ou transitório e como rotacional ou irrotacional. Neste último ponto, por questões de simplificação da formulação matemática, classifica-se o escoamento como irrotacional, desprezando assim a influência da viscosidade.

Adicionalmente, é ainda necessário ter em conta se o fluido é compressível ou incompressível, ou seja, se a densidade se altera ou não com a pressão. Mais uma vez, por uma questão de simplificação, considera-se o fluido incompressível exceto se o mesmo for um gás pois, como possui uma densidade menor de moléculas, quando comprimido este ocupa um volume menor com uma densidade de moléculas maior relativamente ao seu estado anterior.

A aplicação da Lei da conservação da energia, admitindo as simplificações do escoamento irrotacional e incompressível, introduz a Equação de Bernoulli (Equação 3) [2].

$$P + \frac{1}{2}\rho v^2 + \rho gz = \text{constante} \quad (3)$$

A Equação de Bernoulli é composta por três parcelas: o trabalho feito pelas forças de pressão (P, Pa), a energia cinética ($(\rho v^2) \times 2^{-1}$) e a energia potencial (ρgz) por unidade de volume de fluido [2].

A partir desta equação podemos fazer o estudo do escoamento em vários pontos do circuito. Contudo, embora não esteja presente na formulação matemática, as perdas de cargas no circuito são importantes e devem ser contabilizadas aquando da abordagem de um problema real afim dos resultados serem válidos.

Quando um escoamento de um fluido, numa conduta cilíndrica, se encontra em regime laminar e estacionário, isto é, o caudal que passa é constante em regime laminar. O mesmo pode ser dado pela Equação de Poiseuille (Equação 4) [5].

$$Q = \frac{\Delta P \pi r^4}{8 \mu L} \quad (4)$$

Como podemos observar, o caudal (Q, $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) é obtido através do quociente entre a diferença de pressões (ΔP , Pa), aspetos geométricos (π) e raio (r, m) e o comprimento do tubo (L, m) e a viscosidade dinâmica (μ , Pa.s). Reorganizando a mesma fórmula podemos calcular a viscosidade do fluido, caso os outros elementos sejam todos conhecidos.

2.2 Princípios de Microfluídica

A Microfluídica é um ramo da Mecânica de Fluidos, tal como referido acima, que foca o seu estudo na compreensão do movimento dos escoamentos de fluidos, à escala microscópica e dos processos de transporte associados. Por outro lado, a investigação nesta área tem vários desafios pois existem vários fenómenos à escala microscópica que influenciam os escoamentos e produzem efeitos que não seriam previstos à escala macroscópica.

Assim, esta área pode ser subdividida ainda em três áreas: eletrocinética, mistura e dispersão e escoamentos multifásicos. A primeira estuda os escoamentos com o foco na utilização de mecanismos eletromagnéticos para movimentar o mesmo. A área de mistura e dispersão estuda os escoamentos, maioritariamente, através de mecanismos de capilaridade. Contudo, pode-se verificar a utilização também de mecanismos eletromagnéticos para otimizar determinadas propriedades. A área dos escoamentos multifásicos estuda os escoamentos que tenham duas fases misturadas gás-líquido ou líquido-líquido. Neste caso, podemos ter um fluido com a fase líquida e gasosa presentes no mesmo escoamento ou ter uma emulsão de dois fluidos. Em ambas as áreas, a abordagem aos casos em estudo parte da assunção do *continuum* e dá-se atenção aos efeitos que ocorrem nas superfícies e aos aspetos geométricos do canal do dispositivo [6], [7].

Por outro lado, para manipular e controlar escoamentos a uma escala mais pequena de trabalho, há que conhecer as forças e campos externos que influenciam os mesmos e ter em conta não só as propriedades do fluido, mas também as características geométricas e as propriedades do material utilizado no fabrico do canal ou rede de canais do dispositivo [6].

Em termos físicos, existem vários campos externos que podem influenciar na manipulação dos fluxos tais como a pressão, campos elétricos, campos magnéticos, capilaridade, entre outros. A Tabela 1 lista, de forma sumária, as forças e campos externos que influenciam os escoamentos [6].

Tabela 1 - Forças e campos externos com os quais se pode controlar o escoamento (Adaptado Stone et al.)[6]

Força condutora / Campo externo	Subcategoria
Gradiente de Pressão ∇p	-
Efeitos da Capilaridade	Tensão Superficial γ
	Térmica
	Elétrica
	Gradiente de Tensão Superficial $\nabla\gamma$
	Química
Campos Elétricos E	Térmica
	Elétrica
	Ótica
Campos Magnéticos / Forças de Lorentz	Electro-osmose CC
	Electro-osmose CA
	Dielectroforese / “Electrowetting”
Rotação	Agitação Magneto-hidrodinâmica
Som	Forças Centrifugas
	Transmissão Acústica

Tal como listado anteriormente, várias são as forças com que se pode controlar o escoamento de um fluido e vários são os fatores que podem influenciar essas propriedades, nomeadamente como se indica de seguida. Os efeitos da capilaridade permitem o movimento do fluido através de alterações espaciais do gradiente das tensões superficiais por via elétrica, térmica, química e ótica, bem como, a modificação das propriedades de adesão (*wetting*), como o ângulo de contacto [6]. No caso dos efeitos dos campos elétricos, a Electro-osmose é um mecanismo pelo qual o escoamento se movimenta em relação a uma zona de fronteira carregada eletricamente. Já na Dielectroforese, a movimentação do fluido é efetuada pela força aplicada, através de um gradiente de um campo elétrico, às partículas presentes no fluido [6]. Em relação à utilização da rotação e, por conseguinte, as forças centrífugas remetem-nos para os dispositivos conhecidos como *Lab-on-a-CD*, nos quais podemos verificar que o escoamento é auxiliado pelas mesmas por forma a atingir o fim da rede microfluídica [8]. Seja qual for o método utilizado para controlar o escoamento, o estado da superfície e as suas propriedades tornam-se importantes de serem estudados, em especial a rugosidade e o atrito resultante, por forma a garantir um controlo adicional. Assim, a Tabela 2 sintetiza aspetos quer do foro geométrico, quer das propriedades dos materiais, a ter em conta na construção dos microdispositivos.

Tabela 2 - Considerações de concepção para controlo dos escoamentos (Adaptado Stone et al.)[6]

Características e propriedades		
Geométricas	Químicas	Mecânicas
Conectividade de rede	Adesão (Wettability)	Materiais duros
Secção e curvatura do canal	Carga superficial	Materiais elásticos
Topografia da superfície	Afinidade química	Géis
Porosidade	Sensibilidade ao Ph e capacidade de ionização	Materiais porosos

Geralmente, os escoamentos, à escala microscópica, caracterizam-se tipicamente como laminares, com baixo número de Reynolds ($Re < 2300$) e com uma baixa difusão de macromoléculas e partículas ou seja, elevado número de Peclet ($10 < Pe < 10^5$) [6]. Este número, à semelhança do número de Reynolds, é composto por um quociente entre a velocidade característica do escoamento (v), comprimento característico (L) e coeficiente de difusão binária entre espécies (D), como mostra a Equação 5 [6], [7], [9].

$$Pe = \frac{v * L}{D} \quad (5)$$

Num escoamento laminar, o perfil de velocidades esperado pode ser parabólico, nos casos do controlo com pressão; uniforme nos casos de electro-osmose ou ainda uma sobreposição de ambos, nos casos mais gerais. Em caso em que o número de Reynolds é baixo, a turbulência é praticamente inexistente, facto que leva a dificuldades de mistura e por conseguinte, aumenta o comprimento e o tempo necessários para ocorrer a mistura. Como forma de resolver este problema, recorre-se à geração de fluxos transversais, através de meios passivos ou ativos, para facilitar a difusão do soluto [6].

Os escoamentos podem ser descritos pelas equações de Navier-Stokes com as condições de incompressibilidade do fluido e não escorregamento na parede, dando resultados bastantes próximos da realidade [6]. No entanto, devido à miniaturização dos dispositivos e à diminuição da escala de trabalho, devem ser feitas análises ao escoamento e identificar eventuais fenómenos que surjam junto às bifurcações e junto às paredes. Para observar e analisar os escoamentos, são geralmente utilizadas técnicas microscópicas como a microPIV (*micro-Particle Image Velocimetry*), a microscopia de fluorescência ou a microscopia de fluorescência confocal. A utilização de técnicas mencionadas, permite observar o comportamento do escoamento e o seu perfil de velocidades [6], [10]–[12].

2.3 Propriedades Reológicas do Sangue

O sangue, ao contrário dos fluídos de uso corrente em engenharia, é um fluido composto por vários componentes tais como: plasma, eritrócitos ou glóbulos vermelhos, leucócitos ou glóbulos brancos, plaquetas entre outros. O plasma representa cerca de 55% da composição do sangue, e pode ser descrito por água (91%), proteínas (7%) e outros solutos (2%). Das proteínas presentes, 58% são Albuminas, 38% Globulinas e 4% Fibrinogénio [13]. Dos outros solutos encontrados, podemos identificar iões, nutrientes, produtos de degradação, gases e substâncias reguladoras [13]. Os restantes 45% da composição sanguínea são representados pelos eritrócitos (4,2 – 6,2 milhões de células por microlitro), leucócitos (5 – 9 milhares de células por microlitro) e plaquetas (250 – 400 milhares de células por microlitro) [13]. Entre os leucócitos podemos encontrar neutrófilos (60 – 70%), linfócitos (20 – 25%), monócitos (3 – 8%), eosinófilos (2 – 4%) e basófilos (0,5 – 1%) [13]. A Figura 4 esquematiza a composição sanguínea descrita anteriormente.

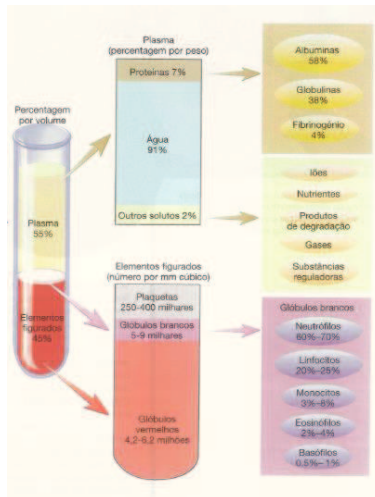


Figura 4 – Representação esquemática da composição do sangue (Adaptado Seeley et al.)[13]

Esta diversidade de componentes presentes, com diferentes propriedades química e físicas, confere à viscosidade do fluido um comportamento diferente, classificando-o como um fluido não-Newtoniano, ou seja, não possui uma viscosidade constante [14], [15]. Deste modo, o comportamento da viscosidade não segue a formulação da Equação 6, que demonstra que a viscosidade tende a ter um valor constante devido à tensão de corte no fluido ser proporcional ao gradiente de velocidade na sua direção normal, válida para os fluidos Newtonianos [10].

$$\tau = \mu \frac{\partial u}{\partial y} \quad (6)$$

Em termos de propriedades reológicas, o sangue pode ser caracterizado de forma sumária com uma densidade de $\rho = 1.0595 \times 10^3 \text{ kg.m}^{-3}$ [10] e uma viscosidade dinâmica de $\mu = 4 \times 10^{-3} \text{ Pa.s}$ [10]. A viscosidade do sangue pode ser definida, essencialmente, por duas componentes: a viscosidade do plasma e o volume de percentagem dos glóbulos vermelhos presentes no sangue. Para além destes componentes, o sangue também sofre a influência da capacidade de deformação dos glóbulos vermelhos e da orientação e agrupamento dos mesmos, consoante o gradiente de velocidades. Neste último caso, velocidades baixas tendem a agrupar glóbulos vermelhos sem orientação preferencial o que leva ao aumento da viscosidade. Nas condições opostas, as velocidades elevadas levam os glóbulos vermelhos a orientarem-se segundo as linhas de corrente, evitando o agrupamento dos mesmos e diminuindo a viscosidade do sangue [10].

Para determinar, de forma mais simplificada, a viscosidade sanguínea tendo em conta o hematócrito, isto é, a quantidade de glóbulos vermelhos presentes no sangue, utilizamos uma formulação proposta por Einstein que é apresentada na Equação 7 [10].

$$\mu = \mu_{plasma} * (1 + 2.5Ht) \quad (7)$$

A equação 7, que determina a viscosidade do sangue, é composta pela viscosidade do plasma ($\mu = 1.39 \times 10^{-3}$ Pa.s) [16] e a quantidade de glóbulos vermelhos presentes no sangue em percentagem (Ht, %). Na Tabela 3, podemos encontrar o hematócrito normal, de acordo com idade e género, para os quais podemos obter a sua viscosidade aplicando a Equação 7 [13].

Tabela 3 – Valores de hematócrito considerados normais para o Homem.

