

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA E  
INFORMÁTICA INDUSTRIAL**

**WALTER DUARTE DE ARAÚJO FILHO**

**GERAÇÃO DE MICROBOLHAS MONODISPERSAS UTILIZANDO O  
ÓLEO DE GIRASSOL COMO REVESTIMENTO LIPÍDICO**

**TESE**

**CURITIBA  
2013**

**WALTER DUARTE DE ARAÚJO FILHO**

**GERAÇÃO DE MICROBOLHAS MONODISPERSAS UTILIZANDO O  
ÓLEO DE GIRASSOL COMO REVESTIMENTO LIPÍDICO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de “Doutor em Ciências” – Área de Concentração: Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Kurt Schneider

Co-orientador: Prof. Dr. Rigoberto Eleazar Melgarejo Morales.

CURITIBA  
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

---

A663 Araújo Filho, Walter Duarte de

Geração de microbolhas monodispersas utilizando óleo de girassol como revestimento lipídico / Walter Duarte de Araújo Filho. — 2013.

69 f.: il.; 30 cm

Orientador: Fábio Kurt Schneider.

Co-orientador: Rigoberto Eleazar Melgarejo Morales.

Tese (Doutorado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial. Curitiba, 2013.

Bibliografia: f. 66-69.

1. Microbolhas – Uso terapêutico. 2. Ultrassom. 3. Meios de contraste (Diagnóstico por imagem). 4. Microfluídica. 5. Imagem tridimensional. 6. Óleo de girassol. 7. Engenharia biomédica. 8. Engenharia elétrica – Teses. I. Schneider, Fábio Kurt, orient. II. Morales, Rigoberto Eleazar Melgarejo, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial. IV. Título.CDD (22. ed.) 621.3

---

Biblioteca Central da UTFPR, Campus Curitiba

Tese de Doutorado N°. 87

## **“Geração de Microbolhas Monodispersas Utilizando o Óleo de Girassol Como Revestimento Lipídico”**

por

### **Walter Duarte de Araújo Filho**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial – CPGEI, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, às 9h do dia 26 de abril de 2013, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em CIÊNCIAS - Área de Concentração: Engenharia Biomédica. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora composta pelos doutores:

---

Prof. Rigoberto Eleazar Melgarejo Morales, Dr.  
(Presidente - UTFPR)

---

Profª. Patrícia Maria Stuelp Campelo, Dr.  
(PUC-PR)

---

Profª. Nadia Krieger, Dr.  
(UFPR)

---

Prof. Joaquim Miguel Maia, Dr.  
(UTFPR)

---

Prof. Jeferson Ferreira de Deus, Dr.  
(UTFPR)

Visto da Coordenação:

---

Prof. Ricardo Lüders, Dr.  
(Coordenador do CPGEI)

À Luciana e Lívia Helena, esposa e filha pela compreensão e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais Walter (*in memoriam*) e Basemath, pela educação e estudo que me proporcionaram, incentivo e exemplo de vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Fábio pelas críticas e incentivo. Obrigado por proporcionar as condições para a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Rigoberto e ao LACIT-UTFPR, por proporcionar as condições técnicas necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade do Estado da Bahia, pelo apoio e incentivo.

Aos colegas Cláudio, Joaquim, Wyllian e Leonardo pelas parcerias, partilha de dúvidas e convivência diária.

Aos colaboradores Thiago de Quadros, Filipe Paukner, André C. Pinto, Rafael Fabrício Alves e Reinaldo Sergio Guchtain Justiniano pela assessoria técnica no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Marcelo Fernandes Oliveira (CTI) e ao Professor José Aguiomar Fogiatto (NUFER-UFPR), pelo suporte técnico e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Terezinha Strapasson, pela atenção e paciência no atendimento das solicitações junto à secretaria.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

*There is not one effect in nature, even the least that exists, so that the ablest theorists can always get a full understanding. This vain presumption of understanding everything can have no other basis than never understand everything. For someone who has experienced once the perfect understanding of one thing, and has truly proven as it comes to knowledge, recognize that the infinity of other truths understands nothing.*

*(GALILEI, Galileo, Il Saggiatore 1623)*

Não há um só efeito na natureza, nem mesmo o menor que existe, de modo que os teóricos mais hábeis possam chegar sempre a uma compreensão total. Esta vã presunção de compreender tudo não pode ter outra base que não seja nunca compreender tudo. Porque alguém que tenha experimentado uma só vez a compreensão perfeita de uma só coisa, e tenha verdadeiramente provado como se chega ao conhecimento, reconheceria que da infinidade de outras verdades nada compreende.

*(GALILEI, Galileu, Il Saggiatore. 1623).*

## RESUMO

ARAÚJO FILHO, Walter Duarte de. **Geração de microbolhas monodispersas utilizando o óleo de girassol como revestimento lipídico**. 2013. 69 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós- Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial. Curitiba, 2013.

As microbolhas foram inicialmente introduzidas como agentes de contraste para ultrassonografia. Elas são capazes de modificar a relação de sinal-ruído em imagens, melhorando assim a avaliação da informação clínica sobre o tecido humano. Desenvolvimentos recentes têm demonstrado a viabilidade do uso destas bolhas como portadores na entrega localizada de fármacos. Nos dispositivos microfluídicos utilizados para a geração das microbolhas, elas são formadas na interface gás-líquido por meio de um processo de estrangulamento. O dispositivo que utiliza estas funcionalidades pode produzir microbolhas com uma pequena dispersão de tamanho em uma única etapa. O dispositivo *T-junction* proposto para a geração de microbolhas, foi fabricado utilizando a técnica de impressão 3D. O óleo de girassol foi utilizado como camada lipídica de revestimento das microbolhas. Foram levantadas curvas de distribuição do diâmetro das microbolhas em relação ao número de eventos (microbolhas geradas em um intervalo de tempo), bem como realizados estudos da estabilidade das microbolhas de diferentes diâmetros geradas a partir de uma mesma fase líquida com viscosidade conhecida, para avaliar a viabilidade da utilização destas como veículos carreadores de fármacos. As curvas de distribuição normal encontradas com pequena dispersão em relação ao diâmetro validam o processo de geração das microbolhas com baixo coeficiente de variação percentual, isto é, 0,4-1,90%. Os resultados indicaram que o dispositivo microfluídico concebido pode ser utilizado para a produção de microbolhas monodispersas usando óleo de girassol como uma matriz lipídica de revestimento. Em relação à estabilidade, a população de microbolhas tendo o ar como fase gasosa permaneceu estável durante 217 minutos para microbolhas com um diâmetro médio de 313,0  $\mu\text{m}$ . Esta estabilidade foi reduzida para 121 minutos para microbolhas com diâmetro médio menor (73,7  $\mu\text{m}$ ). As microbolhas mostraram-se estáveis por períodos de tempo suficientemente longos para aplicações clínicas, mesmo utilizando o ar como fase gasosa. A estabilidade das microbolhas pode ser melhorada com a utilização de gases biocompatíveis de massas molares mais elevadas e menor permeabilidade relativa em relação à água (PFB ou PFC). Foram também realizados estudos para caracterizar os padrões de fluxo, enfatizando a região onde as microbolhas eram geradas, além do levantamento do mapa de regime de fluxo para a região supracitada. Os resultados mostraram objetivamente as características dinâmicas do processo de geração, fornecendo indicações precisas dos parâmetros físicos relacionados com a produção de microbolhas monodispersas voltadas para aplicações clínicas.

**Palavras-chaves:** Microbolhas. Ultrassom. Microfluídica. Controle. Fármacos.



## ABSTRACT

ARAÚJO FILHO, Walter Duarte de. *Generation of monodisperse microbubbles using sunflower oil as a lipid coating*. 2013. 69 f. Tese de Doutorado- Programa de Pós- Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial. Curitiba, 2013

Microbubbles were initially introduced as contrast agents for ultrasound examinations as they are able to modify the signal-to-noise ratio in imaging, thus improving the assessment of clinical information on human tissue. Recent developments have demonstrated the feasibility of using these bubbles as drug carriers in localized delivery. In micro fluidics devices used for microbubbles generation, the bubbles are formed at the liquid gas interface through a strangulation process. A device that uses these features can produce microbubbles with small size dispersion in a single step. A T-junction micro fluidic device constructed using 3D prototyping was made for the production of mono dispersed microbubbles. These microbubbles use sunflower oil as a lipid layer. Were raised distribution curves of the diameter of the microbubbles in the number of events (microbubbles generated in a time interval). Stability studies for microbubbles with different diameters generated from a liquid phase of the same viscosity was conducted to evaluate whether microbubbles have the potential to be used as drug carriers. The biocompatibility of the coating layer, the ability to withstand pressure variations are essential for the microbubbles to be safely used in the role of drug transporters. The normal distribution curves found with small dispersion in relation to the diameter validates the process of generation of microbubbles with a low percentage coefficient of variation  $e$ , i.e., from 0.4 to 1.90%. The results indicated that the microfluidic device conceived can be used to produce microbubbles with low percentage coefficient of variation, using sunflower oil as a coating matrix. The population of microbubbles with air as the gas phase remained stable for 217 minutes for microbubbles with a mean diameter of 313.0  $\mu\text{m}$ . This stability decreased to 121 minutes for microbubbles with smaller mean diameter (73.7  $\mu\text{m}$ ). These carrier units shown to be stable for periods of time long enough for clinical applications, even when using air as gaseous phase. The stability of the microbubbles can be improved with the use of biocompatible gases of higher molar mass and lower permeability relative to water (PFB or PFC). Studies were also performed to characterize the flow patterns where the region emphasizing the microbubbles was generated and a survey map flow regime in the region mentioned above. The results objectively illustrate the dynamic of the bubble generation process providing accurate indications of the physical parameters related to the production of microbubbles monodisperse oriented to clinical applications.