Género	Hematócrito normal em milhões de células/microlitro (%)	Viscosidade (mPa.s) *
Homem	4.8 – 6.2 (40 – 54)	2.78 – 3.27
Mulher	4.2 – 5.4 (38 – 47)	2.71 - 3.02

Legenda: *viscosidade calculada através das percentagens de hematócrito e viscosidade do plasma mencionado

Além da quantidade de glóbulos vermelhos e do gradiente de velocidades, a diminuição do diâmetro do canal em que o sangue circula leva à diminuição da sua viscosidade. Este efeito é designado como “*Efeito Fahraeus – Lindqvist*” e o mesmo demonstra que a viscosidade diminui devido aos eritrócitos tenderem a ocuparem uma posição central no escoamento, deixando uma camada de plasma junto às paredes (Figura 5) [5], [17].

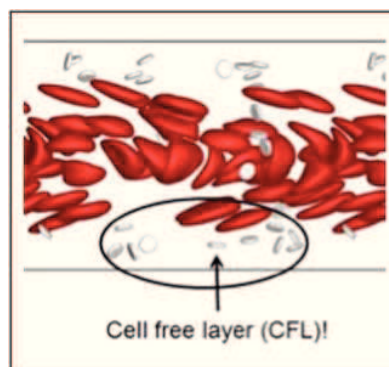


Figura 5 – Representação esquemática do fenômeno que conduz à formação de uma camada livre de células (Adaptado de Narsimhan) [17]

2.4 Aplicações de Microfluídica na Engenharia Biomédica

A Microfluídica, aplicada à área da Engenharia Biomédica, apresenta uma vasta gama de microdispositivos conhecidos como *BioMEMS* (*Biomedical or Biological Micro-Electro-Mechanical Systems*) [18]. Estes, quando utilizados por dispositivos ou sistemas integrados, são conhecidos também por *Lab-on-a-chip/Lab-on-a-CD* ou ainda *microTAS* (*micro-Total Analysis Systems*) [19]. Os *BioMEMS*'s podem ter como finalidades efetuar diagnósticos clínicos, administrar terapêuticas prescritas, entre outras [1], [19].

No primeiro caso, os dispositivos têm a função de produzir um diagnóstico clínico mediante a recolha de uma amostra de um fluido biológico. Após a amostra de fluido ter sido recolhida, esta segue por microcanais que a conduzem a câmaras de reação. Nestas, está presente um composto reagente que, na presença de determinada substância, desencadeará uma reação química que posteriormente será detetada e avaliada por um sistema que gerará uma resposta inteligente para o utilizador. A detecção pode ser geralmente de três tipos, detecção mecânica, elétrica ou ótica. Como exemplo deste género de dispositivos temos os biossensores genéricos nos quais se enquadram os glicosímetros ou aparelhos de medição da glicemia (Figura 6), os dispositivos de teste de gravidez ou dispositivos para análise de ADN e proteínas (Figura 7) [18]–[21].



Figura 6 – Glicosímetro (Adaptado de *BioMEMS Applications Overview*) [18]



Figura 7 - Biochip para análise de proteínas (Adaptado de *BioMEMS Applications Overview*) [18]

No segundo caso, os dispositivos administram substâncias químicas para fins terapêuticos. Estes são compostos por duas zonas atuantes, a primeira zona tem a função de analisar determinado parâmetro, à semelhança dos dispositivos de diagnóstico, e a segunda zona administrar a terapêutica prescrita ao utente, de acordo com a sua condição clínica. O sinal emitido pela zona de diagnóstico é enviado diretamente para a segunda zona do dispositivo que, mediante a calibração do mesmo, administra a substância prescrita. Esta última zona é, geralmente, composta por um reservatório e uma micro-bomba. As micro-bombas encontradas nestes dispositivos podem ser mecânicas, piezoelétricas, electrostáticas, eletroquímicas, magnéticas, entre outras. Como exemplo deste caso, temos os dispositivos implantados no organismo para insulino-dependentes ou aplicação de outras substâncias terapêuticas (Figura 8) [18], [22], já muito utilizados no mercado.

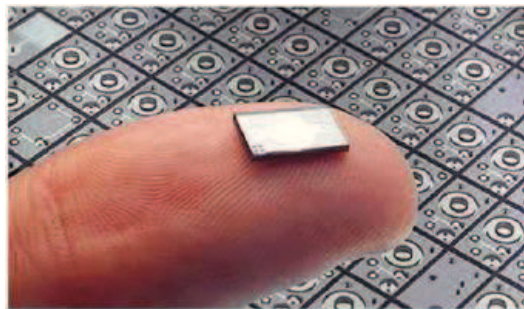


Figura 8 - Bomba de insulina para sistema de administração de substâncias terapêuticas (Adaptado de *BioMEMS Applications Overview*) [18]

Assim, o presente estudo propõe a criação de um dispositivo modular, aplicável a aparelhos que possam ser usados para fins de diagnóstico e/ou terapêutica que permitam a realização de oito reações de deteção fisiológica ou clínica. A ampliação do número de ensaios pode por um lado aumentar o número de réplicas, reprodutibilidade e precisão da deteção, e por outro aumentar o número de biomoléculas detectadas.

3. *Materiais e Métodos*

3.1 Especificações

A concepção do modelo 3D teve por base as especificações solicitadas para elaborar o mesmo. Estas não são imutáveis e podem sofrer alterações com os sucessivos aperfeiçoamentos do modelo. A Tabela 4 apresenta sumariamente as especificações do trabalho de concepção.

Tabela 4 - Especificações do modelo

Especificação		
Número de câmaras de reação		8
Volume das câmaras (μl)		5
Largura mínima das câmaras (mm)		2
Volume de soro para diluição (μl)		250 - 300
Dimensões	Comprimento máximo da rede micro-fluídica (mm)	85
	Largura máxima da rede micro-fluídica (mm)	55
Método de Detecção Ótico		Colorimetria/Sensor RGB

A Figura 9 apresenta o esquema da forma de leitura idealizado para as câmaras de reação. A metodologia de detecção tem por base uma identificação do sinal bioquímico através de um sensor RGB que identifique o aparecimento (sinal positivo) ou não (sinal negativo) de uma mudança de cor associada à produção de um novo complexo, composto químico ou bioquímico. Assim, de acordo com as especificações referidas na tabela anterior, as mesmas têm de ter uma largura mínima para que a leitura possa ser efetuada com sucesso pelo sensor RGB, à semelhança de outros dispositivos de detecção comercializados.

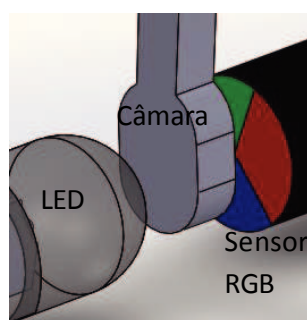


Figura 9 – Esquema de leitura da câmara

Além das especificações anteriormente descritas, ainda se tem que ter em conta as propriedades do material a ser usado. Este deve ser transparente ou translúcido e, como tal, a espessura do mesmo tem de ser o mais reduzida possível para facilitar a leitura pelo sensor RGB. A Figura 10 apresenta as dimensões e espessura desejável para o dispositivo de microfluídica, sendo este idealizado em duas placas, a placa de base com a rede microfluídica e a placa da tampa.

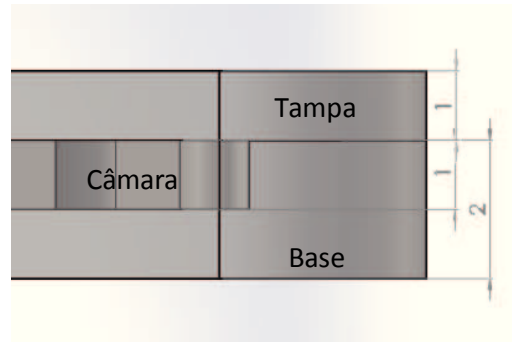


Figura 10 – Espessura em milímetros do dispositivo

As dimensões máximas do dispositivo devem aproximar-se também do tamanho considerado *standard* de um cartão multibanco, ou objeto de dimensões semelhantes, como se apresenta na Figura 11, tendo em vista a facilidade da sua portabilidade.



Figura 11 - Dimensões máximas em milímetros onde a rede microfluídica deve estar compreendida

Ainda como especificação inicial do produto temos a questão do dispositivo ter uma zona de filtração que terá a função de separar as células do plasma, cujas dimensões podem variar entre 10 μm e 100 μm . A solução para esta especificação deve passar por um estudo de alternativas e verificar as vantagens e desvantagens de ambas.

3.2 Modelação Computacional

O modelo CAD tridimensional da rede de microfluídica foi concebido através de um processo iterativo de constante aperfeiçoamento, utilizando para o efeito o *software* CAD Solidworks. Inicialmente, partiu-se de um modelo com uma bifurcação e com os canais com uma face redonda e sem curvatura, tal como apresentado na Figura 12. De acordo com a reprodução da realidade (em termos de sistema cardiovascular) o ideal seria fazer uso de geometrias cilíndricas para o desenho dos canais, contudo, dada a sua dificuldade de fabrico, encontrou-se uma solução intermédia através do uso de formas em semicircunferência. A Figura 12 ilustra o resultado das escolhas iniciais na primeira iteração de modelação.

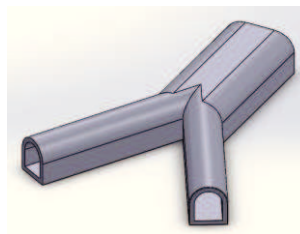


Figura 12 – Modelo CAD 3D da primeira iteração com uma bifurcação

Uma vez seleccionada a geometria de desenho dos canais, procedeu-se à adição de mais duas bifurcações, tal como se representa na Figura 13, com o objetivo de ir progredindo até atingir as oito terminações finais que irão alimentar as câmaras de reação.

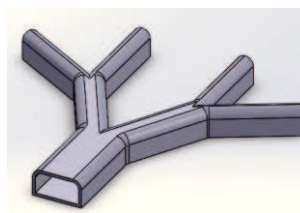


Figura 13 – Modelo CAD 3D da segunda iteração com três bifurcações

Na terceira e quarta iteração, ilustradas pela Figura 14 e Figura 15, chegámos a um ponto de mudança de paradigma, no sentido de ter uma seção do canal quadrada que simplificaria o posterior processo de fabrico do protótipo.

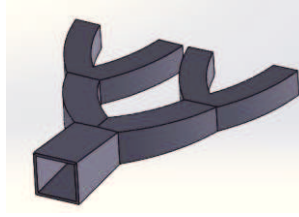


Figura 14 – Modelo CAD 3D da terceira iteração com canais quadrangulares e três bifurcações com curvatura dos canais

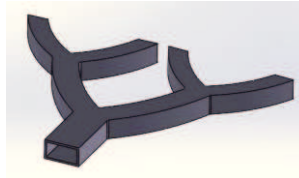


Figura 15 – Modelo CAD 3D da quarta iteração com canais quadrangulares planos e três bifurcações com maior abertura e com curvatura dos canais

A progressão na concepção do modelo foi orientada, gradualmente, com vista attingir a arquitetura de oito canais, para alimentar a mesma quantidade de câmaras de reação. A Figura 16 mostra o desenho que permitiu o attingir desse objetivo, embora se note que ainda falta garantir um espaçamento igual entre as todas saídas.



Figura 16 – Modelo CAD 3D da quinta iteração com sete bifurcações

A garantia de termos um espaçamento idêntico em todas as saídas foi conseguida à sexta iteração, eliminando assim um fator que pudesse interferir na distribuição de fluxos e afetar os resultados da simulação. Podemos observar essa alteração na Figura 17.

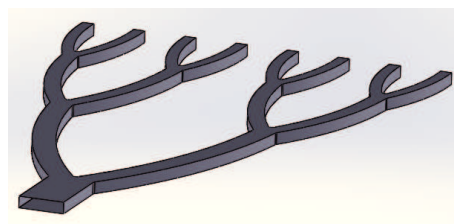


Figura 17 – Modelo CAD 3D da sexta iteração com igual espaçamento entre canais de alimentação das 8 câmaras de reação

Tratada a rede de divisão e distribuição do caudal, foi desenvolvido o canal que recebe a amostra do sangue e do soro. Este canal deveria idealmente ter também uma zona de filtração, que será discutida mais adiante, em relação à solução a ser testada. Na sétima e oitava iteração, Figura 18 e Figura 19 respetivamente, podemos observar a configuração do referido canal que apresenta, primeiramente, a entrada de onde virá o soro, seguida da câmara de admissão do sangue e da câmara responsável pela filtração.

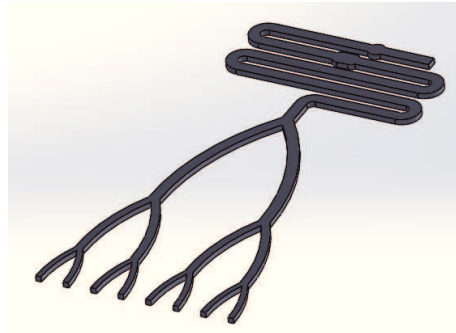


Figura 18 – Modelo CAD 3D da sétima iteração com adição da zona de admissão do sangue, zona de filtração e canal de transporte

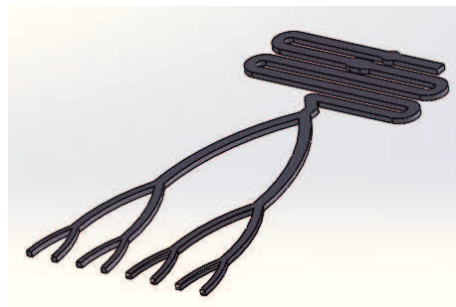


Figura 19 – Modelo CAD 3D da oitava iteração com modificação da curva antes da primeira bifurcação

No que se refere à câmara de filtração, foram equacionadas duas soluções possíveis: filtração através de uma membrana de celulosa com porosidade de $0.22\ \mu\text{m}$ e filtração através da colocação de pinos espaçados. Ambas já testadas previamente em outras arquiteturas igualmente destinadas ao escoamento de sangue [15]. No primeiro caso, apresentado na Figura 20, a filtração efetuada através da membrana de celulose apresenta uma elevada eficácia na capacidade de filtrar as células (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) presentes no sangue contudo, revela possibilidade de entupimento, limitando a pressão que pode ser exercida no fluido e acrescenta o facto de ser um elemento adicional a ser montado após o fabrico do modelo. No entanto é uma solução que pode ser adotada, *a posteriori* dos ensaios experimentais, e ainda considerada como válida.

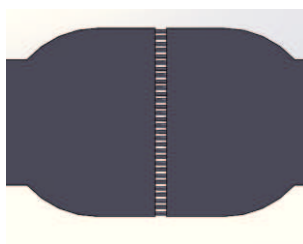


Figura 20 – Esquema do modelo CAD 3D do filtro de separação de celulose dos componentes figurados do sangue

No segundo caso, apresentado na Figura 21, a filtração através de pinos colocados com determinado espaçamento entre eles demonstra, *a priori*, uma menor eficácia na capacidade de filtração visto que os pinos, devido à sua esbelteza, têm de ser controlados dimensionalmente para garantir que a sua construção não cause obstruções demasiado restritivas ao fluxo. Esse controlo dimensional pode ser garantido através do estudo de abatimento e dilatação lateral dos pinos, dimensionando o espaçamento tendo em conta este último fator. Contudo, esta solução apresenta a vantagem de ser fabricada ao mesmo tempo que o modelo, levando assim a que a questão de um elemento adicional de montagem não se coloque, como uma dificuldade do eventual processo de fabrico e industrialização.

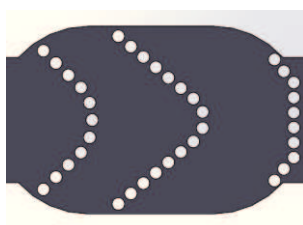


Figura 21 – Esquema do modelo CAD 3D da filtração através de pinos espaçados dos componentes figurados do sangue

3.3 Simulação Computacional

A Simulação Computacional é um procedimento experimental que nos permite testar modelos CAD tridimensionais em ambiente virtual, evitando a construção desnecessária em várias tentativas de vários modelos físicos e por conseguinte, evitando desperdício de material. Com isto podemos implementar melhorias contínuas antes de fabricar fisicamente o modelo pretendido, eliminando assim uma grande quantidade de defeitos ou falhas que poderiam advir do modelo protótipo, devido à atempada previsão de efeitos, com consequente minoração da sua magnitude.

Os ensaios de simulação computacional foram efetuados com recurso ao programa ANSYS, conduzidos no laboratório de Engenharia Assistida por Computador (Departamento de Engenharia mecânica, ESTG-IPL), e fizeram uso das ferramentas e dos *solver's* de simulação disponíveis e considerados mais adequados. Os ensaios de simulação foram aplicados à geometria CAD previamente modelada, e conduzidos em diferentes fases-teste, que compreenderam numa primeira fase, a simulação com solvente água, à qual se seguiriam os solventes “soro fisiológico” e “soro fisiológico com partículas esféricas”, com vista a simular as componentes reais do sangue. Para este propósito escolhemos efetivamente o *software* ANSYS para simular o escoamento do fluido nas várias iterações que o modelo foi sofrendo. O *software* ANSYS apresenta vários *solver's* de CFD que podem simular e auxiliar na análise de escoamentos, tais como o *solver* CFX e o *solver* Fluent. Entre estes dois *solver's*, e com base em aspetos e conclusões de *Glatzel et al (2008)*, escolhemos o *solver* Fluent para realizar todo o procedimento de simulação computacional devido a este possuir a capacidade de resolver casos com fenómenos de capilaridade [9]. Para efetuarmos a simulação computacional, procedemos do modo descrito pela Figura 22 a fim de obtermos resultados válidos e passíveis de serem analisados.

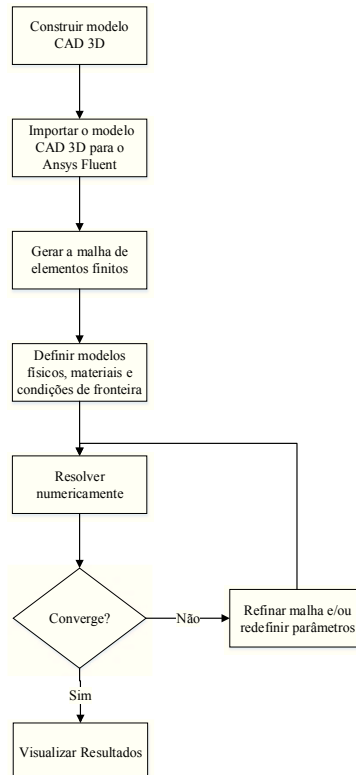


Figura 22 - Procedimento de simulação computacional

3.3.1 Malha de Elementos Finitos

O procedimento da simulação, após a construção e importação do modelo, inclui uma primeira etapa extrema relevância que consiste na construção da malha de elementos finitos. A mesma deve ser construída com critério e rigor, passando por etapas de refinamento, a fim de se obterem resultados fidedignos. Por refinamento da malha entende-se o tratamento e controlo quer do tamanho dos elementos e/ou a quantidade de elementos, quer a disposição dos mesmos. Quanto maior o número de elementos e menor o seu comprimento, mais precisos serão os resultados relativos à realidade em estudo.

Na construção da malha, apresentada na Figura 23, foram tidos em conta todos os pressupostos necessários e procurou-se atingir um tamanho de elemento, o mais pequeno possível, e que o mesmo estivesse dentro da capacidade de processamento do equipamento à disposição. Com este fim, conseguimos definir, após verificarmos simulações com comprimentos de elemento cerca de 300 μm , 250 μm e 200 μm , um tamanho de 150 μm visto que a partir deste comprimento, os resultados dos parâmetros em análise apenas variam na quarta casa decimal. Contabilizámos um número de elementos tetraédricos, cerca de 670.000 para a oitava iteração sem sistema de filtração implementado, 700.000 elementos para a mesma iteração com a solução dos pinos (Figura 24) e 1.800.000 elementos para a iteração com a solução da membrana (Figura 25).

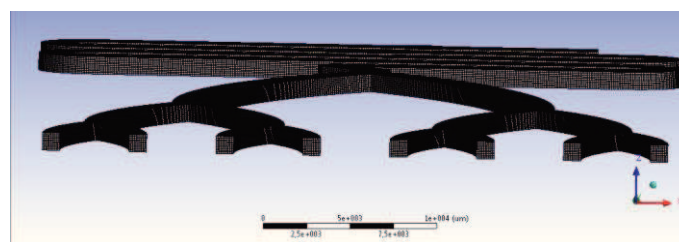


Figura 23 - Malha de elementos finitos

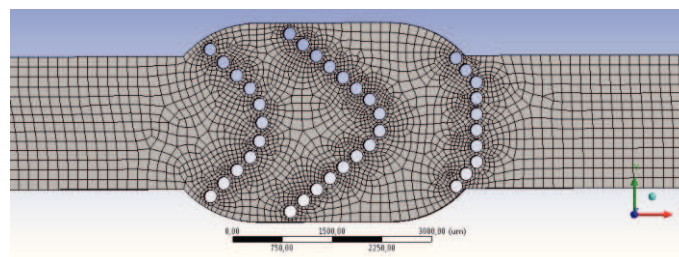


Figura 24 - Malha da solução com pinos

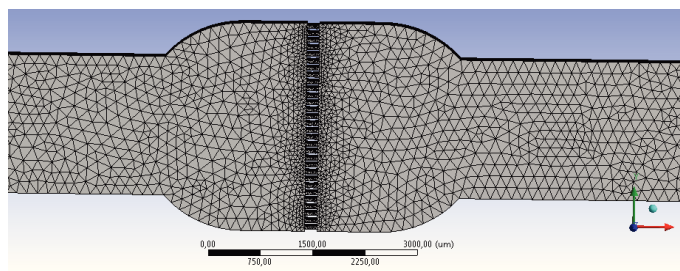


Figura 25 - Malha da solução com membrana

3.3.2 Condições de Fronteira

A segunda etapa do processo de simulação diz respeito à definição das condições de fronteira. Assim a etapa seguinte à construção da malha é a etapa da definição das condições de fronteira, ou seja, a etapa que permite, designadamente: I) definir modelos físicos que se aplicam ao caso em estudo; II) definir fenómenos como aqueles que se geram junto à parede, III) definir entradas e saídas e suas características e IV) definir os materiais envolvidos e, por sua vez, as propriedades físicas e mecânicas destes materiais.

Tabela 5 - Condições de Fronteira

Condição	Propriedade/Característica	
Solver	Tipo	Baseado na pressão (Por defeito do software)
	Velocidade	Absoluta (Por defeito do software)
	Tempo	Permanente (Por defeito do software)
Modelo de Escoamento	Laminar	
Fluido	Água	
Sólido	Polidimetilsiloxano (PDMS)	
Fenómeno na Parede	Não-eskorregamento	
Entrada	Caudal mássico $4.16 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{s}^{-1}$ ($250 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$)	
Saída	Pressão relativa 0 Pa	

O material escolhido para simular virtualmente foi o PDMS [23] visto ser um polímero muito usado em várias aplicações biomédicas e já testado em vários trabalhos científicos, devido às suas propriedades óticas e de biocompatibilidade com fluidos e materiais biológicos [24]. Ainda, este material, cujo monómero se identifica na Figura 26, pode ser um potencial candidato a ser selecionado para o posterior processo de industrialização.

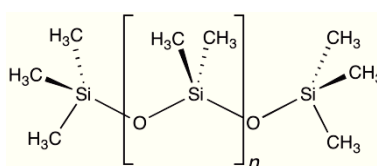


Figura 26 - Polímero Polidimetilsiloxano (Adaptado de physicscentral) [25]

3.3.3 Resolução Numérica

O caso em estudo compreende um sistema de equações não lineares a serem resolvidas e, pretendendo atingir esse objetivo, utilizamos um processo iterativo de cálculo. Para isso, o programa utiliza, na discretização espacial, o método dos mínimos quadrados, que procura minimizar a soma dos quadrados das diferenças, ou resíduos, entre valor estimado e valor observado. Essa minimização é feita até se atingir um critério de paragem ou de convergência que se encontra definido no *software*, e que geralmente se utiliza, da seguinte forma: $|\text{Erro relativo}| < 10^{-4}$. Esta imposição indica-nos que o valor do erro se encontra na quarta casa decimal. Ainda na discretização espacial, utilizamos numa primeira abordagem a opção *First Order Upwind* na resolução do cálculo, por sugestão do *software* posteriormente comprovada, utilizamos a opção *Second Order Upwind* que tinha como finalidade o aumento da precisão do cálculo numérico. Nestas condições, os ensaios de simulação decorreram em períodos de tempo que variaram de cerca de alguns minutos a uma hora.

3.4 Produção do Protótipo

3.4.1 Modelo Físico

O modelo físico foi construído com base no modelo CAD 3D final, apresentado na Figura 27, constituído por dois componentes, a) a placa de base com a rede de microcanais e b) a placa superior ou tampa. A placa de base é composta por toda a rede micro-fluídica, um canal de escape do ar e duas cavidades cónicas que servem de auxílio ao posicionamento correto. A placa superior ou tampa é composta pelos pinos cónicos de fixação e por dois orifícios, o maior tem a função de possibilitar o acesso à bolsa de soro e efetuar a pressão na mesma e o menor tem a função de admitir a amostra de sangue a ser analisada.