**Keywords:** Microbubbles. Ultrasound. Microfluidics. Control. Drugs.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Curvas de distribuição típica do diâmetro das microbolhas preparadas pelas técnicas: insonação, atomização coaxial eletro hidrodinâmica e <i>T-junction</i> . ....	17
<b>Figura 2-</b> Representação em 3D de uma microbolha mostrando o núcleo gasoso e a camada de revestimento. ....	21
<b>Figura 3-</b> Esquema da produção de microbolhas por insonação. Primeiramente, o gás e o líquido são emulsionados para formar uma suspensão de microbolhas revestidas por um material surfactante. Em seguida, a suspensão é submetida a um campo ultrassônico. ....	22
<b>Figura 4-</b> Sistema de atomização coaxial eletro hidrodinâmica (CEHDA) .....	23
<b>Figura 5-</b> Sistema <i>T-junction</i> .....	24
<b>Figura 6-</b> Sistema <i>cross-Junction</i> .....	24
<b>Figura 7-</b> Esquema das diversas maneiras de transporte de fármacos utilizando microbolhas. ....	25
<b>Figura 8-</b> Efeito do campo ultrassônico sobre a microbolha. ....	27
<b>Figura 9-</b> Esquema mostrando as moléculas de um tensoativo agregadas à camada lipídica da microbolha. ....	31
<b>Figura 10-</b> Esquema de um tensoativo anfifílico. ....	32
<b>Figura 11-</b> Regimes de fluxo em processos adiabáticos. ....	38
<b>Figura 12-</b> Representação de um mapa de regime de fluxo para um canal de diâmetro hidráulico $D_h$ . ....	40
<b>Figura 13-</b> Dispositivo utilizado para a geração de microbolhas. ....	43
<b>Figura 14-</b> Dispositivo híbrido utilizado para a geração de microbolhas. ....	43
<b>Figura 15-</b> Diagrama esquemático do equipamento experimental usado na geração das microbolhas. ....	44
<b>Figura 16-</b> Estrutura de duas camadas de uma microbolha. ....	46

<b>Figura 17-</b> Processo de formação da microbolha para vazão da fase líquida $Q_L = 720,00 \mu\text{l}/\text{min}$ e vazão da fase gasosa $Q_G = 13,00 \mu\text{l}/\text{min}$ .....	51
<b>Figura 18-</b> Curva de distribuição gaussiana do diâmetro de microbolhas em função do número de eventos, usando o dispositivo sem o acoplamento do microcapilar a uma vazão da fase líquida $Q_L = 720,00 \mu\text{l}/\text{min}$ e vazão da fase gasosa $Q_G = 13,00 \mu\text{l}/\text{min}$ e viscosidade relativa $\eta_r = 2,2 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ , número de Reynolds $R_e = 0,038$ e número capilar $C_a = 2,8 \times 10^{-5}$ .....	52
<b>Figura19-</b> Amostra demicrobolhas geradas e dispersas em meio aquoso. Um núcleocentral de gás e uma região periférica correspondente ao revestimento de dupla camada (óleo de girassol + Tween 80) são observados em cada uma das estruturas. ....	53
<b>Figura 20-</b> Processo de formação de uma microbolha no sistema <i>T-junction</i> híbrido. ....	54
<b>Figura 21-</b> Curva de distribuição gaussiana do diâmetro das microbolhas em função do número de eventos, usando o dispositivo híbrido, a uma vazão da fase líquida $Q_L = 96,00 \mu\text{l}/\text{min}$ e vazão da fase gasosa $Q_G = 0,16 \mu\text{l}/\text{min}$ e viscosidade relativa $\eta_r = 2,2 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ .....	55
<b>Figura 22-</b> Curvas de estabilidade para a população de microbolhas em relação ao tempo, à uma temperatura ambiente de $22^\circ \text{C}$ e pressão de $91 \text{ kPa}$ com uma fase líquida de viscosidade igual a $2,2 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ .....	58
<b>Figura 23 -</b> Estado inicial e final da população das microbolhas de diferentes diâmetros.....	60
<b>Figura 24-</b> Padrões de fluxos no escoamento bifásico na região limítrofe à geração de microbolhas monodispersas.....	61
<b>Figura 25-</b> Mapa de regime de fluxo na região de transição entre os padrões: microbolhas monodispersas isoladas e bolhas alongadas. ....	62

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Análise estatística das microbolhas geradas utilizando o dispositivo sem o acoplamento do microcapilar.....52
- Tabela 2** - Análise estatística das microbolhas geradas utilizando o dispositivo híbrido.....56

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

$\mu$ -PIV	<i>Micro scale Particle Image Velocimetry</i>
$\mu$ TAS	<i>Micro Total Analysis System</i>
3D	Três dimensões
CEHDA	<i>Coaxial Electro Hydrodynamic Atomization</i>
CSV	<i>Comma Separated Values</i>
CTSE	Centro de Tecnologia de Sistemas Embarcados
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HIFU	<i>High Intensity Focused Ultrasound</i>
LACIT	Laboratório de Ciências Térmicas
MEMs	<i>Micro Electro Mechanical Systems</i>
NUFER	Núcleo de Prototipagem Ferramental
PPGEM	Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica
PFB	Gás perfluorobutano
PFC	Gás perfluorocarbono
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
USB	<i>Universal Serial Bus</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

$g$	Aceleração da gravidade
$A$	Área de secção reta do canal
$\kappa$	Coefficiente de difusividade
$c_s$	Concentração gasosa na superfície
$c_i$	Concentração inicial externa do meio líquido
$\rho$	Densidade
$\rho_r$	Densidade relativa
$\delta_m$	Desvio absoluto médio
$\sigma$	Desvio padrão
$D_h$	Diâmetro hidráulico
$D$	Diâmetro
$D_m$	Diâmetro médio
$D_e$	Diâmetro externo
$D_i$	Diâmetro interno
$\varepsilon_p$	Erro percentual
$C_a$	Número capilar
$R_e$	Número de Reynolds
$P_e$	Pressão hidrostática externa
$M$	Massa molar do gás
$P$	Pressão
$p_o$	Pressão atmosférica local
$R_o$	Raio de repouso microbolha
$Q_L$	Vazão da fase líquida
$Q_G$	Vazão da fase gasosa
$K$	Escala Kelvin
$T$	Temperatura absoluta
$\gamma$	Tensão superficial
$\Omega_G$	Fração de volume da fase gasosa

V	Velocidade
$\eta$	Viscosidade
$\eta_d$	Viscosidade dinâmica
$\eta_r$	Viscosidade relativa
$W_d$	Largura do canal de entrada da fase gasosa
$\eta_c$	Viscosidade da fase contínua
$\eta_e$	Viscosidade da emulsão
fps	Taxa de quadros por segundo
r	Raio instantâneo da microbolha
$\chi$	Coefficiente de variação percentual
dr/dt	Taxa de variação do raio da microbolha em relação ao tempo
L	Perímetro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1 OBJETIVOS .....	18
1.2 JUSTIFICATIVA .....	19
1.3 ESTRUTURA DO TRABALHO .....	19
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
2.1 MICROBOLHA COMO AGENTE TERAPÊUTICO .....	20
2.2 ESTABILIDADE DAS MICROBOLHAS .....	27
2.3 MICROFLUÍDICA APLICADA NA GERAÇÃO DE MICROBOLHAS.....	32
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
3.1 INSTRUMENTAÇÃO .....	42
3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	45
3.2.1 Determinação do Tamanho da Microbolha .....	47
3.2.2 Estudo da Estabilidade da Microbolha .....	48
3.2.3 Obtenção dos Padrões de Fluxo.....	48
3.2.4 Elaboração do Mapa de Regime de Fluxo.....	49
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROBOLHAS GERADAS.....	50
4.2 ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS MICROBOLHAS .....	57
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PADRÕES DE FLUXO .....	60
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO MAPA DE REGIME DE FLUXO .....	61
<b>5 CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>64</b>
5.1 CONCLUSÕES .....	64
5.2 TRABALHOS FUTUROS .....	65
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As microbolhas foram inicialmente introduzidas como agentes de contraste para ultrassonografia. Elas são capazes de modificar a relação de sinal-ruído das imagens ultrassonográficas, melhorando assim a avaliação da informação clínica sobre o tecido humano investigado. Desenvolvimentos recentes têm demonstrado a viabilidade do uso das microbolhas como agentes carreadores para entrega localizada de fármacos apropriados para o tratamento de doenças (STRIDE, 2009; STRIDE; EDIRISINGHE, 2009). Bem conhecidos por seu uso em imagens em tempo real sem irradiação perigosa aos tecidos, ultrassons também podem ser utilizados para controlar o momento da liberação do fármaco quando este é transportado por uma microbolha. Este tipo de aplicação terapêutica é uma modalidade de tratamento promissora, particularmente nos casos em que concentrações elevadas de fármacos são administradas de maneira sistêmica, provocando efeitos secundários indesejáveis (LINDNER; KAUL, 2001). A superação destes efeitos conduz a uma melhor qualidade de vida dos pacientes, reduzindo a possibilidade de hospitalização secundária durante o tratamento.

A capacidade de decidir quando e onde no corpo as microbolhas serão fragmentadas resultando na entrega localizada do fármaco, pode potencialmente, reduzir os efeitos colaterais. No entanto, existem alguns desafios a serem superados como, por exemplo: (a) encontrar substâncias compatíveis (fármacos) que possam ser introduzidas nas microbolhas; (b) gerar microbolhas com diâmetros menores do que 10  $\mu\text{m}$ , que podem ser introduzidas na corrente sanguínea, sem causar embolia gasosa no paciente; (c) gerar microbolhas estáveis entre o período da sua geração, manipulação e utilização e (d) gerar microbolhas monodispersas para aumentar a resposta ao campo ultrassônico potencializando a fragmentação e a consequente liberação do fármaco.

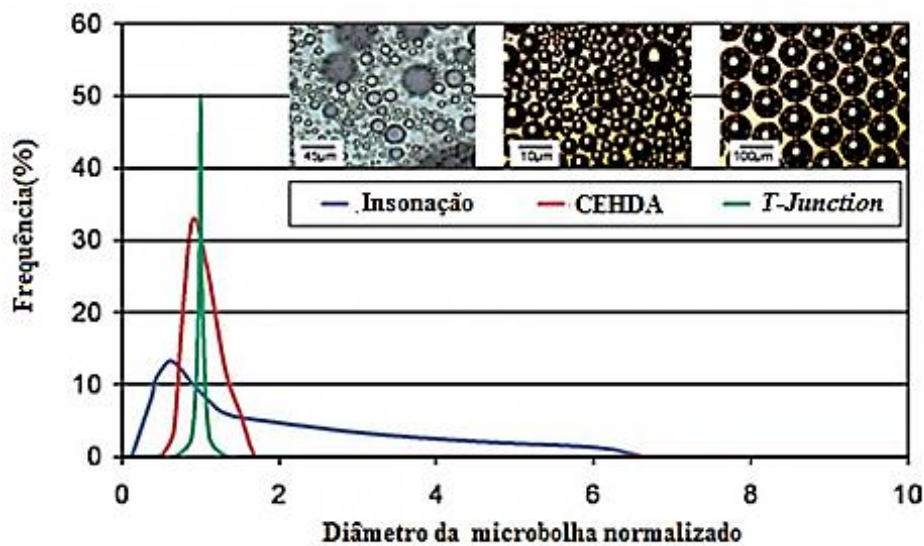
No processo dinâmico de produção de microbolhas baseado nos sistemas microfluídicos, as microbolhas são formadas por um processo de estrangulamento, devido à instabilidade na interface gás/líquido (FU, 2009; WHEATLEY, 1990). O tamanho e o coeficiente de variação percentual das microbolhas são propriedades importantes. Nos dispositivos microfluídicos, o tamanho das microbolhas é associado às propriedades físicas da

fase líquida (isto é, viscosidade, tensão superficial e densidade), vazões das fases líquida e gasosa, pressão de gás, diâmetro e perfil dos canais e velocidade de estrangulamento. Para uma dada vazão da fase gasosa, há uma vazão máxima da fase líquida, acima da qual o fluxo gasoso é bloqueado. Nesse caso, não há formação de microbolhas. Por outro lado, o aumento indiscriminado da vazão da fase gasosa pode provocar a atomização da fase líquida. Portanto, o controle do ajuste entre essas variáveis desempenha um papel chave na obtenção de microbolhas de tamanhos diferentes, associados às propriedades da fase líquida.

Muitas técnicas têm sido propostas para a criação de microbolhas. Dentre elas incluem-se: a técnica da insonação, da atomização coaxial eletro hidrodinâmica (CEHDA) e dos dispositivos microfluídicos (*T-junction* e *cross-junction*) (STRIDE; EDIRISINGHE, 2009).