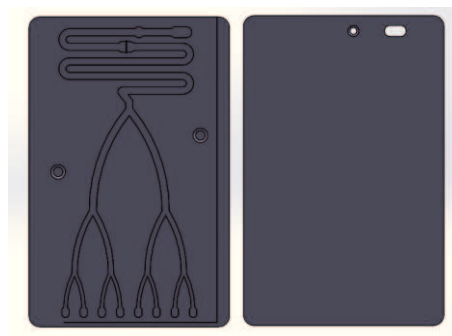


Figura 27 - Modelo CAD 3D final

Antes do fabrico propriamente dito, tivemos que seleccionar o material que cumprisse com as especificações de um material polimérico, transparente, com um fino acabamento superficial, uma boa estabilidade dimensional e uma relativa rigidez para suportar os ensaios e todo o tipo de manuseamento que os mesmos pudessem receber. Com este objetivo presente, seleccionámos, com apoio técnico [26], um material identificado com o nome de *VeroClear* (em anexo) que cumpria as nossas necessidades [27]. Posto isto, obtivemos o modelo físico que a Figura 28 apresenta.

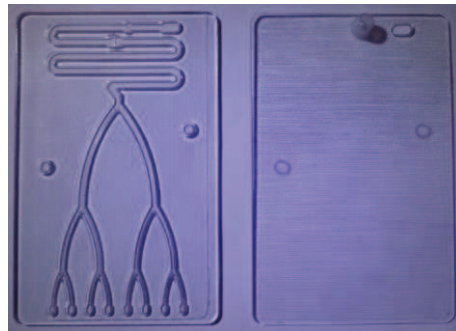


Figura 28 - Modelo Fabricado

Em paralelo, trabalhámos também a solução de filtração com pinos e passamos à impressão 3D de amostras, a serem posteriormente analisadas. A Tabela 6 lista o número de amostras produzidas, e parâmetros que foram sendo alterados, por forma a produzir uma estrutura com o design e dimensões apropriadas para os pinos e respectivo espaçamento.

Tabela 6 – Parâmetros dos pinos das amostras

Diâmetro do Pino (μm)	Espaçamento (μm)
100	75
	100
	100
600	150
	200
	250
	100
800	150
	200
	250
	250

Na Figura 29, apresenta-se um esquema do modelo CAD 3D de uma das amostras referidas na tabela anterior e na Figura 30, uma imagem da amostra impressa.

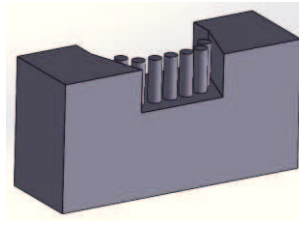


Figura 29 - Modelo CAD 3D da amostra com diâmetro de pino 100 μm e 75 μm de espaçamento

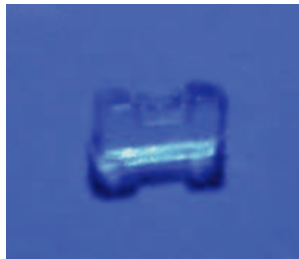


Figura 30 – Amostra física com diâmetro de pino 100 μm e 75 μm de espaçamento

3.4.2 Processo de Fabrico

O protótipo e as amostras foram fabricados através de um processo de fabrico de prototipagem rápida conhecido como Impressão 3D (Figura 31). Este processo de fabrico enquadra-se no tipo aditivo, ou seja, é feita uma adição sucessiva de material até concluir o modelo levando assim a uma eliminação de resíduos ou desperdícios de material. O processo de fabrico caracteriza-se pela deposição, orientada com base no modelo CAD 3D construído, de material polimérico fotossensível à radiação UV, e de material de suporte com a finalidade de sustentar o material da peça ao redor de cavidades ou zonas ocas. Em seguida, o material depositado é curado pela radiação UV levando à sua solidificação. Este procedimento é repetido sucessivamente, camada a camada, até à conclusão da peça. No final retira-se o material de suporte manualmente ou através de um solvente [28]. Todo o processo foi realizado no equipamento da Stratasys Object 30 descrito em anexo [29].

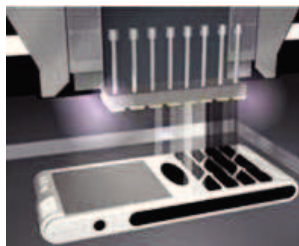


Figura 31 - Impressão 3D (Adaptado de Stratasys) [28]

3.4.3 Microscopia Ótica

Uma vez com o protótipo fabricado tornou-se necessário proceder à sua avaliação e verificar os aspetos derivados do fabrico, através de uma análise microscópica. Para o efeito, recorreremos ao equipamento de microscopia ótica *Carl Zeiss Axiotech 100 HD* com câmara fotográfica, apresentado na Figura 32. Verificámos qual a lente melhor calibrada para a análise, neste caso foi a que amplia 10x, e inspecionámos as várias câmaras presentes na rede microfluídica bem como as várias bifurcações e seções anotadas, efetuando posteriormente a medição de várias cotas nas mesmas, por forma a verificar se existiram falhas no processamento do material.



Figura 32 - Equipamento de microscopia Carl Zeiss Axiotech 100 HD

3.5 Testes de Validação

A elaboração dos testes de validação implica gerar um caudal igual ou próximo daquele introduzido como condição de fronteira na simulação computacional. A reprodução da simulação em condições reais, para a satisfação de um caudal idêntico ao da simulação computacional ($250 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1} = 4.16 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$), foi conseguida através da utilização de uma bomba peristáltica (Figura 33), de marca *Gilson*, modelo *Minipuls 3*. A bomba peristáltica apresentou uma resolução de duas casas decimais na leitura da velocidade angular, como tal ajustou-se a mesma aproximadamente 1,11 RPM, com o intuito de produzir o caudal pretendido.



Figura 33 - Bomba peristáltica Gilson Minipuls 3

Nos ensaios experimentais foram utilizadas duas soluções com propriedades reológicas semelhantes às do plasma designadamente: solução de água destilada com corante alimentar (Figura 34) e solução de soro fisiológico, em condições isotónicas, com NaCl a 0.9% e corante alimentar (Figura 35). A utilização do corante apenas teve a finalidade de obter uma coloração visualmente identificável durante a observação dos ensaios.



Figura 34 – Tubo de centrifuga com água destilada e corante alimentar



Figura 35 - Tubo de centrifuga com Na Cl a 0.9% e corante alimentar

No que concerne aos aspetos de vedação da abertura e da zona de união das placas, utilizámos uma película de plástico extensível, de marca *Parafilm* (Figura 36), fita bi-adesiva comum. A película de *Parafilm* serviu como vedante das laterais das placas, junto à união das mesmas. A fita bi-adesiva foi cortada sucessivamente e unida lateralmente até formar uma película com a área da superfície de junção, com vista à união uniforme das duas placas.



Figura 36 – Película vedante de Parafilm

4. Análise e Discussão dos Resultados

4.1 Análise dos Resultados da Simulação Computacional

A criação de modelos CAD, acompanhada das simulações efetuadas aos três modelos finais (sem filtro, filtração através de pinos e filtração através de membrana), conduzi à produção dos resultados gráficos apresentados da Figura 37 à Figura 44. Os resultados reportam dois parâmetros principais que foram tidos em conta: a velocidade ao longo do circuito e o caudal mássico nas saídas abertas/de escape. A velocidade serviu para avaliar o comportamento do fluido ao longo do circuito, nomeadamente na zona de filtração e nas bifurcações; enquanto o caudal mássico nas saídas serviu como forma de verificar se seria expectável a chegada da mesma quantidade de fluido em todas as câmaras de reação. Na Figura 38 podemos observar que o fluido desacelera nas câmaras de admissão do sangue e de filtração devido ao aumento do volume necessário para as preencher. Contudo, não se verifica perda significativa de velocidade nessas transições, sendo só observado tal fenómeno após as sucessivas bifurcações. No entanto, a perda de velocidade é igual em todos os ramos, facto que indica já uma boa divisão de caudal. A velocidade de fluxo no centro do escoamento, inicialmente, é $4,26 \text{ mm.s}^{-1}$ na zona de mistura/filtração, diminui para $2,06 \text{ mm.s}^{-1}$ após a primeira bifurcação e para $1,05 \text{ mm.s}^{-1}$ nas bifurcações finais.

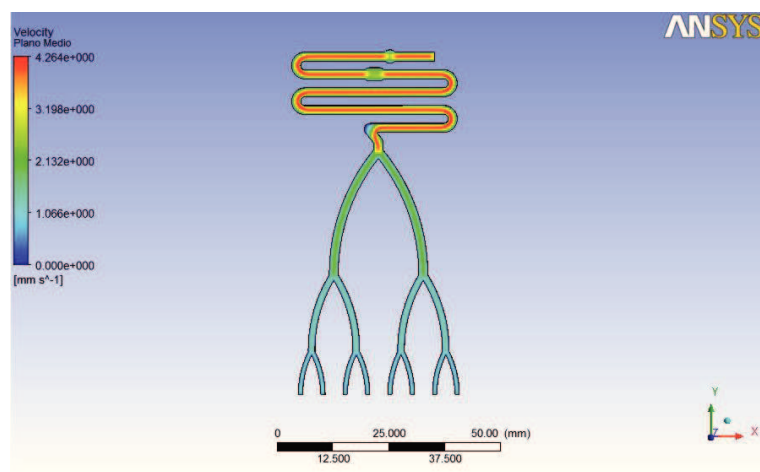


Figura 37 – Imagem de simulação ANSYS do perfil de velocidades no plano médio no modelo final sem filtração

Na Figura 38, a imagem apresentada, que esquematiza na forma de um gradiente as velocidades de fluxo permite observar que as oito saídas apresentam um caudal mássico idêntico ou bastante semelhante entre si, atingindo o seu valor máximo no centro do escoamento e o valor mínimo junto à parede do canal.

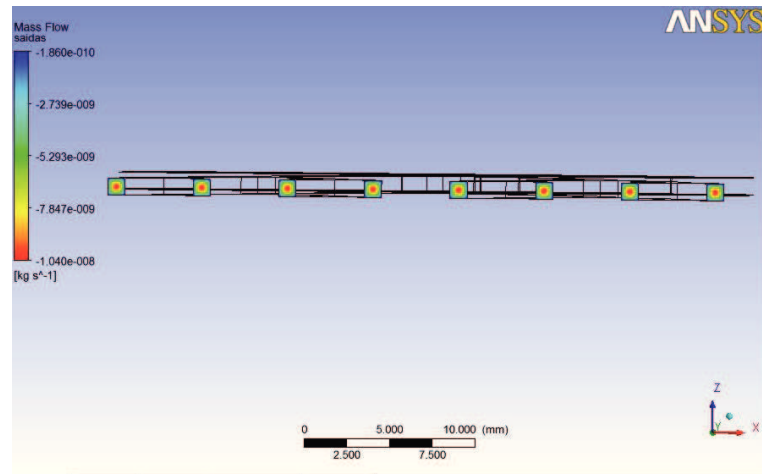


Figura 38 – Imagem de simulação ANSYS do caudal mássico no plano das saídas do modelo final sem filtração

Na Figura 39, observamos, à semelhança da sua homóloga no modelo sem filtro, que obtemos uma distribuição de caudal semelhante e equilibrada junto às bifurcações. Todavia é de notar que, após a primeira bifurcação, os valores da velocidade (1.98 mm.s^{-1}) diminuem face aos valores homólogos do modelo anterior. O facto deste modelo ter um filtro contribui para essa diminuição dos valores de velocidade. Podemos assim observar que, na Figura 40, o fluxo sofre a perda de velocidade junto às várias barreiras de pinos, e torna a ganhar velocidade a cada barreira ultrapassada.

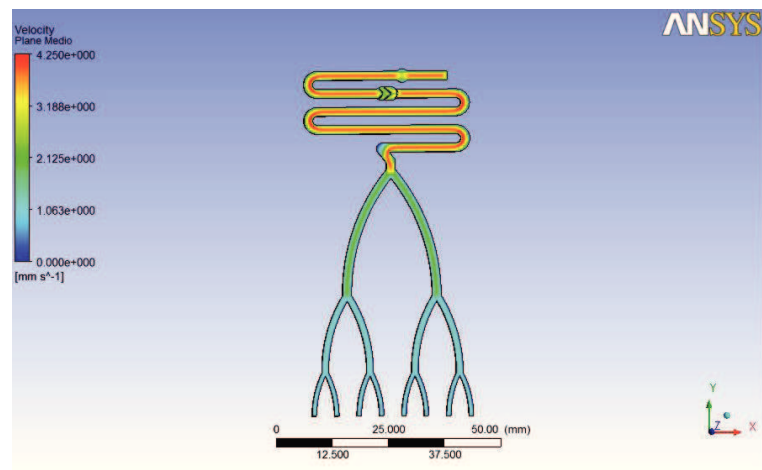


Figura 39 – Imagem de simulação ANSYS do perfil de velocidades no plano médio no modelo final com filtração através de pinos

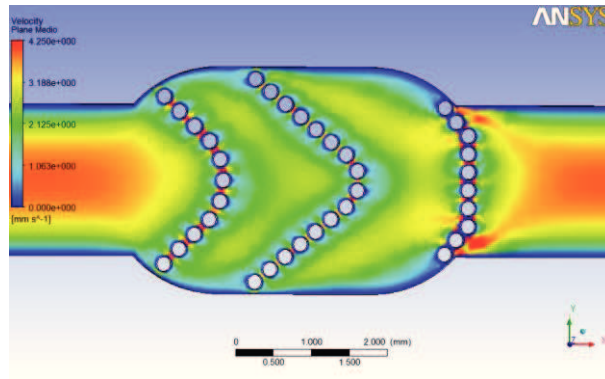


Figura 40 – Imagem de pormenor simulação ANSYS do perfil de velocidades no plano médio junto aos pinos

Embora a perda de velocidade, verificada após a primeira bifurcação, seja maior do que aquela observada no primeiro modelo, este facto não tem um grande impacto no caudal junto às saídas (Figura 41). A distribuição do caudal ao longo da seção do canal é semelhante ao anterior modelo, verificando-se um maior valor no centro do escoamento. No entanto, este último apresenta um valor menor em relação ao seu homólogo sem filtro.

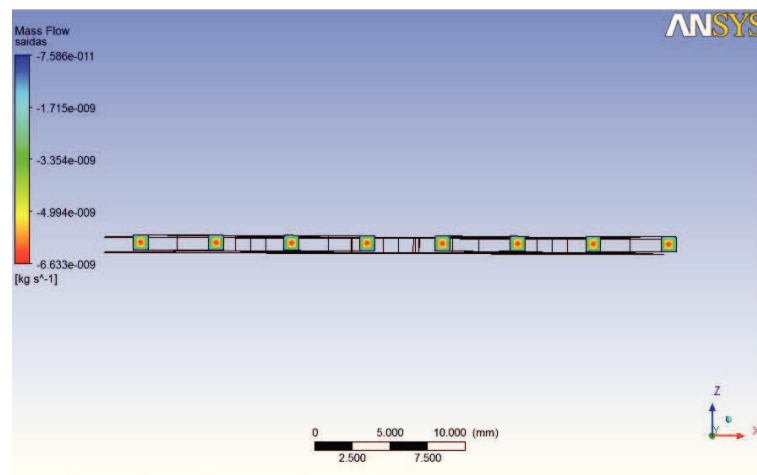


Figura 41 - Imagem de simulação ANSYS do caudal mássico no plano das saídas no modelo final com filtração através de pinos

O terceiro modelo apresenta, tal como se observa no gráfico de simulação ANSYS na Figura 42, uma distribuição de caudal, mediante a observação da velocidade, idêntica aos dois modelos anteriores, mas que aparenta ter uma menor diminuição dos valores da velocidade (relativamente ao segundo modelo).

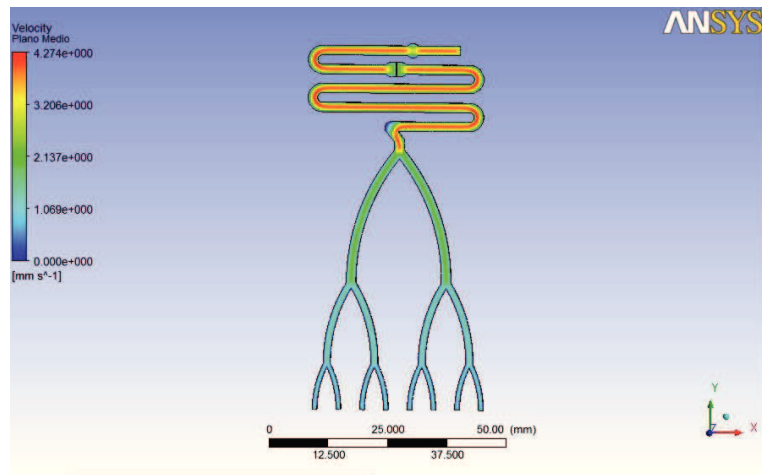


Figura 42 - Imagem de simulação ANSYS do perfil de velocidades no plano médio no modelo final com filtração através de membrana

No que concerne à estrutura/metodologia de filtração com base num filtro físico, composto por microcamadas de celulosa (Figura 43), este apresenta uma perda de velocidade junto aos poros devido ao escoamento ser forçado a passar pelos mesmos, tal como seria expectável. Podemos observar também que, após a membrana, a velocidade aumenta para valores idênticos aos anteriores à mesma.

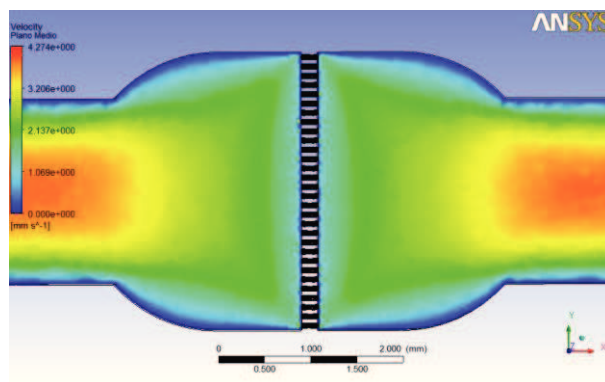


Figura 43 - Imagem de pormenor de simulação ANSYS do perfil de velocidades junto à membrana

Em termos de caudal à saída (Figura 44), verificamos uma distribuição semelhante ao observado em anteriores modelos, mas apresentando um valor no centro do escoamento menos uniforme, embora superior aos mesmos.

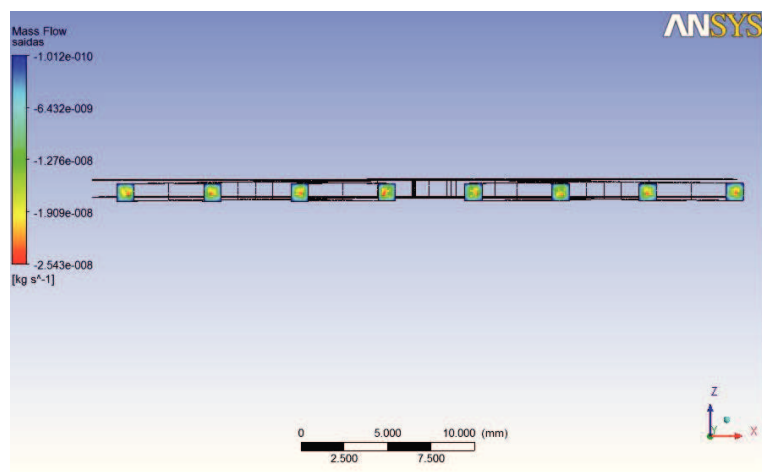


Figura 44 - Imagem de simulação ANSYS do caudal mássico no plano das saídas no modelo final com filtração através de membrana

4.2 Análise dos Resultados Experimentais

4.2.1 Resultados da Microscopia

A análise microscópica teve a finalidade de inspecionar as superfícies, câmaras e seções (Figura 45) da rede microfluidica após o processo de fabrico, e verificar as cotas reais apresentadas pelo modelo, tal como se apresenta nas Figuras 46 a 63. Esta caracterização permite também avaliar a capacidade de precisão dimensional do processo de fabrico utilizado, neste caso, a impressão 3D. Além das câmaras e seções do modelo final, também se procedeu à inspeção das amostras construídas com um conjunto de pinos para concluirmos qual a melhor solução a ser adotada.

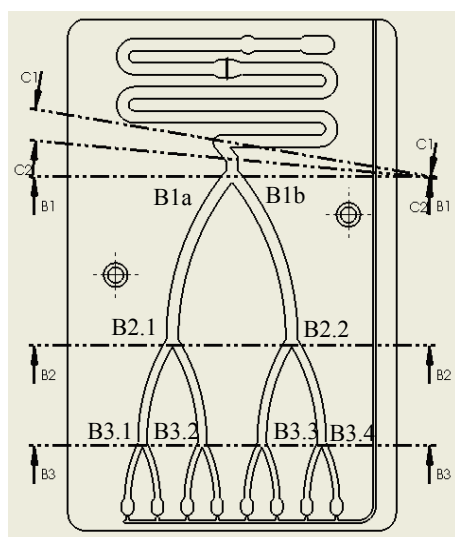


Figura 45 - Esquema das seções observadas por microscopia ótica

Na Figura 46 observamos a zona da saída da câmara do soro, cuja cota real medida é de aproximadamente 1972 μm para uma cota nominal de 2000 μm . Valor que representa um desvio de 1,4%.



Figura 46 – Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da saída da câmara do soro

Na Figura 47, a análise por microscopia ótica permitiu verificar que o diâmetro real medido da entrada do sangue é de aproximadamente 1683 μm relativamente ao diâmetro nominal de 1845 μm . Já a câmara de admissão da amostra de sangue, Figura 48, apresenta um diâmetro real acerca de 2580 μm comparativamente a um diâmetro nominal de 3000 μm . Em termos de desvio, obtivemos os valores de 8,7% e 14% respetivamente.



Figura 47 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da entrada da amostra de sangue

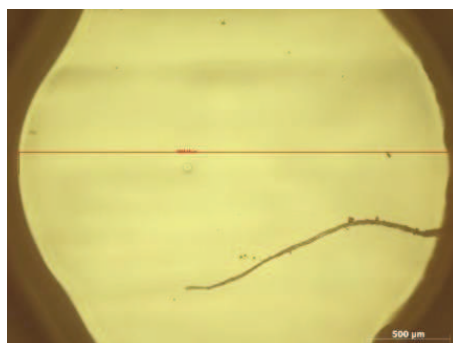


Figura 48 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da câmara de admissão da amostra do sangue

O rasgo ou entalhe, visível na Figura 49, foi introduzido com a finalidade de fixar a membrana de celulose com espessura de 120 μm [30]. Designámos uma cota nominal de 180 μm para haver uma folga no encaixe. No entanto, este apresenta uma cota real de aproximadamente 71 μm , valor que representa um desvio de 60,5%.

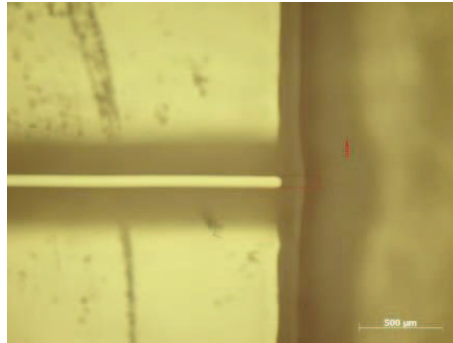


Figura 49 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) do rasgo para membrana na câmara de filtração

Na Figura 50 e na Figura 51 observamos a parede exterior e interior, respetivamente, da curva C1. Na parte exterior podemos visualizar os aspetos do acabamento superficial sem grandes sulcos mas não existem aspetos geométricos concretos a serem analisados. Na parte interior observámos os aspetos superficiais bem como os aspetos geométricos, nomeadamente, o ângulo que as paredes fazem com o canto interior. Nominalmente, este é aproximadamente 51° e afere-se um valor real acerca de 49° .

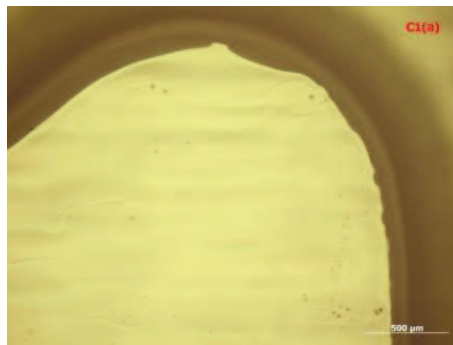


Figura 50 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da parede exterior da curva C1 da Figura 45

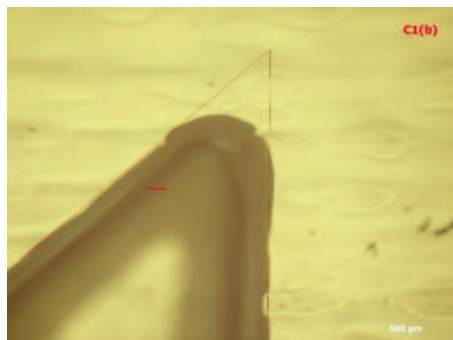


Figura 51 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da parede interior da curva C1 da Figura 45

Na curva C2, Figura 52, observamos cotas reais entre 1610 – 1650 μm sendo que a cota nominal é de 2000 μm , que representa um desvio entre 17,5% e 19,5%.