De acordo com Pancholi e Stride (2008), a técnica *T-junction* pode gerar microbolhas em uma única etapa com um coeficiente de variação em torno de 1%, com menores custos operacionais, uma vez que não necessita de condições críticas de controle ambiental e de limpeza, além da facilidade de fabricação, quando comparado com a micro litografia (FIORINI; CHIU, 2005). A Figura 1 apresenta as curvas de distribuição do diâmetro das microbolhas em relação à frequência (microbolhas isoladas) para as três técnicas de geração (isto é, insonação, CEHDA e *T-junction*). Observa-se que o menor valor da dispersão ocorre para a técnica *T-junction*. Além disso, um único dispositivo pode ser usado para produzir microbolhas de diferentes tamanhos, baseado no controle da vazão da fase líquida, da fase gasosa, pressão e viscosidade da fase líquida.

**Figura 1** - Curvas de distribuição típica do diâmetro das microbolhas preparadas pelas técnicas: insonação, atomização coaxial eletro hidrodinâmica e *T-junction*.



Fonte: Adaptado de Stride et al. (2008).

Para que as microbolhas possam desempenhar o papel de transportadoras de fármacos é necessário que mantenham como unidades individuais e estáveis no meio no qual estão dispersas. Para que isto aconteça, elas são revestidas por uma camada polimérica (WHEATLEY; LATHIA, 2007), ou alternativamente, por matrizes lipídicas biocompatíveis. Embora estes tipos de revestimento tenham menores estabilidades que os poliméricos, eles são mais fáceis de serem obtidos, além de propiciar a produção de microbolhas mais ecogênicas<sup>1</sup> (BORDEN; LONGO, 2002; FERRARA; POLLARD, 2007; NOMIKOU; MCHALE, 2010; UNGER; PORTER, 2004).

Levando em consideração a eficiência demonstrada pela técnica *T-junction* na geração de microbolhas monodispersas, optou-se pelo seu uso no desenvolvimento deste trabalho. Na fabricação dos dispositivos geradores foi utilizada a técnica de impressão 3D. A principal vantagem desta técnica em relação à microlitografia (BEEBE; MENSING, 2002; LUTZ; CHEN, 2003; WANG; LEVCHENKO, 2009; WANG; ZHAO, 2009; WANG;

<sup>1</sup> Estruturas que refletem as ondas sonoras de alta frequência e, portanto, passíveis de serem trabalhadas através de técnicas de ultrassom .

ZHANG, 2012; WHITESIDES; OSTUNI, 2001), é a fabricação dos dispositivos em uma única etapa, eliminando os procedimentos adicionais de adaptação de conexões da escala macro para a micro, bem como a possibilidade adicional de produzir canais de seções circulares, o que facilita a modelagem matemática da dinâmica de formação das microbolhas. O óleo de girassol foi escolhido como matriz lipídica de revestimento das microbolhas por sua biocompatibilidade (NIKOLAEVSKY; FILIPPENKO, 1980). Foram realizados estudos sobre a dinâmica de formação das microbolhas com a caracterização do coeficiente de variação percentual do diâmetro, além do estudo da estabilidade das microbolhas no meio aquoso em relação ao tempo. Também foi obtida a caracterização dos padrões de fluxo da região limítrofe à geração de microbolhas monodispersas isoladas, e elaborado o mapa de regime de fluxo para a região supracitada.

## 1.1 OBJETIVOS

### **Objetivo geral**

Gerar microbolhas monodispersas utilizando o óleo de girassol como matriz lipídica de revestimento, empregando a técnica *T-junction*.

### **Objetivos específicos**

- Projetar e fabricar dispositivos de microfluídica voltados para a geração de microbolhas monodispersas utilizando a técnica de impressão 3D.
- Estudar a viabilidade de utilização do óleo de girassol como matriz lipídica de revestimento das microbolhas.
- Estudar o processo dinâmico de geração das microbolhas com a caracterização do coeficiente de variação percentual do diâmetro destas.
- Estudar a estabilidade das microbolhas dispersas em meio aquoso em relação ao tempo.
- Caracterizar os padrões de fluxo e obter o mapa de regime de fluxo da região limítrofe à geração de microbolhas monodispersas.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

A utilização de microbolhas como unidades carregadoras de fármacos constitui-se uma das fronteiras mais promissoras da medicina moderna, com grande potencial para revolucionar o tratamento de doenças, especificamente onde a alta concentração de medicamentos administrados por via sistêmica provoca efeitos colaterais indesejáveis ao paciente. Para que esta modalidade de tratamento se torne acessível, faz-se necessário o desenvolvimento de dispositivos capazes de gerar microbolhas estáveis, uniformes e de diâmetros compatíveis às aplicações terapêuticas. Atualmente, muitas pesquisas sobre este tema estão em andamento, buscando aperfeiçoar as técnicas de produção de microbolhas, procurando novas matrizes de revestimento biocompatíveis e que ao mesmo tempo responda de maneira satisfatória aos pré-requisitos de estabilidade e capacidade de resistirem às agressões do meio no qual estão dispersas.

A viabilidade desta nova modalidade de tratamento passa pelo desenvolvimento de técnicas de fabricação de dispositivos geradores mais simples, acessíveis e que ao mesmo tempo consigam gerar microbolhas uniformes, estáveis e de tamanhos compatíveis às aplicações clínicas.

## 1.3 ESTRUTURA DO TRABALHO

O presente trabalho divide-se como segue. No Capítulo 2, serão apresentados os principais conceitos, técnicas e metodologias atuais, cujo conhecimento é indispensável para um bom entendimento das seções posteriores. No Capítulo 3, apresentam-se os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento do trabalho. No Capítulo 4, apresentam-se os resultados experimentais, discussão e os desdobramentos quanto à validade e relevância do trabalho. Por fim no Capítulo 5, apresentam-se as conclusões sobre o tema estudado enfatizando a sua contribuição para o desenvolvimento de novas técnicas de geração de microbolhas, assim como a perspectiva de trabalhos futuros.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica sobre conceitos fundamentais e trabalhos científicos existentes na literatura. Na Seção 2.1, será levantada a origem do uso clínico das microbolhas, as técnicas atuais de geração, as formas de anexação de fármacos e o processo de entrega localizada utilizando o ultrassom. Na Seção 2.2, será discutida a importância da estabilidade no uso das microbolhas como agentes transportadores de fármacos no tratamento localizado de doenças. Finalmente, na Seção 2.3, serão abordados os principais conceitos de microfluídica relacionados à descrição dinâmica do processo de geração das microbolhas.

### 2.1 MICROBOLHA COMO AGENTE TERAPÊUTICO

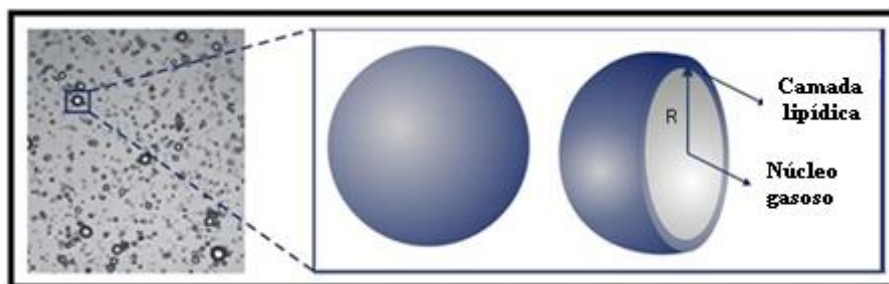
O uso do ultrassom na obtenção de imagens médicas para diagnóstico se popularizou devido à baixa invasividade e baixo custo operacional comparado à tomografia e à ressonância nuclear magnética (NOMIKOU; MCHALE, 2010). A imagem ultrassonográfica se converteu em uma modalidade diagnóstica clínica importante porque levou à obtenção de imagens em tempo real de estruturas internas de órgãos, tecidos e fluxo sanguíneo, livre da ação de radiação ionizante (STRIDE; SAFFARI, 2003). Apesar de todas as vantagens citadas anteriormente, as imagens de ultrassom possuem relação sinal-ruído inferior em relação às imagens tomográficas e de ressonância magnética nuclear (RMN). Na tentativa de melhorar a capacidade de visualização de estruturas internas e do fluxo sanguíneo no seu interior, há aproximadamente quatro décadas, as microbolhas estão sendo utilizadas como agentes de contraste nos exames de ultrassom (GRAMIAK; SHAH, 1968; NOMIKOU; MCHALE, 2010).

As diretrizes para o uso clínico de microbolhas em humanos foram publicadas pela Federação Europeia de Sociedades de Ultrassom em medicina e biologia em primeira versão em 2004 (JAKOBSEN; OYEN, 2005), e seu uso seguro foi aprovado em 2005

(LENTACKER; GEERS, 2010). Estas normas reguladoras foram destinadas à criação de protocolos padrão para a utilização e administração deste procedimento, na tentativa de preservar a saúde dos pacientes. Em geral, as microbolhas utilizadas como agentes de contraste são extremamente seguras e bem toleradas. Em humanos, a incidência de efeitos colaterais é na maioria das vezes muito baixa, ocasionalmente produzindo dores de cabeça ou náuseas, sendo tratadas utilizando procedimentos terapêuticos simples (KHEIROLOMOOM; DAYTON, 2007).

Recentemente, a energia do ultrassom passou a ser utilizada também para controlar a entrega de agentes farmacológicos e material genético (FERRARA; POLLARD, 2007), utilizando microbolhas revestidas por uma camada lipídica ou polimérica, como é mostrado na Figura 2.

**Figura 2** - Representação em 3D de uma microbolha mostrando o núcleo gasoso e a camada de revestimento.



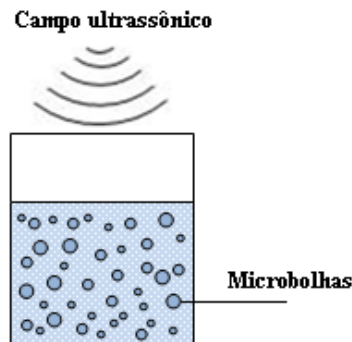
Fonte: Adaptado de Lentacker (2010).

A técnica mais utilizada para a preparação das microbolhas é a insonação. Primeiramente, o gás e o líquido são emulsionados para formar uma suspensão de microbolhas envoltas por um material surfactante. Em seguida, a suspensão é submetida a um campo ultrassônico. As altas temperaturas e pressões geradas em consequência da cavitação inercial na suspensão conduzem a uma modificação química na estrutura que envolve as microbolhas, melhorando a sua estabilidade (STRIDE; EDIRISINGHE, 2009).

A distribuição do tamanho das estruturas formadas depende da frequência, da intensidade e do regime de pulso do ultrassom. Devido a não existência de uma teoria simples

que relacione estas variáveis, o protocolo de fabricação é feito ainda de modo empírico, conforme apresentado na Figura 3.

**Figura 3** - Esquema da produção de microbolhas por insonação. Primeiramente, o gás e o líquido são emulsionados para formar uma suspensão de microbolhas revestidas por um material surfactante. Em seguida, a suspensão é submetida a um campo ultrassônico.



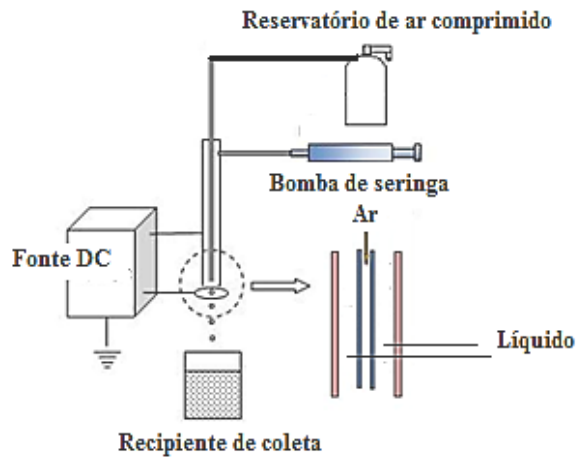
Fonte: Autoria própria.