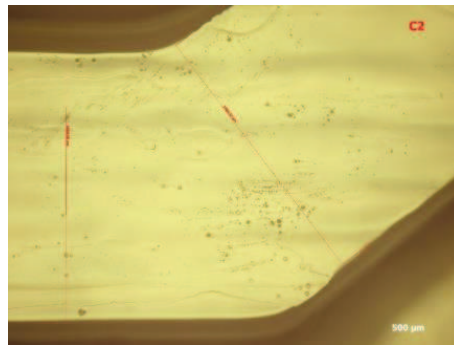


Figura 52 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da curva C2 da Figura 45

A zona que se segue na observação é a bifurcação 1 composta pela seção A (Figura 53) e a seção B (Figura 54). Esta zona é responsável pela primeira divisão de caudal, apresentando um comprimento de canal acerca de 1507 μm para a seção A e um comprimento de 1504 μm para a seção B. No entanto a cota nominal estabelecida é de 2000 μm levando a estimar um desvio entre 24,7% e 24,8%.



Figura 53 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da seção A da bifurcação 1 da Figura 45

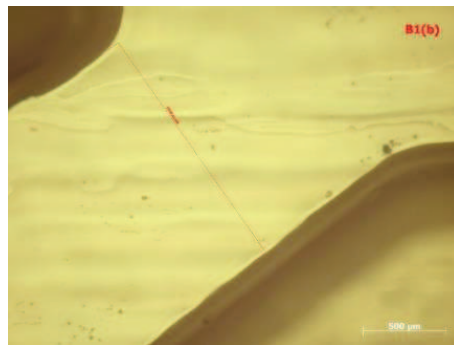


Figura 54 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da seção B da bifurcação B1 da Figura 45

Na Figura 55, podemos observar a primeira bifurcação da seção B2 e verificar cotas reais de 1002 μm e 1039 μm comparativamente à cota nominal para ambos os canais de 1500 μm , refletindo um desvio entre 30,7% e 33,2%

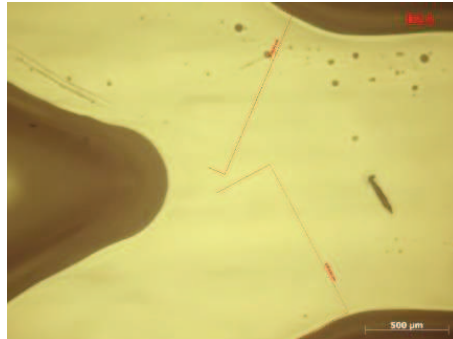


Figura 55 – Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) primeira bifurcação da Seção B2 da Figura 45

A segunda bifurcação da mesma seção, Figura 56, apresenta valores de 1016 μm e 1023 μm para a mesma cota nominal referida anteriormente. Portanto, verifica-se um desvio entre 31,8% e 32,3%.



Figura 56 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da segunda bifurcação da Seção B2 da Figura 45

A seção seguinte é a B3, composta por quatro bifurcações conducentes às câmaras finais de reação. A primeira bifurcação representada pela imagem ampliada pela Figura 57, apresenta comprimentos reais de canais entre 603 μm e 615 μm . Na segunda bifurcação (Figura 58) podemos observar as mesmas cotas entre 529 μm e 549 μm e na terceira bifurcação (Figura 59) cotas entre 548 μm e 556 μm . Por fim, na quarta bifurcação apresentada na Figura 60 observamos as cotas reais entre 501 μm e 551 μm . É de salientar que a cota nominal para todas elas é de 1000 μm e a diferença é traduzida no desvio, que varia entre 38,5% e 49,9%.

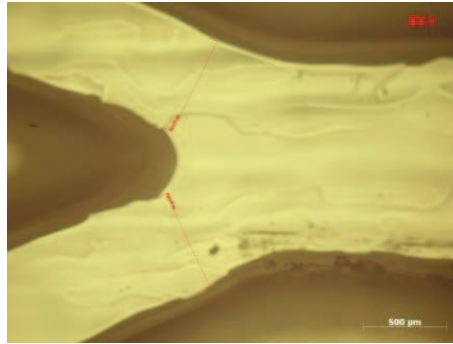


Figura 57 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da primeira bifurcação da Seção B3 da Figura 45

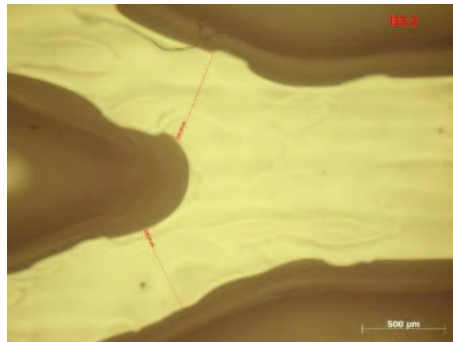


Figura 58 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da segunda bifurcação da Seção B3 da Figura 45

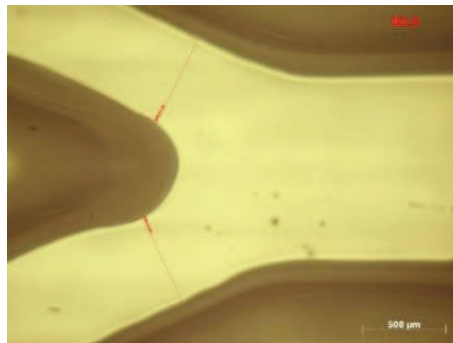


Figura 59 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da terceira bifurcação da Seção B3 da Figura 45

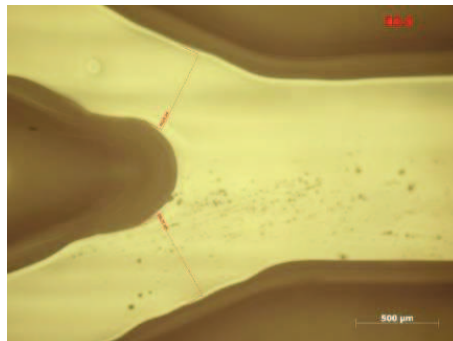


Figura 60 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da quarta bifurcação da Seção B3 da Figura 45

Por fim, na Figura 61, observamos as câmaras de reação e medimos o comprimento real em 2380 μm e a largura real em 1621 μm . As cotas nominais definidas são: comprimento de aproximadamente 2800 μm e largura de 2000 μm . Estima-se, portanto, um desvio no comprimento de aproximadamente 15% e na largura de 19%.

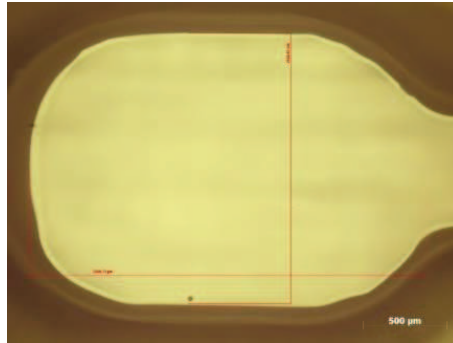


Figura 61 - Imagem de microscopia ótica (ampliação 10x) da câmara de reação

Embora tenhamos estimado valores para desvio do material, aqueles que apresentam maior discrepância podem não ser totalmente fidedignos devido ao facto de estarem implícitos possíveis erros de calibração da lente do microscópio e erros do observador.

Em paralelo, fabricámos também amostras da zona de filtração com pinos, para serem analisadas as dimensões e se proceder à verificação de qual seria adotada. Das soluções fabricadas e posteriormente analisadas, seleccionámos a amostra cujos parâmetros são os seguintes: diâmetro de pino de 600 μm e espaçamento de 250 μm . A Figura 62, apresenta a vista lateral da amostra, na qual é possível avaliar quantitativamente vários aspetos tais como: diâmetro no topo do pino, diâmetro médio, diâmetro na base do pino e altura. Obtivemos, respetivamente, os seguintes valores: 577 μm , 698 μm , 854 μm e 975 μm . As cotas nominais têm cerca de 600 μm de diâmetro e 1000 μm de altura, valores que demonstram uma dilatação das paredes laterais dos pinos e um ligeiro abatimento na altura dos mesmos. A Figura 63, permite melhor visualizar a dilatação das paredes laterais uma vez que o espaçamento sofre uma redução de 250 μm para valores entre 238 μm e 249 μm .

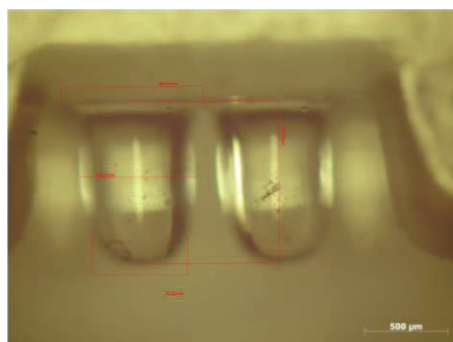


Figura 62 – Vista lateral da amostra com diâmetro de pino de 600 μm e espaçamento de 250 μm

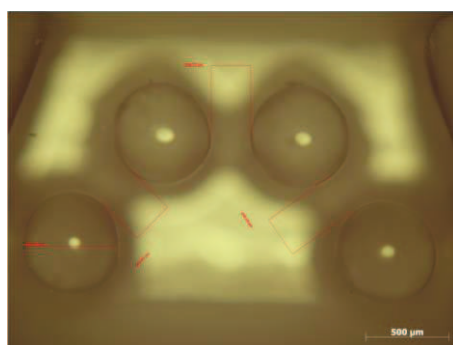


Figura 63 - Vista de topo da amostra com diâmetro de pino de 600 μm e espaçamento de 250 μm

Todos os valores analisados foram reunidos e compilados na Tabela 7, dando uma visão mais ampla das diferenças entre a modelação CAD e a capacidade do processo de fabrico selecionado.

Tabela 7 – Tabela síntese dos desvios verificados entre cotas nominais e reais

Cota (descrição)	Nominal [μm]	Real [μm]	Desvio [%]
Largura do canal à saída da câmara do soro	2000	1972	1,4
Diâmetro da entrada do sangue	1845	1643	8,7
Diâmetro da câmara de admissão do sangue	3000	2580	14
Entalhe de fixação da membrana de celulose	180	71	60,5
Largura do canal na curva C2		1610 - 1650	17,5 – 19,5
Largura do canal da seção A da bifurcação B1	2000	1507	24,7
Largura do canal da seção B da bifurcação B1		1504	24,8
Largura do canal da 1ª bifurcação da seção B2	1500	1002 – 1039	30,7 – 33,2
Largura do canal da 2ª bifurcação da seção B2		1016 – 1023	31,8 – 32,3
Largura do canal da 1ª bifurcação da seção B3		603 – 615	
Largura do canal da 2ª bifurcação da seção B3	1000	529 – 549	38,5 – 49,9
Largura do canal da 3ª bifurcação da seção B3		548 – 556	
Largura do canal da 4ª bifurcação da seção B3		501 - 551	
Largura da câmara de reação	2000	1621	19
Comprimento da câmara de reação	2800	2380	15

4.2.2 Resultados Experimentais

Os ensaios experimentais realizados em contexto real, que foram efetuados para avaliação da divisão equitativa de caudal e validação da geometria modelada, são reportados ao longo deste subcapítulo. Os resultados obtidos foram ilustrados com figuras sequenciais do enchimento da rede, para melhor elucidar os aspetos do escoamento e constatar o aparecimento de eventuais problemas. Na Figura 64, efetuámos o enchimento da rede de micro-fluídica com o caudal idêntico àquele utilizado na simulação computacional a fim de validar os fluxos obtidos nas mesmas condições. A indução de um fluxo do fluido foi obtida com recurso da bomba peristáltica com velocidade angular a 1.11 RPM. À medida que se efetuou o preenchimento dos canais, podemos observar que um dos ramos apresentou mais facilidade de preenchimento. Isto deve-se ao facto de haver ar aprisionado no interior da rede e leva a que a frente de fluxo opte por caminho que ofereça menor resistência à sua passagem.

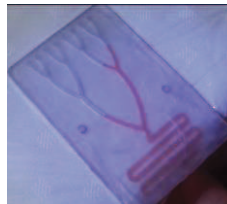


Figura 64 – Imagem do processo de preenchimento com solução de água destilada e corante alimentar vermelho a um caudal de $4.16 \mu\text{l.s}^{-1}$

Face ao problema encontrado, optámos por aumentar, por um lado o caudal da bomba para o máximo possível com o objetivo de forçar o ar aprisionado a sair tal como ilustrado na Figura 65, e por outro, optar por produzir uma situação de vácuo. Deste modo, detetámos logo à partida uma falha a ser corrigida num protótipo melhorado, isto é, o canal de escape do ar deve ser redimensionado para minimizar o efeito da hesitação, para além dos módulos terem de ser produzidos sob vácuo, e em ambiente esterilizado.



Figura 65 – Imagem do preenchimento com aumento do caudal para forçar a saída do ar

Após a detecção deste fenómeno, associado ao aprisionamento do ar na rede, efetuámos os seguintes dois ensaios com um caudal máximo, conferido pela ação da bomba peristáltica, para que eliminássemos este fenómeno indesejável, e avaliássemos apenas o fenómeno de divisão do caudal. Tal como aconteceu anteriormente ao nível da simulação computacional, um dos obstáculos a que se assistiu durante a simulação foi o da distribuição não homogénea do caudal na rede de microcanais. A Figura 66 apresenta o começo do enchimento da rede seguido do preenchimento do canal até à primeira curva (Figura 67).



Figura 66 - Imagem da entrada do fluido na câmara de admissão do sangue



Figura 67 - Imagem do preenchimento do canal

Na Figura 68 permite observar o preenchimento da câmara de filtração, no entanto esta não apresenta uma solução de filtração construída ou montada. Isto deve-se ao facto de pretendermos validar primeiro a divisão de caudal e posteriormente analisarmos a opção de filtração. De seguida, podemos ver a entrada do escoamento na curva C1 (Figura 69), a qual tem a função de equilibrar a velocidade do escoamento e evitar assim a tendência do escoamento para um dos ramos da bifurcação.



Figura 68 - Imagem do preenchimento da câmara da filtração



Figura 69 – Imagem da entrada do escoamento na curva C1

Na Figura 70, o escoamento entra na primeira bifurcação de toda a rede e é importante verificar como o escoamento se dividirá. Verificamos, portanto, que este se divide de forma equitativamente entre os ramos, como mostra a Figura 71.



Figura 70 - Imagem da entrada do escoamento na bifurcação da seção B1



Figura 71 - Imagem da divisão do caudal após a bifurcação da seção B1

Embora tenhamos acautelado e minimizado o fenómeno de hesitação, verificamos que na Figura 72 dá-se a chegada do escoamento primeiramente a uma das bifurcações da seção B2. Este fenómeno pode dever-se ao facto de haver fuga de fluido pela entrada e pela junta das placas. Todavia observamos a divisão idêntica de caudal para os ramos seguintes de ambas as bifurcações (Figura 73).



Figura 72 - Imagem da entrada do escoamento da segunda bifurcação da seção B2



Figura 73 - Imagem da entrada do escoamento na primeira bifurcação da seção B2

Devido ao escoamento ter entrado primeiramente na segunda bifurcação da seção B2, leva a que seja expectável o preenchimento em primeiro lugar da terceira e quarta bifurcação da seção B3, como verificamos na Figura 74. Após o escoamento já ter preenchido parte dos ramos das duas bifurcações anteriores, é que observamos a chegada do fluido à primeira e segunda bifurcação da mesma seção (Figura 75).



Figura 74 - Imagem da entrada do escoamento na terceira e quarta bifurcação da seção B3



Figura 75 - Imagem da entrada do escoamento na primeira e segunda bifurcação da seção B3

Verifica-se novamente, na Figura 76, uma divisão equitativa do caudal nas bifurcações primeira e segunda da seção B3. Inesperadamente, duas câmaras são preenchidas primeiro, faltando preencher ainda parte dos quatros ramos da primeira e segunda bifurcação da seção B3. Possivelmente, este acontecimento deve-se ao facto do escoamento estar a uma maior proximidade das câmaras que, por sua vez, apresentam o escape do ar no final e, com efeito, maior facilidade de enchimento. Em seguida observa-se o enchimento do segundo, terceiro e último par de câmaras nas Figuras 77, 78 e 79 respetivamente.



Figura 76 - Imagem do preenchimento do primeiro par de câmaras de reação



Figura 77 - Imagem do preenchimento do segundo par de câmaras de reação



Figura 78 - Imagem do preenchimento do terceiro par de câmaras de reação



Figura 79 - Imagem do preenchimento completo das câmaras de reação

O mesmo tipo de ensaio foi efetuado com a segunda solução, composta de soro fisiológico e corante alimentar amarelo, e observámos os mesmos fenómenos de hesitação e obtivemos resultados muito similares aos do ensaio anterior. Este último ensaio já se encontra mais próximo da realidade, visto que apresenta propriedades reológicas mais próximas do plasma, único fluido que circulará após a filtração.

4.3 Comparação de Resultados

Os resultados dos ensaios experimentais correspondem ao previsto pelos resultados da simulação computacional, não divergindo muito entre si. No entanto, e uma vez que a necessidade primária era a de validar a divisão equitativa de caudal, o modelo foi considerado como na simulação como circuito aberto. Por conseguinte, não houve a previsão, nem a expectativa do aparecimento do fenómeno de hesitação. Relativamente aos ensaios experimentais, observámos que esse fenómeno surge de um possível escape de ar pouco eficaz e devido à presença do mesmo, não foi possível finalizar com êxito um ensaio com o caudal idêntico ao da simulação. Todavia, e como fora referido anteriormente, procurámos ultrapassar essa vicissitude através do aumento do caudal da bomba peristáltica a fim de eliminar ou minimizar esse elemento perturbador.

5. Industrialização

5.1 Produto Final

O produto final resulta dos melhoramentos sucessivos, quer em primeiro lugar ao nível da simulação computacional, quer em segundo lugar ao nível dos ensaios experimentais realizados. Após todo este processo iterativo de melhoria contínua e olhando para as especificações iniciais, verificamos que todas elas permanecem intactas e válidas. No entanto, é extremamente importante salientar que no produto final deve-se ter em conta a biocompatibilidade do material selecionado para a materialização do produto. Esta especificação, embora tenha sido pensada, não fora até então considerada no fabrico do protótipo para não onerar os custos de desenvolvimento. Com vista a cumprirmos esta especificação, seleccionámos como material biocompatível o PMMA (Polimetilmetacrilato), já largamente utilizados para fins biomédicos [31]. Este material, para além de ser biocompatível, apresenta excelentes propriedades óticas e de transparência, propriedades que podem vir a facilitar a leitura pelo sensor RGB nas câmaras de reação. O PMMA apresenta ainda boa rigidez e estabilidade dimensional, boa dureza e resistência aos riscos, boa resistência à radiação UV, boa resistência química, resistência à esterilização por raios gama e ainda é aplicado na indústria biomédica em vários dispositivos de micro-fluídica como os *Lab-on-chip* [32], [33].

O produto final (Figura 80) composto na sua essência por duas placas: base com a rede de microfluídica; e a tampa com a entrada para admissão do sangue e rasgo para permitir a aplicação de pressão na bolsa do soro, acompanhadas de película biocompatível aderente de ambos os lados e a bolsa de soro, reúnem assim as condições para analisar a sua industrialização. Sendo considerado um produto médico de diagnóstico pela norma ISO 13485 de 2003, este deve cumprir com as especificações de qualidade requeridas pela mesma.

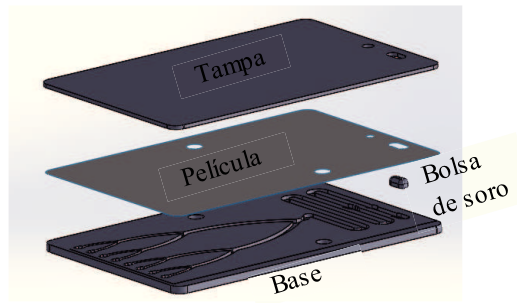


Figura 80 - Produto Final

5.2 Processos de Fabrico

Posteriormente às especificações estarem definidas e satisfeitas, avançámos para o fabrico dos componentes e a sua montagem a fim de obter o produto final. Face ao material selecionado para materializar o produto final, seleccionámos o processo de fabrico *Hot Embossing* [34] para a produção em massa. Porém, este processo de fabrico requer um punção e uma matriz, ou seja, ferramentas que conformem o material à forma pretendida, suportando a pressão e temperatura inerentes ao processo. Por conseguinte é necessário também fabricá-los e para tal escolhemos o processo de Micro-Fresagem (*MicroMilling*) [35]. Em suma, temos dois processos de fabrico definidos, o processo de fabrico das ferramentas e o processo de fabrico do produto final.

5.2.1 Produção das Ferramentas

Conforme foi explicado anteriormente, é necessário o fabrico das ferramentas para a produção em massa. Assim sendo são necessários construir dois conjuntos de punção-matriz para as duas placas com a finalidade de imprimir os detalhes no material em ambos os lados. Por esta razão, seleccionámos o processo de Micro-Fresagem (Figura 81) para fabricar os dois conjuntos, devido ao mesmo ser capaz de produzir detalhes e geometrias complexas com grande grau de desempenho à escala microscópica, em materiais metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos [35]. Ainda permite que a investigação na área dos *BioMEMS's* tenha menor dificuldade de entrada devido aos baixos custos de fabrico apresentados [36].



Figura 81 – Imagem do processo de Micro-Fresagem (Adaptado de MicroManufacturing)[35]

5.2.2 Produção em Massa

Após os conjuntos punção-matriz estarem fabricados, temos as ferramentas necessárias para serem montadas no equipamento que irá produzir o produto final. O equipamento, uma prensa, irá aplicar uma força e temperatura ao material posicionado sobre a matriz através do punção que, por sua vez, o irá conformar à mesma. Após o material ter preenchido toda a cavidade e ter adquirido a forma pretendida é desmoldado conforme podemos visualizar na Figura 82 [34], [37]. Ainda de notar que os acionamentos do equipamento devem ser elétricos para evitar contaminações do produto fabricado. O fabrico deve respeitar técnicas assépticas com vista a respeitar não só a qualidade do produto, bem como, os procedimentos descritos pela norma ISO 13408 de 2008.

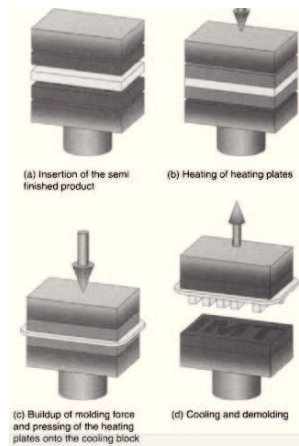


Figura 82 - Esquema de produção por Hot Embossing (Adaptado de Worgull)[37]

Posto isto e à medida que o produto é fabricado, este segue para o processo de montagem (Figura 83) onde será inicialmente esterilizado com radiação-gama respeitando a norma ISO 11137 de 2006, e todo o procedimento de montagem ocorrerá em sala branca ou *Cleanroom*, de acordo com norma ISO 14644 de 2013, por forma a garantir os padrões de qualidade.

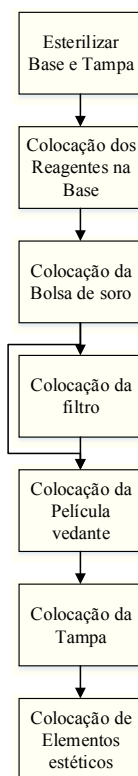


Figura 83 – Esquema de Montagem

Posteriormente ao procedimento de montagem estar completo, procede-se ao embalamento individual ainda em ambiente controlado. Em seguida é feito o embalamento em caixas e armazenado tendo em conta todas as necessidades de acondicionamento (Figura 84).

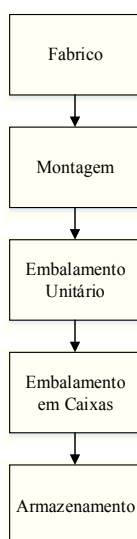


Figura 84 - Esquema Geral de Produção

6. Conclusões

O trabalho iniciou-se com a reunião e compilação de uma vasta informação sobre os princípios teóricos da Dinâmica de Fluidos, da Microfluídica e o seu estado da arte, nomeadamente dispositivos biomédicos comercializados, bem como o estudo e caracterização do sangue, com o objetivo de conceber um dispositivo baseado em micro-fluídica para diagnóstico.

A fase de construção do modelo CAD tridimensional, sofreu por outro lado, constantes mutações intrínsecas ao próprio processo iterativo de melhoria continua. Esse processo desenrolou-se de forma sucessiva, começando no modelo com uma bifurcação até ao modelo final, sempre modelando e analisando os resultados calculados pelo *software* de CAE, ANSYS Fluent. O principal aspeto tido sempre em conta foi o da divisão de caudal equitativa, fulcral nesta etapa de desenvolvimento.