A variação de tamanho das microbolhas obtidas pela técnica da insonação é muito grande. Para uma administração intravenosa, é necessária uma filtração adicional para remover as microbolhas de diâmetros maiores que 10  $\mu\text{m}$ , que podem potencialmente causar uma embolia gasosa no paciente (PANCHOLI; FAROOK, 2008).

Uma técnica recentemente aplicada na preparação de microbolhas é a atomização coaxial eletro hidrodinâmica (CEHDA) (FAROOK; EDIRISINGHE, 2008). Este método evoluiu a partir da atomização eletrodinâmica, em que um fluxo de líquido é direcionado coaxialmente a um fluxo gasoso sob a influência de um campo elétrico, até formar gotículas uniformes. A formação das microbolhas acontece devido à imiscibilidade dos fluidos gás/líquido. Na prática, duas agulhas são coaxialmente dispostas com a vazão da fase líquida e gasosa controladas com precisão por meio de dispositivos de controle, como é apresentado na Figura 4. Nesta técnica, existem muitas combinações de fluxo de gás, fluxo de líquido, tensão aplicada e viscosidade para a produção contínua e uniforme das microbolhas. A variação desses parâmetros determina o controle do tamanho e da uniformidade destas.



**Figura 4** - Sistema de atomização coaxial eletro hidrodinâmica (CEHDA).

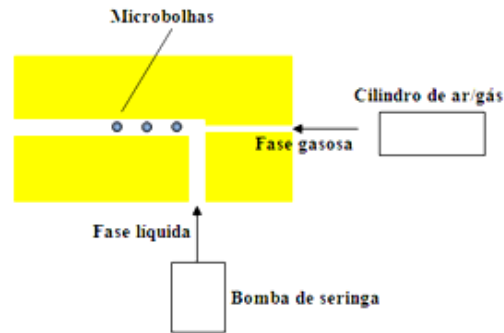


Fonte: Adaptado de Stride et al. (2008).

Outro procedimento dinâmico para produção de microbolhas é fundamentado na microfluídica. As microbolhas são formadas por um processo de estrangulamento devido à instabilidade na interface do gás/líquido (PANCHOLI; STRIDE, 2008). O tamanho da microbolha está associado à rapidez do estrangulamento. Quanto mais rápido o estrangulamento, menor o seu tamanho, este por sua vez, depende da vazão da fase líquida e da vazão da fase gasosa, que pode ser aumentada ou diminuída. Desse modo, o mecanismo de formação da microbolha é influenciado significativamente pela variação destes parâmetros, e em particular pela viscosidade ( $\eta$ ) do líquido. O controle ordenado destas variáveis desempenha um papel fundamental em relação ao tamanho da microbolha (FU; MA, 2009).

Um sistema micro-fluídico muito utilizado na produção de microbolhas é o entroncamento em T (*T-junction*), como é mostrado na Figura 5. Os canais que formam a parte superior do braço do entroncamento estão ligados a um cilindro que fornece o gás a uma determinada vazão e pressão constante. O canal que forma a parte inferior do braço está ligado a uma bomba de seringa que controla a vazão da fase líquida.

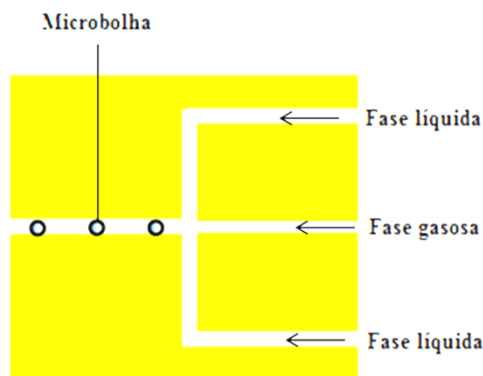
**Figura 5** - Sistema *T-junction*.



Fonte: Autoria própria

Outro sistema micro-fluídico bastante utilizado na geração de microbolhas é a junção em cruz (*cross-junction*), como é apresentado na Figura 6. No sistema *cross-junction*, a alimentação da fase líquida é feita a partir de dois canais perpendiculares ao canal de confluência. Assim como no sistema *T-junction*, nesse sistema, o tamanho das microbolhas é determinado pela relação entre as vazões da fase líquida e gasosa, pressão, viscosidade da fase líquida e largura do canal de entrada da fase gasosa.

**Figura 6** - Sistema *cross-junction*.

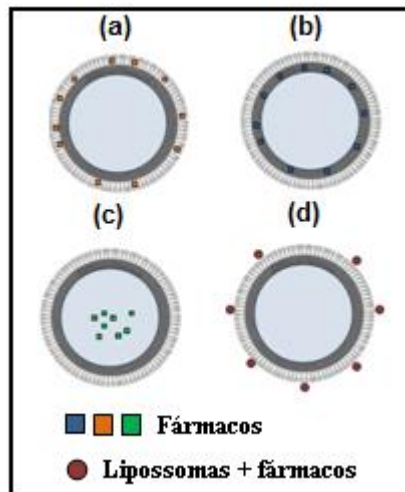


Fonte: Autoria própria.

Para que as microbolhas possam desempenhar o papel de unidades transportadoras, é necessário que tragam consigo um fármaco ou princípio ativo necessário para promover o tratamento das células e tecidos doentes no local desejado (LINDNER; KAUL, 2001).

A Figura 7 apresenta as diversas maneiras de transporte de fármacos utilizando as microbolhas: (a), fármacos podem ser parte integrante da membrana externa que envolve a microbolha; (b), fármacos podem unir-se à membrana interna que envolve a microbolha; (c), fármacos podem encontrar-se no interior das microbolhas associadas ao gás; (d), fármacos podem ainda se associar a lipossomas, unindo-se eletrostaticamente na camada externa da microbolha.

**Figura 7** - Equema das diversas maneiras de transporte de fármacos utilizando microbolhas.



Fonte: Autoria própria.

Legenda: (a), Fármacos podem ser parte integrante da membrana externa que envolve a microbolha; (b), Fármacos podem unir-se à membrana interna que envolve a microbolha; (c), Fármacos podem encontrar-se no interior das microbolhas associadas ao gás; (d), Fármacos podem ainda se associar a lipossomas, unindo-se eletrostaticamente na camada externa da microbolha.

A modalidade de entrega localizada de fármacos utilizando microbolhas usa um transdutor ultrassônico externo para eclodi-las e liberar o medicamento no local específico de interesse. Pesquisadores têm investigado se a eclosão por ultrassom das microbolhas carregadas transfere de modo eficiente o agente farmacológico ao tecido a ser tratado, sem prejudicar a atividade funcional do endotélio celular (UNGER; PORTER, 2004). Há evidências de que a ação do campo ultrassônico modifica a estrutura da membrana, facilitando assim a absorção do material terapêutico (LINDNER; KAUL, 2001).

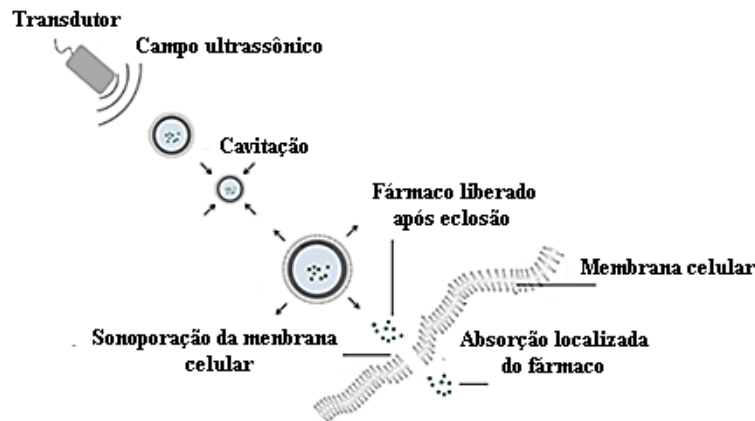
Segundo Ferrara e Pollard (2007), o uso das propriedades do ultrassom para a modalidade de entrega localizada de fármacos pode ser baseado em três princípios: (a), o ultrassom pode ter um efeito direto na membrana celular, tornando-a mais permeável, facilitando assim a absorção do fármaco através desta; (b), o ultrassom pode variar as características químicas do fármaco, ativando-o para que possa agir (por exemplo, atacar as células cancerosas); (c), as microbolhas podem transportar fármacos/genes, para locais determinados e liberá-los usando a energia ultrassônica.

Nesta modalidade de tratamento, para uma determinada intensidade acústica e frequência compreendida entre 0,75 - 3 MHz (STRIDE; EDIRISINGHE, 2009), as ondas de pressão por ressonância, potencializam o rompimento das camadas que revestem as microbolhas liberando o material terapêutico na circulação sanguínea (NOMIKOU; MCHALE, 2010). Uma característica importante para esta modalidade de entrega de fármacos é a uniformidade da população das microbolhas. Como a frequência de ressonância depende fortemente do diâmetro da microbolha (STRIDE, 2009), uma população monodispersa responde melhor ao campo ultrassônico incidente, potencializando a liberação do fármaco no meio no qual está dispersa. Esta modalidade de entrega de fármacos utilizando microbolhas como unidades carreadoras de fármacos ativadas por ultrassom minimiza os efeitos colaterais devido à menor quantidade de medicamento requerida para atuar na região específica de tratamento.

A Figura 8 apresenta a eclosão de uma microbolha sob a ação de um campo ultrassônico, liberando o agente farmacológico carregado pela bolha. A influência do campo

ultrassônico provoca um fenômeno chamado sonoporação<sup>2</sup> da membrana, o que altera a sua estrutura, aumentando a permeabilidade de materiais bioativos (fármacos) a partir do ambiente externo à célula (LIANG, 2010).

**Figura 8** - Efeito do campo ultrassônico sobre a microbolha.



Fonte: Adaptado de Lentacker (2009).

NOTA: A microbolha é fragmentada por efeito de cavitação, fazendo com que o fármaco seja liberado no local específico. O fármaco livre pode ser absorvido por mecanismos normais.

## 2.2 ESTABILIDADE DAS MICROBOLHAS

No tratamento convencional, as drogas ou fármacos são administrados de maneira sistêmica aos pacientes, interagindo com os tecidos fora dos locais específicos de atuação, causando, na maioria das vezes, reações desagradáveis ou reações adversas, constituindo um problema importante na prática do profissional da área de saúde (NOMIKOU; MCHALE, 2012). Sabe-se que essas reações são causas significativas de hospitalização, de aumento do tempo de permanência hospitalar e até mesmo de óbito (NOMIKOU; MCHALE, 2010). Além disso, elas afetam negativamente a qualidade de vida do paciente, influenciam na perda de

<sup>2</sup> Sonoporação é um fenômeno que acontece quando a célula interage com um campo ultrassônico. Esta interação provoca o aparecimento temporário de microporos na membrana celular, aumentando a sua permeabilidade, o que permite uma maior absorção do fármaco a partir do ambiente extracelular.

confiança deste para com o médico, aumentam custos, podendo também atrasar os tratamentos, uma vez que podem levar a uma nova enfermidade associada ao procedimento terapêutico prescrito (NOMIKOU; MCHALE, 2012). Uma das causas de tais efeitos colaterais indesejáveis é a quantidade do agente farmacológico administrado sistemicamente ser bem maior do que a necessário para provocar o efeito clínico desejado (NOMIKOU; MCHALE, 2010).