Os resultados obtidos da simulação foram satisfatórios no que concerne quer à divisão de caudal, ou seja, a verificação do perfil de velocidades ao longo do circuito, quer ao caudal que chegava a cada saída ser muito semelhante ou praticamente idêntico. As primeiras simulações foram realizadas com água destilada, uma vez que do sangue após filtração, obter-se-ia o plasma, que é maioritariamente composto por água, cerca de 91% do volume. Assim, as propriedades e condições estudadas não estariam muito distantes da realidade. Ainda de salientar que o aspeto de filtração ajudou no estudo em ambiente virtual, pois o plasma apresenta o comportamento de um fluido newtoniano o que, por sua vez, se adequa mais fielmente às equações que modelam o seu escoamento.

Na simulação efetuada com elementos de filtração, verificámos que ambas as opções apresentavam comportamentos semelhantes, sendo que a membrana apresentava uma só zona de perda de velocidade, enquanto os pinos apresentavam três zonas. Porventura, é expectável que esse aspeto seja diferente da realidade aquando da utilização de sangue, pois os glóbulos vermelhos presentes provocarão um abrandamento maior do fluxo e, eventualmente, algumas zonas de entupimento. Em relação a este último pormenor, a membrana apresenta o risco maior de entupimento devido à sua porosidade de apenas $0,22\ \mu\text{m}$.

Porém, não nos foi possível simular uma membrana com tal porosidade devido à capacidade de processamento do equipamento disponível, sendo possível apenas simular numericamente um tamanho de poro de 50 μm .

Independentemente da simulação numérica realizada, com ou sem elementos de filtração, verificou-se que o equilíbrio na divisão de caudal se mantinha. Este equilíbrio foi parcialmente corroborado nos ensaios experimentais, mesmo com a ocorrência de ligeiros desequilíbrios na chegada às câmaras de reação.

Relativamente ao modelo fabricado, verificámos um bom acabamento superficial e com os detalhes da rede bem definidos visualmente. A inspeção microscópica do modelo mostrou-nos aspetos mais detalhados sobre as superfícies das paredes dos canais, havendo zonas com rugosidade maior e mais irregular. Após as medições efetuadas, verificámos que havia zonas onde as cotas reais diferiam significativamente das cotas nominais definidas. Este fator deve-se aos desvios verificados resultantes do processamento no material, ainda que se possa considerar a eventual existência de erros de medição associados ao observador. Na inspeção às amostras fabricadas da opção de filtração com pinos, verificámos o abatimento dos pinos devido à razão de aspeto dos mesmos. Este fenómeno resultou na dilatação dos pinos em algumas das amostras, criando obstruções demasiado restritivas à passagem de fluido. Apenas uma das amostras revelou as características pretendidas, onde os pinos tinham as cotas nominais de 600 μm diâmetro, 1000 μm de altura e 250 μm de espaçamento.

No que concerne aos ensaios experimentais, foi observado logo nos primeiros ensaios a dificuldade de enchimento completo do protótipo devido a dois fatores: a distribuição da pressão ao longo das placas, para garantir um fecho uniforme, e o ar aprisionado no interior da rede micro-fluídica. O primeiro fator foi solucionado de forma razoavelmente eficiente, embora este seja também influenciado pelo segundo fator descrito, devido ao ar poder escapar pela interface das placas. Para contornar o problema gerado pelo ar aprisionado, embora houvesse um escape de ar feito no modelo, tivemos de aumentar o caudal da bomba para o máximo a fim de forçar a sua saída. Observámos que o escoamento, quando presente junto a uma bifurcação, se dividia como fora previsto na simulação. Em alguns dos ensaios realizados, com o caudal aumentado, o ar remanescente na rede provocava desequilíbrios levando a que uns ramos fossem preenchidos primeiro. Por sua vez, este fenómeno permitia o enchimento assimétrico de algumas das câmaras.

De todos os objetivos iniciais, validação da divisão equitativa de caudal, validação da opção de filtração e validação do caudal gerado pela pressão efetuada na bolsa de soro, apenas foi possível a validação completa da divisão equitativa de caudal. No que se refere às duas validações restantes, a validação da opção de filtração ficou incompleta, uma vez que só foi realizada a simulação numérica e não foi possível obter um elemento filtrante cuja porosidade pudesse ser comparável. Ficou também por avaliar a validação do caudal gerado pela pressão efetuada na bolsa de soro. Tal só seria possível com a produção de uma bolsa de soro, devidamente instrumentada para determinar a força necessária para reproduzir a pressão sobre o soro no interior da bolsa e assim, gerar o caudal necessário para vencer a perda de carga causada pelo elemento de filtração e garantir o preenchimento das câmaras de reação. A aplicação da pressão gerada pela bomba peristáltica pretendia replicar o caudal humanamente gerado pela pressão sobre a bolsa de soro. Com base nestes valores provisórios, o caudal proporcionava o preenchimento completo das oito câmaras de reação em pouco mais de 20 segundos. Será portanto necessário no futuro, obter tempos de preenchimento em condições reais, uma vez com os problemas de selagem e de escape de ar resolvidos. A determinação deste tempo é importante, considerando que a leitura ótica só pode ser iniciada após o preenchimento total das câmaras.

Em suma, o objetivo principal foi cumprido com êxito face ao previsto pela simulação computacional. Verificou-se que a rede de microcanais preconizada poderia alimentar de forma adequada as câmaras de reação, proporcionando a quantidade de fluido necessária para a leitura ótica. Foi cumprida integralmente a especificação que definia como dimensões máximas para este módulo as equivalentes a um cartão multibanco, garantindo um módulo compacto, possível de industrializar em condições de acordo com as normas vigentes para um dispositivo biomédico. Fica referenciado para trabalhos futuros a necessidade de redimensionar o escape do ar, podendo este ser prolongado para o lado contrário e ter, possivelmente, duas saídas. Esta proposta deve-se à observação dos ensaios experimentais, onde as câmaras de reação que eram preenchidas mais rápido, eram aquelas que estavam localizadas mais próximo do escape de ar.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Bibliografia

- [1] C. D. Chin, V. Linder, and S. K. Sia, “Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices,” *Lab Chip*, vol. 12, no. 12, pp. 2118–34, Jun. 2012.
- [2] L. Oliveira and A. Lopes, *Mecânica de Fluidos*, 3rd ed. Lisboa: LIDEL, 2010.
- [3] F. White, *Fluid Mechanics*, 7th ed. McGraw Hill, 2009, p. 887.
- [4] K. R. Wasim, “Slip Flow in Microchannels,” National Institute of Technology Rourkela.
- [5] J. J. P. de Lima, *Biofísica Médica*. Imprensa da Universidade de Coimbra, 2005.
- [6] H. a. Stone, a. D. Stroock, and a. Ajdari, “Engineering Flows in Small Devices,” *Annu. Rev. Fluid Mech.*, vol. 36, no. 1, pp. 381–411, Jan. 2004.
- [7] B. J. Kirby, “Micro- and Nanoscale Fluid Mechanics: Transport in Microfluidic Devices,” *Brian*, p. 512, 2010.
- [8] S. Haeberle, R. Zengerle, and J. Duerée, “Centrifugal generation and manipulation of droplet emulsions,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 3, no. 1, pp. 65–75, Jul. 2006.
- [9] T. Glatzel, C. Litterst, C. Cupelli, T. Lindemann, C. Moosmann, R. Niekrawietz, W. Streule, R. Zengerle, and P. Koltay, “Computational fluid dynamics (CFD) software tools for microfluidic applications – A case study,” *Comput. Fluids*, vol. 37, no. 3, pp. 218–235, Mar. 2008.
- [10] D. Cidre, “Estudo do Escoamento Sanguíneo em Microcanais com Bifurcações,” 2008.
- [11] P. Costa, “Caracterização cinemática e dinâmica de escoamentos estacionários em micro-canais retos e micro-válvulas com recurso à técnica μ PIV e à simulação numérica,” Instituto Superior Técnico, 2009.
- [12] B. Oliveira, M. Lagoela, D. Cidre, C. Fernandes, and R. Lima, “ANALYSIS OF THE BLOOD FLOW IN A MICROCHANNEL WITH A BIFURCATION,” no. 1. pp. 1–6.
- [13] R. Seeley, T. Stephens, and P. Tate, *Anatomia e Fisiologia*, Sexta. McGraw Hill, 2003.
- [14] E. J. D. Bronzino, D. J. Schneck, and M. J. Furey, *The Biomedical Engineering Handbook*, Second. CRC Press LLC, 2000.
- [15] S. Novais, “Desenvolvimento de um microdispositivo biomédico para a separação e deformação de eritrócitos,” Instituto Politécnico de Bragança, 2012.

- [16] R. S. Rosenson, a McCormick, and E. F. Uretz, "Distribution of blood viscosity values and biochemical correlates in healthy adults.," *Clin. Chem.*, vol. 42, no. 8 Pt 1, pp. 1189–95, Aug. 1996.
- [17] V. Narsimhan, "Shaqfeh Research Group | Stanford University." [Online]. Available: <http://antares.stanford.edu/index.php/VivekNarsimhan/HomePage>. [Accessed: 11-Sep-2014].
- [18] Southwest Center for Microsystems Education & University of New Mexico, "BioMEMS Applications Overview," 2009.
- [19] R. Bashir, "BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 56, no. 11, pp. 1565–86, Sep. 2004.
- [20] D. Erickson and D. Li, "Integrated microfluidic devices," *Anal. Chim. Acta*, vol. 507, no. 1, pp. 11–26, Apr. 2004.
- [21] J. Khandurina and A. Guttman, "Bioanalysis in microfluidic devices.," *J. Chromatogr. A*, vol. 943, no. 2, pp. 159–83, Jan. 2002.
- [22] M. W. Ashraf, S. Tayyaba, and N. Afzulpurkar, "Micro Electromechanical Systems (MEMS) Based Microfluidic Devices for Biomedical Applications.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, no. 6, pp. 3648–704, Jan. 2011.
- [23] MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY, "PDMS." [Online]. Available: <http://www.mit.edu/~6.777/matprops/pdms.htm>. [Accessed: 25-Sep-2014].
- [24] Elveflow, "PDMS: A review | Elveflow microfluidic instruments." [Online]. Available: <http://www.elveflow.com/microfluidic-reviews-and-tutorials/the-poly-di-methyl-siloxane-pdms-and-microfluidic>. [Accessed: 25-Sep-2014].
- [25] physicscentral, "<http://physicscentral.com/explore/action/bullet-proof.cfm>." [Online]. Available: <http://physicscentral.com/explore/action/bullet-proof.cfm>. [Accessed: 30-Sep-2014].
- [26] Codi, "Codi - Prototipagem Rápida - Powered by PRIMAVERA WebCentral." [Online]. Available: <http://www.codi.pt/codi/Soluções-Serviços-Prototipagem-Rápida.aspx>. [Accessed: 18-Sep-2014].
- [27] Stratasys, "Transparent Material for Clear Plastics Simulation." [Online]. Available: <http://www.stratasys.com/materials/polyjet/transparent>. [Accessed: 18-Sep-2014].
- [28] Stratasys, "PolyJet Technology." [Online]. Available: <http://www.stratasys.com/3d-printers/technologies/polyjet-technology>. [Accessed: 18-Sep-2014].
- [29] Stratasys, "Objet30 Pro Desktop 3D Printer." [Online]. Available: <http://www.stratasys.com/3d-printers/design-series/objet30-pro>. [Accessed: 29-Sep-2014].
- [30] "Sartorius." [Online]. Available: <http://www.sartorius.com/en/product/product-detail/11107-13-n/>. [Accessed: 23-Sep-2014].

- [31] W. F. Smith and J. Hashemi, *Fundamentos de Engenharia e Ciência dos Materiais*. McGraw Hill Brasil, 2013, p. 734.
- [32] JOLLY TONE, “Biocompatibility-Jolly Tone.” [Online]. Available: <http://jollytone.com/index.php?option=module&lang=en&task=pageinfo&id=9&index=3>. [Accessed: 25-Sep-2014].
- [33] RESINEX, “PMMA | Tipos de polímeros - Resinex.” [Online]. Available: <http://www.resinex.pt/tipos-de-polimeros/pmma.html>. [Accessed: 25-Sep-2014].
- [34] EVG, “EVG|Hot Embossing.” [Online]. Available: http://www.evgroup.com/en/solutions/microfluidics/hot_embossing/. [Accessed: 25-Sep-2014].
- [35] MicroManufacturing, “MICROMILLING APPLICATIONS.” [Online]. Available: <http://www.micromanufacturing.net/didactico/Desarollo/micromilling/1-6-micromilling-applications>. [Accessed: 25-Sep-2014].
- [36] P. Chen, “Micromilling Manufacturing for Polymeric Biochips,” pp. 63–67, 2012.
- [37] M. Worgull, *Hot Embossing: Theory and Technology of Microreplication*. William Andrew, 2009, p. 368.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Anexos