Para impedir a interação livre do fármaco com os tecidos fora do alvo, ele pode ser agregado a uma microbolha revestida por um suporte lipídico ou polimérico, a partir da qual ele é liberado no local de destino pela degradação do vínculo por meio de enzimas, pela mudança do pH, ou pela ação de um campo acústico com frequência e intensidade controlada (LINDNER; KAUL, 2001).

Quando uma microbolha é fragmentada por efeito de cavitação, o fármaco pode ser liberado, embora possa ainda manter alguma associação com o surfactante. O fármaco livre pode, então, ser absorvido por mecanismos normais, por transporte ativo através da membrana celular ou mecanismos associados (LENTACKER; GEERS, 2010).

A capacidade das microbolhas se manterem como unidades individuais conservando o agente farmacológico intacto dentro dos seus domínios em um determinado meio está associada à sua estabilidade. Esta característica tem uma importância fundamental no destino que terão na entrega localizada de fármacos, pois caso contrário, o fármaco pode ser liberado fora do local escolhido para o tratamento.

As microbolhas recém-formadas sem encapsulação em um agente lipídico ou polimérico se dissolvem de forma espontânea e quase instantaneamente em consequência da tensão superficial da interface do líquido com o gás. A tensão superficial ( $\gamma$ ) é um efeito físico que ocorre na interface entre duas fases imiscíveis, e quando esta interface é curva resulta em uma pressão mais elevada no lado côncavo destas. A queda de pressão através da interface da microbolha é dada pela Equação de Laplace (STRIDE, 2009), como mostra a Equação 1.

$$\Delta P = P_e - P_i = \frac{2\gamma}{R} \quad (1)$$

Onde  $P_i$  é a pressão dentro da microbolha,  $P_e$  é a pressão hidrostática fora da microbolha e  $R$  representa o raio da microbolha. É necessário que se tenha uma barreira entre a fase líquida e a fase gasosa para sustentar a vesícula de gás.

A equação de Epstein-Plesset descreve o processo de estabilidade da microbolha, e aponta dois fatores de capital importância neste processo: resistência da superfície à permeação do gás e redução da tensão superficial, como é mostrado na Equação 2.

$$-\frac{dr}{dt} = \frac{\kappa(c_i - c_s)BT}{M\left(p_0 + \frac{4\gamma}{3R_0}\right)} \left[ \frac{1}{R_0} + \frac{1}{\sqrt{\pi\kappa t}} \right] \quad (2)$$

O primeiro membro da equação  $dr/dt$  representa a taxa de variação do raio da microbolha em relação ao tempo,  $\kappa$  é o coeficiente de difusividade,  $B$  é constante universal dos gases perfeitos,  $T$  é a temperatura absoluta,  $M$  é o massa molar do gás,  $t$  é o tempo,  $c_i$  é a concentração inicial externa do gás no meio líquido,  $r$  é o raio instantâneo da microbolha,  $R_0$  é o raio inicial da microbolha,  $p_0$  é a pressão ambiente,  $\gamma$  tensão superficial e  $c_s$  é a concentração do gás dissolvido na superfície da microbolha.

Analisando a Equação 2, observa-se que a taxa de variação do raio da microbolha será maior quanto maior for a diferença entre  $c_i$  e  $c_s$  ( $c_i - c_s$ ). Outro fator que afeta a estabilidade da microbolha é a difusividade efetiva da interface ( $\kappa$ ). As constantes  $\kappa$  e  $\gamma$  dependem do gás e do líquido sob investigação, além da presença de qualquer material de revestimento na superfície da microbolha, o que pode reduzir a tensão superficial e aumentar significativamente a resistência à difusão do gás (BORDEN; LONGO, 2002). Estas quantidades também serão afetadas pela temperatura e pressão na superfície da microbolha, assim como o valor da concentração do gás dissolvido no meio líquido.

Este modelo proposto por Epstein-Plesset, pressupõe também uma geometria da bolha perfeitamente esférica no decorrer da dissolução, e não contempla as alterações das propriedades da camada que envolve a microbolha com a deformação para acomodar a contração do gás. No entanto, ele fornece informações úteis para mostrar o efeito da estabilização do invólucro da microbolha (EPSTEIN; PLESSET, 1950).

Uma maneira de aumentar a estabilidade da microbolha é preenchê-la com gases insolúveis em água como o perfluorocarbono (PFC) ou perfluorobutano (PFB), resistentes à permeação à água (SIMBERG; MATTREY, 2009; TAKAHASHI; HASEGAWA, 2012). Segundo Morgan e Allen (2000), a resistência de permeação do perfluorobutano (PFB) em relação à água é 300 vezes maior do que a resistência de permeação do ar em relação a este mesmo meio. Para que a microbolha tenha uma adequada vida útil, a sua camada de revestimento deve ter uma resistência específica para minimizar a tensão superficial e, ao mesmo tempo, resistir à permeação gasosa, aumentando assim o seu tempo de vida. Morgan e Allen (2000) mostraram que o efeito da resistência de permeação gasosa no invólucro da microbolha é tanto maior quanto maior for a massa molar ( $M$ ) da fase gasosa, como mostra a Equação 2.

Os agentes típicos de contraste de ultrassom (microbolhas) possuem revestimentos resistentes de composições diferentes, como por exemplo, camadas lipídicas ou poliméricas. Esta característica do revestimento permite o armazenamento das microbolhas por um longo prazo em recipiente selado (FERRARA; POLLARD, 2007).

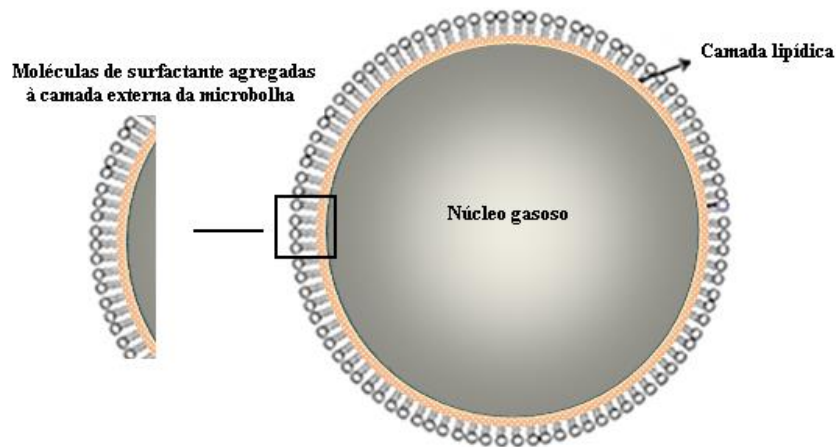
Os lipídios são substâncias caracterizadas pela sua baixa solubilidade em água e alta solubilidade em solventes orgânicos. Suas propriedades físicas refletem a natureza hidrofóbica das suas estruturas químicas (UNGER; SHEN, 1994).

Devido às propriedades físico-químicas, estes compostos podem facilmente envolver estruturas formando uma camada externa a estas, com propriedades físicas bastante peculiares. Os invólucros lipídicos são menos estáveis do que os revestimentos poliméricos, mas eles são mais fáceis de serem produzidos e são capazes de gerar microbolhas mais ecogênicas (UNGER; SHEN, 1994). Além disso, os lipídios podem absorver agregados solúveis (micelas e vesículas) na interface gás/líquido e se auto constituírem em um revestimento monocamada (UNGER; PORTER, 2004). Em uma nanoescala, as moléculas lipídicas são orientadas de modo que as caudas hidrofóbicas em contato com a fase gasosa interagem através de forças hidrofóbicas e de dispersão, que podem ser moduladas aumentando ou diminuindo o comprimento da cadeia (BORDEN; MARTINEZ, 2006).

A Figura 9 apresenta uma maneira bastante utilizada para aumentar a estabilidade das microbolhas. Trata-se de agregar ao revestimento lipídico, moléculas de tensoativos ou surfactantes.



**Figura 9** - Esquema mostrando as moléculas de um tensoativo agregadas à camada lipídica da microbolha.

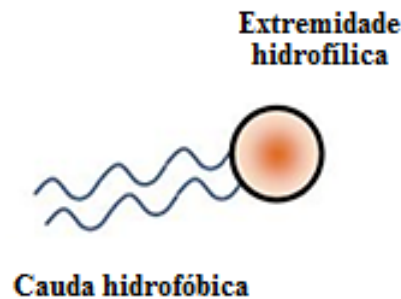


Fonte: Autoria própria.

Tensoativos são substâncias que diminuem a tensão superficial ou influenciam a superfície de contato entre dois líquidos (FAROOK; ZHANG, 2007). A Figura 10 apresenta uma molécula de um tensoativo anfifílico. Estas moléculas possuem uma extremidade eletricamente carregada de natureza polar, enquanto a outra tem natureza apolar. Isto proporciona uma característica peculiar à molécula: uma de suas extremidades é hidrofílica (solúvel em meio aquoso) e a outra é hidrofóbica (insolúvel em água, porém solúvel em lipídios e solventes orgânicos).

Os fosfolipídios também fazem parte das substâncias ditas anfifílicas ou anfipáticas. Eles são lipídios que contêm ácido fosfórico como mono ou diéster. São constituídos por uma molécula de glicerol, duas (ou uma) cadeias de ácidos graxos (uma saturada e uma insaturada), um (ou dois) grupo fosfato e uma molécula polar ligada a ele (FAROOK; STRIDE, 2009). Neste grupo, estão incluídos os ácidos fosfatídicos e os fosfoglicerídeos. Assim como os tensoativos, os fosfolipídios são moléculas anfifílicas, isto é, possuem uma extremidade constituída pelo grupo fosfato que é polar e hidrofílica (tem afinidade por água) e outra constituída por cadeias de ácidos graxos de natureza apolar e hidrofóbica (PANCHOLI; FAROOK, 2008).

**Figura 10** - Esquema de um tensoativo anfifílico.



Fonte: Autoria própria.

A ação do tensoativo na camada lipídica que reveste a microbolha está associada à diminuição da tensão superficial, aumento da viscosidade, e da resistência à permeação de gases, incrementando a estabilidade da microbolha (QUEIMADA; MARRUCHO, 2004).

### 2.3 MICROFLUÍDICA APLICADA NA GERAÇÃO DE MICROBOLHAS

O comportamento dinâmico de fluidos imiscíveis em regime bifásico (gás/líquido) confinados em microcanais tem sido estudado ao longo dos anos.

O esclarecimento dos efeitos de microescala em regime bifásico e as características dos padrões e mapas de regime de fluxo tornaram-se mais necessários devido ao rápido desenvolvimento de micro-dispositivos usados para aplicações em engenharia, incluindo dispositivos médicos, e sistemas de refrigeração de vários tipos de equipamentos de alto desempenho, tais como supercomputadores e lasers de alta potência.

Além dos fenômenos causados pelos efeitos de superfície, este campo de estudo emergente permite desenvolver dispositivos miniaturizados para operação em um domínio

que parecia ter um caráter inviável no passado devido, aos desafios tecnológicos (SQUIRES; QUAKE, 2005; TABELING, 2005; WANG; LEVCHENKO, 2009).

A microfluídica surgiu no final da década de 1970, como parte da tecnologia responsável pelo desenvolvimento de sistemas micro-eletromecânicos (MEMS), utilizando a infraestrutura e as técnicas de fabricação estabelecidas na microeletrônica (LIN; LEE, 2010). O primeiro dispositivo utilizado foi produzido no início da década de 1980, tendo como função a análise de gases por cromatografia (WIDMER, 1983). Inicialmente, utilizou-se o silício como substrato para a fabricação de microssistemas, porém, nas últimas décadas este tem sido substituído por outros materiais como o vidro, polímeros diversos e materiais cerâmicos (BRESLAUER; LEE, 2006; GESCHKE, 2009).

A microfluídica é uma parte da mecânica dos fluidos que processa ou manipula pequenas quantidades de fluidos, utilizando canais de dimensões compreendidas entre dezenas e centenas de micrômetros (BEEBE; MENSING, 2002). Nesta escala, os fluidos assumem um comportamento diferente do observado na macroescala. Na microescala os fluidos podem ser estudados como fluxo molecular ou meio contínuo. Se o fluido for modelado como fluxo molecular, ele é considerado como um conjunto de moléculas, podendo ser trabalhado de forma determinística (mecânica newtoniana) ou probabilística (mecânica estatística) (LIN; LEE, 2010).

O fluido modelado como um meio contínuo pode ser caracterizado pelas equações de Navier-Stokes<sup>3</sup>, ignorando a sua natureza molecular, sendo descrito pelas variações espaciais e temporais de densidade, velocidade, pressão e temperatura. Nesta escala, os efeitos da gravidade e da inércia são muito inferiores que aqueles causados pela superfície de contato e viscosidade, o que não ocorre na macroescala (BEEBE; MENSING, 2002).

Na microescala, a relação entre a superfície de contato e volume de líquido que circula nos microcanais aumenta muito permitindo assim uma maior eficiência do transporte de calor e de massa (BEEBE; MENSING, 2002; TABELING, 2005).

---

<sup>3</sup> As equações de Navier Stokes são equações diferenciais que descrevem o escoamento de fluidos newtonianos. São equações de derivadas parciais que permitem determinar os campos de velocidade e de pressão num escoamento. Foram denominadas assim após Claude-Louis Navier e George Gabriel Stokes desenvolverem um conjunto de equações que descrevem o movimento das substâncias fluidas, tais como líquidos e gases. Estas equações estabelecem que mudanças do momento e da aceleração de uma partícula fluida são caracterizadas pelas mudanças da pressão e forças viscosas dissipativas (similar à fricção) que atuam dentro do fluido.

O regime de fluxo é caracterizado pelo número de Reynolds conforme a Equação 3.

$$Re = \frac{\rho V D_h}{\eta} \quad (3)$$

Na Equação 3,  $\rho$  representa a densidade,  $V$  é a velocidade média do fluxo no canal,  $D_h$  é o diâmetro hidráulico do canal e  $\eta$  é viscosidade dinâmica do fluido.

O diâmetro hidráulico do canal é dado pela Equação 4, onde  $A$  é a área da seção reta do canal e  $L$  é o seu perímetro.

$$D_h = \frac{4A}{L} \quad (4)$$

Analisando a Equação 4, pode-se concluir que o diâmetro hidráulico depende da geometria do canal. No caso mais simples de um canal de seção circular, o diâmetro hidráulico coincide com o diâmetro da seção transversal do canal.

Na escala micrométrica, o regime de fluxo é tipicamente laminar com número de Reynolds assumindo um valor muito menor que 2000 ( $Re \ll 2000$ ) (TABELING, 2005). Para um número de Reynolds maior que 4000 ( $Re > 4000$ ), o regime de fluxo é dito turbulento, o que indica que a força inercial é predominante. Neste regime de fluxo as componentes do vetor velocidade mudam de direção causando os chamados vórtices dinâmicos<sup>4</sup>. Para  $Re$  compreendido entre 2000 e 4000 ( $2000 \leq Re \leq 4000$ ), o regime de fluxo encontra-se na região de transição.

Outro parâmetro importante no estudo do comportamento dinâmico de fluidos em microcanais é o número capilar ( $C_a$ ). Ele representa o efeito relativo de forças viscosas contra tensão superficial que atuam através de uma interface entre um líquido e um gás, ou entre dois líquidos imiscíveis. O número capilar é definido pela Equação 5.

---

<sup>4</sup> Vórtice dinâmico é um conceito matemático usado em dinâmica dos fluidos. Este conceito está relacionado à quantidade de circulação ou rotação (ou mais estritamente, a taxa angular local de rotação) em um meio líquido.

$$C_a = \frac{\rho U_L}{\gamma} \quad (5)$$

Onde  $\rho$  representa a densidade da fase líquida,  $U_L$  a velocidade da fase líquida e  $\gamma$  a tensão superficial entre as duas fases (líquida e gasosa).

Na microfluídica, as forças viscosas possuem magnitudes superiores às forças inerciais, não somente devido à viscosidade do líquido, mas também devido às dimensões dos canais, além dos fenômenos de superfície (TABELING, 2005). A microfluídica aproveita este fenômeno de superfície para obtenção de fluxos eletro-osmóticos<sup>5</sup> utilizados nas mais diversas aplicações tecnológicas (LIN; LEE, 2010).

Microrreservatórios, microcanais, microbombas e microválvulas são elementos que constituem sistemas microfluídicos, e quando dispostos a funcionar conjuntamente, podem ser utilizados como filtros, sensores, microrreatores, separadores ou misturadores, dentre outras funções (BEEBE; MENSING, 2002). Na literatura, existem sistemas de microanálise que realizam o processamento paralelo de diversas substâncias com grande eficiência, constituindo um novo termo técnico chamado *Lab-on-a-chip* ou Laboratório em um chip, e ou  $\mu$ -TAS (*Micro Total Analysis Systems*) (DITTRICH; MANZ, 2006).

Em muitas aplicações, uma instabilidade capilar é esperada para produzir diferentes padrões de fluxo. Várias tentativas foram centradas na caracterização da dinâmica do comportamento de fluxos, que inclui mais especificamente a formação de microbolhas monodispersas.

Como foi tratado na seção 2.1, o entroncamento em T (*T-junction*) constitui a geometria mais apropriada para obtenção de microbolhas com baixo grau de dispersão. Neste tipo de dispositivo, a fase dispersa (gás) é injetada no canal principal de condução, enquanto que a fase líquida é injetada perpendicularmente ao canal principal.

Uma abordagem utilizada para se estudar o comportamento dinâmico de fluidos em regime bifásico *T-junction*, é por meio da utilização de modelos matemáticos e algoritmos. O

---

<sup>5</sup> Deslocamento de um líquido condutor através de um diafragma poroso sob a ação de uma força eletromotriz, aplicada a eletrodos em lados opostos do diafragma. Este expediente é usado para separar o coloide do dispersante em uma solução coloidal (KUHN & HOFFSTETTER, 1993).

modelo VOF (volume de fluidos) simula os fluxos de gás/líquido no microcanal do dispositivo *T-junction* e opera baseado no princípio de que dois ou mais fluidos não são interpenetráveis. As equações que regem o modelo VOF para fluidos multifásicos são dadas pelas equações de continuidade, balanço da quantidade de movimento e fração de volume<sup>6</sup> (FANG; CHEN, 2009).

Garstecki e Fuerstman (2006) demonstraram que a formação de microbolhas na região de convergência dos fluxos em um sistema *T-junction* pode ser descrita usando uma equação experimental simples. Neste regime, a dimensão linear da microbolha ( $D$ ) é determinada através da Equação (6).

$$\frac{D}{W_d} = 1 + \alpha \frac{Q_G}{Q_L} \quad (6)$$

Onde:  $D$  representa a dimensão linear da microbolha (diâmetro),  $Q_G$  a vazão da fase gasosa,  $Q_L$  a vazão da fase líquida,  $W_d$  a largura do canal de entrada da fase gasosa e  $\alpha$  uma constante de proporcionalidade.

A constante de proporcionalidade para esta equação depende das características geométricas do dispositivo como, por exemplo, do perfil dos canais, mas é quase independente das propriedades do fluido. Neste caso específico,  $\alpha$  assume o valor de primeira ordem (isto é,  $\alpha=1$ ) (GARSTECKI; FUERSTMAN, 2006). A Equação 6 aponta para uma dependência direta do diâmetro da microbolha em relação à dimensão da largura do canal de entrada da fase gasosa ( $W_d$ ), e da razão entre os parâmetros  $Q_G$  e  $Q_L$ . Para números capilares muito pequenos,  $C_a \ll 1$ , a interface da bolha formada mantém a sua forma, minimizando a sua área superficial de modo independente do número capilar ( $C_a$ ), entretanto, para dispositivos de canais de seções retas não circulares, a geometria do dispositivo desempenha um papel importante na dinâmica de formação das microbolhas (GARSTECKI, 2010).

A compreensão clara dos principais mecanismos que afetam a dinâmica do fluxo bifásico e das características de transferência de calor em pequenos canais, microcanais e

---

<sup>6</sup> A fração de volume da fase gasosa é dada pela razão entre a taxa de fluxo da fase gasosa e a soma das vazões das fases (líquida e gasosa):  $\Omega_G = \frac{Q_G}{Q_L + Q_G}$

minicanais têm levado muitos cientistas a realizar estudos na busca deste objetivo. Como foi dito anteriormente, estes mecanismos são susceptíveis de serem mais fortemente dependentes dos efeitos da tensão superficial e da viscosidade, do que das forças inerciais que preponderam nos sistemas de macroescala.

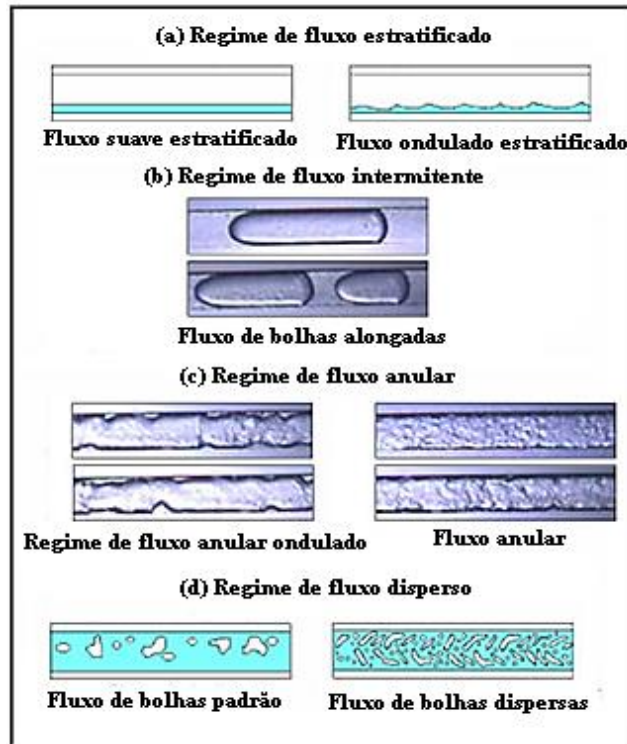
Uma maneira de estudar o comportamento dinâmico de fluidos imiscíveis em regime bifásico (gás/líquido) confinados em microcanais é por meio da caracterização dos padrões de fluxo no âmbito qualitativo a partir de imagens, e no âmbito quantitativo através da elaboração dos mapas de regime de fluxo da fase líquida em relação à fase gasosa.

Várias investigações têm definido qualitativamente os regimes de fluxo em processos adiabáticos<sup>7</sup>, com base em experimentos com misturas ar/água. Coleman e Garimella (1999) descreveram regimes de escoamentos bifásicos em condições adiabáticas com um alto grau de especificação, definindo quatro regimes de fluxo, com os respectivos padrões (Figura 11).

---

<sup>7</sup> Processo adiabático é aquele no qual o sistema (geralmente, um fluido que realiza um trabalho) não troca calor com o meio com o qual o fluido interage.

**Figura 11** - Regimes de fluxo em processos adiabáticos.



Fonte: Adaptado de Coleman e Garimella (1999)

Legenda: (a), Fluxo estratificado; (b), Fluxo intermitente (*slug flow*); (c), Fluxo anular; (d), Fluxo disperso.

O regime de fluxo estratificado pode apresentar dois padrões. O primeiro representa o padrão de fluxo estratificado liso, não apresentando flutuações na interface. O segundo representa o padrão de fluxo estratificado com ondulações, onde o mesmo apresenta pequenas ondas na interface, quando as velocidades do ar são maiores.

O regime de fluxo intermitente (*slug flow*) apresenta um padrão de bolhas alongadas que fluem na direção axial do canal. Este tipo de padrão geralmente ocorre para velocidades do ar relativamente baixas.

O regime de fluxo anular apresenta um padrão que é caracterizado por um fluxo estável do filme de líquido na parede do canal, possuindo um núcleo gasoso contínuo. Ele pode apresentar em alguns casos ondulações da interface do líquido com as paredes do canal. Este tipo de padrão só acontece para altas velocidades do ar.

O regime de fluxo disperso é reconhecido quando pequenas bolhas são dispersas em uma fase líquida turbulenta. É frequentemente visto para vazões de líquidos muito elevados.



Dois padrões de fluxo são distintos: o fluxo de bolha padrão, e o fluxo de bolhas dispersas. O primeiro é encontrado quando o fluxo de gás é laminar. Devido ao comportamento turbulento do líquido, as bolhas não têm uma forma consistente, e são pequenas em comparação ao padrão de fluxo de bolhas alongadas. Quando a vazão do ar é aumentada, as bolhas começam a diminuir e dispersar o fluxo de líquido. Esta característica é chamada de padrão de fluxo de bolhas dispersas (COLEMAN; GARIMELLA, 1999).

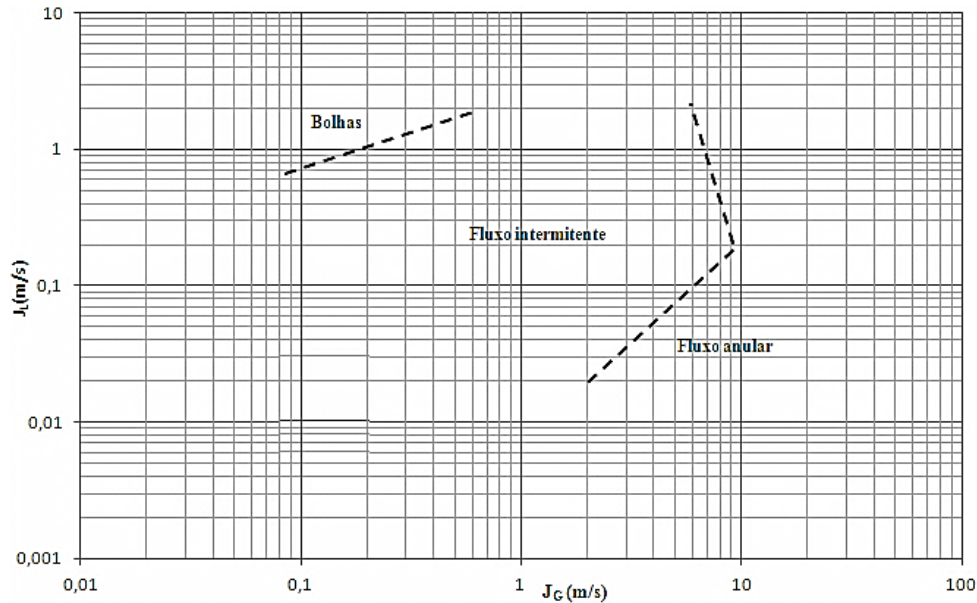
Os mapas de regime de fluxo apresentam graficamente os padrões de fluxo geralmente em função de variáveis controladas (velocidades superficiais<sup>8</sup> da fase líquida e gasosa). Estes mapas localizam as regiões de fronteira entre padrões de fluxo diferentes, propiciando uma visão global das variações destes padrões, possibilitando a escolha da faixa de trabalho das variáveis controladas de acordo com o padrão de fluxo que se deseja trabalhar.

A Figura 12 apresenta um mapa de regime de fluxo, onde se destacam as regiões de fronteira entre padrões de fluxo diferentes. Em uma representação típica de um mapa de regime de fluxo para um canal de diâmetro hidráulico  $D_h$ , pode-se observar as regiões de fronteira entre padrões de fluxo distintos para velocidades superficiais de líquido e gás diferentes  $j_L$  e  $j_G$  respectivamente.

---

<sup>8</sup> Velocidade superficial (m/s) é utilizada em muitas equações de engenharia, e pode ser expressa como:  $j = \frac{Q}{A}$ , onde Q representa a vazão (m<sup>3</sup>/s), e A representa a área de seção transversal do canal.

**Figura 12** - Representação de um mapa de regime de fluxo para um canal de diâmetro hidráulico  $D_h$ .



Fonte: Autoria própria.

Nota: Observa-se as regiões de fronteira entre padrões de fluxo distintos para velocidades superficiais de líquido e gás diferentes  $j_L$  e  $J_G$ .

O levantamento do estado da arte dos temas relacionados ao desenvolvimento deste trabalho aponta para a existência de desafios a serem superados para viabilizar o uso das microbolhas como modalidade de tratamento clínico de vanguarda.

Atualmente a fabricação da maioria dos dispositivos de microfluídica para a geração de microbolhas utiliza a técnica de microlitografia (BECKER, 2008; BECKER; GARTNER, 2012; BRESLAUER; LEE, 2006; THOMPSON; WILLSON, 1983; THOMPSON; WILLSON, 1984). Esta técnica de fabricação consegue produzir dispositivos com um alto grau de precisão com canais de seções retangulares, triangulares e semicirculares com diâmetros hidráulicos da ordem de micrômetros. No entanto, além de possuir um alto custo operacional, esta técnica de fabricação necessita de procedimentos adicionais de adaptação das interfaces da microescala para a macroescala (por exemplo, conexões), o que a torna ainda mais complexa.

A técnica de impressão 3D utilizada na fabricação dos dispositivos de microfluídica pode superar estas dificuldades e se constituir uma alternativa viável, uma vez que tem a capacidade de fabricar dispositivos em uma única etapa, além de dispensar os procedimentos

adicionais relativos às adaptações das interfaces, aliado ainda à capacidade de produzir dispositivos com canais de seções circulares.

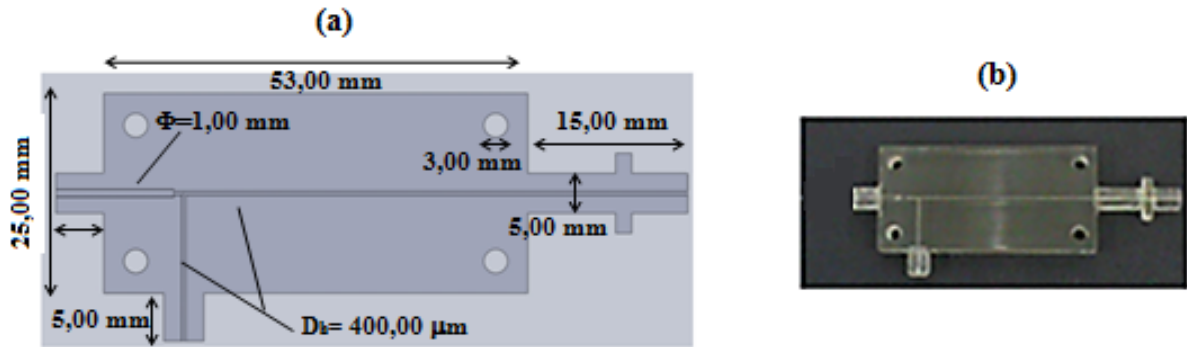
### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo apresenta-se o dispositivo experimental e os procedimentos metodológicos utilizados no desenvolvimento do trabalho. Na Seção 3.1, descreve-se detalhadamente a instrumentação usada na obtenção dos dados experimentais. Na Seção 3.2, apresenta-se o procedimento utilizado na obtenção da fase líquida, na determinação do tamanho da microbolha, no estudo da estabilidade da microbolha, na obtenção dos padrões de fluxo e na elaboração do mapa de regime de fluxo para a região limítrofe à formação de microbolhas monodispersas.

#### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Para a geração das microbolhas, foram fabricados os dispositivos de entroncamento em T (*T-junction*) a partir de uma máquina de prototipagem rápida (Objet Eden 250), usando uma resina transparente (Fullcure720, C., Crystal Lake). Este material é adequado para a fabricação de uma ampla variedade de modelos rígidos, especialmente quando se faz necessária a visualização de detalhes internos. A Figura 13 (a) apresenta o projeto inicial do dispositivo gerador de microbolhas com as especificações técnicas relacionadas ao diâmetro dos canais e dimensões externas do dispositivo. O diâmetro hidráulico ( $D_h$ ) do canal de condução e do canal de alimentação da fase líquida mede 400,00  $\mu\text{m}$ . Na extremidade à esquerda observa-se o canal de alimentação da fase gasosa de diâmetro externo  $\Phi=1,00$  mm. A Figura 13 (b) apresenta o dispositivo fabricado usando a técnica de impressão 3D.

**Figura 13** – Dispositivo inicial utilizado na geração de microbolhas.

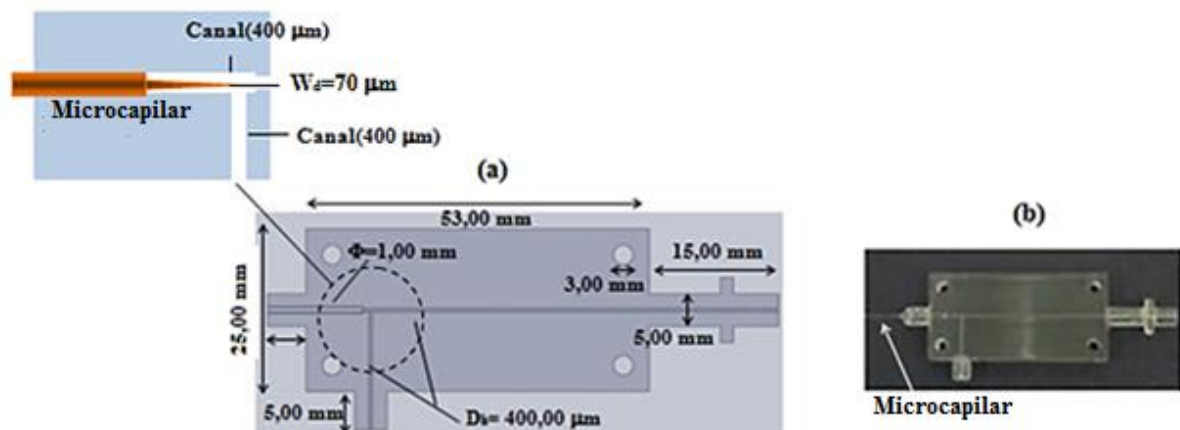


Fonte: Autoria própria.

Legenda: (a), Projeto do dispositivo inicial utilizado na geração de microbolhas com as especificações técnicas; (b), Dispositivo fabricado usando a técnica da impressão 3D.

A Figura 14 mostra o projeto do dispositivo híbrido usado na geração de microbolhas e o dispositivo fabricado segundo a técnica de impressão 3D. A Figura 14 (a) representa o projeto do dispositivo com as especificações técnicas relacionadas ao diâmetro dos canais e dimensões externas do dispositivo. No destaque aparece o microcapilar acoplado ao canal de diâmetro externo de  $\Phi=1,00$  mm. O diâmetro interno do microcapilar ( $W_d$ ) é de  $70 \mu\text{m}$ , que corresponde à abertura de entrada da fase gasosa. A Figura 14 (b) apresenta o dispositivo híbrido fabricado usando a técnica de impressão 3D.

**Figura 14** – Dispositivo híbrido utilizado para a geração de microbolhas.



Fonte: Autoria própria.

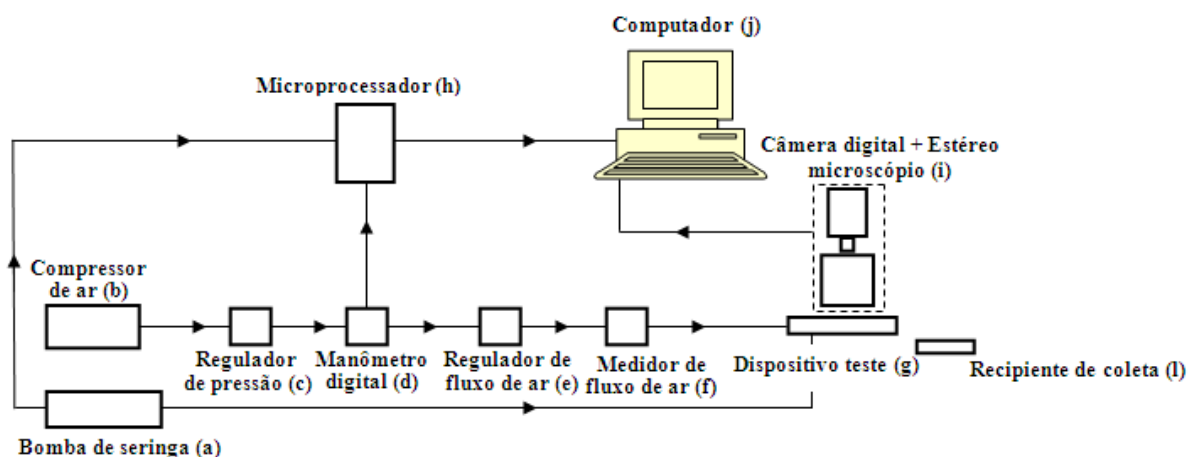
Legenda: (a), Projeto do dispositivo híbrido utilizado na geração das microbolhas com as especificações técnicas; (b), dispositivo fabricado usando a técnica de impressão 3D.

A Figura 15 mostra o diagrama esquemático do aparato experimental utilizado na geração das microbolhas.

O controle da fase líquida foi feito através de uma bomba de seringa (a) desenvolvida para atender às exigências de fluxo da ordem de  $0,2 \mu\text{l/s}$  a  $1600 \mu\text{l} / \text{s}$ . A fase gasosa foi fornecida por um compressor de ar (b) Mega Air C-6 L com uma pressão máxima de 792.9 kPa a uma taxa máxima de fluxo de  $2,5 \text{ l} / \text{s}$ . Um regulador de pressão (c) Dwyer Series MPR foi utilizado para fornecer pressões constantes de funcionamento até 20 kPa. Um Manômetro Digital (d) Inotech-TT-TR foi utilizado para medir a pressão de funcionamento do sistema. Um regulador de fluxo de ar (e) SMC AS2000 foi utilizado para fornecer vazões estáveis da fase gasosa. Um medidor de fluxo (f) AALBORG-GFM17 foi usado para quantificar a vazão de operação da fase gasosa do sistema. O controle do fluxo da fase líquida e a monitoração da pressão da fase gasosa (ar) foram feitos por meio de uma plataforma Arduino Duemilanove (h) através do micro controlador Atmel 328.

Além disso, um programa computacional foi desenvolvido para criar uma interface gráfica para facilitar a visualização e controle do operador através de uma interface serial USB (j). O monitoramento do processo de geração das microbolhas foi feita através de um estéreo microscópio Meiji Techno modelo EMZ-TR, acoplado a uma câmera digital Nanosense MKIII (Dantec Dynamics), capaz de filmar a uma velocidade de até 5140 fps, com uma resolução máxima de  $1280 \times 1024 \text{ pixels}$  (i). As microbolhas foram recolhidas em um recipiente contendo água deionizada (l).

**Figura 15** - Diagrama esquemático do aparato experimental usado na geração das microbolhas.



Fonte: Autoria própria.

Legenda: (a), Bomba de seringa; (b), Compressor de ar; (c), Regulador de pressão; (d), Manômetro digital; (e), regulador de fluxo de ar; (f), Medidor de fluxo de ar; (g), Dispositivo teste; (h), Micro processador; (i), Estéreo microscópio acoplado a uma câmera digital; (j), Unidade de gerenciamento (interface serial USB); (l), recipiente de coleta.

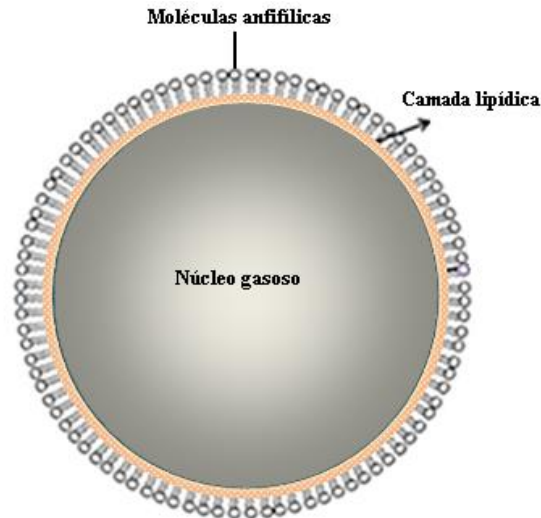
### 3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A fase líquida utilizada para alimentar o sistema foi constituída por uma emulsão composta por água deionizada, óleo de girassol e o tensoativo Tween80.

O óleo de girassol (*helianthus annuus*) é formado por ácidos graxos insaturados (oleico, linolênico e principalmente, o linoleico) que dissolvem e eliminam o excesso de colesterol do organismo garantindo propriedades reguladoras nas doenças cardíacas, além da ação emoliente, reepitelizante e auxilia na cicatrização (NIKOLAEVSKY; FILIPPENKO, 1980). De coloração amarela clara, de aspecto fluido e quase inodoro, possui densidade relativa ( $\rho_r$ ) 945,00 kg/m<sup>3</sup>, viscosidade dinâmica ( $\eta$ ) 0,314 mP.s, e ponto de congelamento -17 ° C. Devido a estas propriedades, o óleo de girassol foi escolhido como uma alternativa viável para revestir as microbolhas visando futuras aplicações clínicas. O uso de matrizes lipídicas para o revestimento das microbolhas foi atestado pelos estudos de (BORDEN; LONGO, 2002; UNGER; MATSUNAGA, 2002; UNGER; PORTER, 2004).

O Tween 80, usado na composição da fase líquida, é um agente tensoativo não iônico, emulsionante, estabilizante, solubilizante e umectante (LIANG; YANG, 2011). As suas moléculas possuem um carácter anfifílico, o que dá a capacidade a elas de se acumularem na interface entre dois líquidos ou na superfície de um líquido. A estrutura química deste agente tem polaridade dupla e interage favoravelmente com as moléculas de água e as moléculas insolúveis em água (por exemplo, óleos vegetais). Devido a estas características, a parte não polar das moléculas é agregada à camada lipídica externa da microbolha formando uma estrutura de duas camadas, tal como é mostrado na Figura 16.

**Figura 16-** Estrutura de duas camadas de uma microbolha.



Fonte: Autoria própria.

Nota: A figura apresenta os dois tipos de estruturas de revestimento da microbolha. A primeira é de natureza lipídica, e a segunda é formada pela agregação de moléculas anfifílicas na região externa da camada lipídica.

O uso de um agente tensoativo aumenta a estabilidade das microbolhas, uma vez que este diminui a possibilidade da troca gasosa com o ambiente externo. Moléculas fosfolipídicas podem também ser usadas para realizar a mesma função do Tween 80, uma vez que possuem características anfifílicas semelhantes. De acordo com Urdahl Fredheim (1997), as emulsões de baixas concentrações da fase dispersa (até 15%) podem ser consideradas como fluidos newtonianos.

No caso específico da emulsão usada neste estudo, a concentração da fase dispersa (óleo de girassol e tensoativo) foi de 2,9 % sendo, portanto considerada um fluido newtoniano para o cálculo da viscosidade.

A Equação 7 representa a viscosidade relativa.

$$\eta_r = \frac{\eta_e}{\eta_c} \quad (7)$$

Onde  $\eta_c$  é a viscosidade da fase contínua e  $\eta_e$  é a viscosidade da emulsão. A viscosidade da emulsão, que representa a fase líquida, foi obtida utilizando um viscosímetro rotativo Brookfield DV-E, a 22 ° C e pressão atmosférica local de 91 kPa.



A fase líquida do sistema consistiu em uma emulsão composta de água deionizada, óleo de girassol e tensoativo Tween 80, na proporção de massa de 100:1:2, e viscosidade relativa ( $\eta_r$ ) igual a 2,2 mPa.s. Inicialmente, utilizou-se o dispositivo *T-junction* sem o acoplamento do microcapilar para a geração das microbolhas. Foi iniciado o processo de geração das microbolhas utilizando uma vazão da fase líquida ( $Q_L$ ) de 720,00  $\mu\text{l}/\text{min}$  e uma vazão da fase gasosa ( $Q_G$ ) de 13,00  $\mu\text{l}/\text{min}$ . As imagens foram capturadas ao longo de um período de tempo de 4 s, a uma taxa de 500 fps. O mesmo procedimento foi realizado com o dispositivo híbrido (isto é, com o microcapilar acoplado), utilizando uma vazão da fase líquida ( $Q_L$ ) 96,00  $\mu\text{l}/\text{min}$ , e vazão da fase gasosa ( $Q_G$ ) 0,164  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

### 3.2.1 Determinação do Tamanho da Microbolha

Uma ferramenta de processamento de imagem foi desenvolvida no Laboratório de Ciências Térmicas (LACIT-UTFPR) para automatizar medições do diâmetro das microbolhas a partir de um vídeo de alta velocidade, utilizando o programa computacional Matlab. Para determinação do diâmetro, a microbolha foi segmentada, com o uso de técnicas subtrativas (uma imagem de referência, sem microbolha é subtraída de uma imagem em análise). A imagem segmentada apresentava a região da microbolha com *pixels* brancos em fundo escuro. O número de *pixels* foi contado automaticamente para cada região fechada de modo a definir a área por meio da contagem de *pixels*. Usando um *stage micrometer*<sup>9</sup>, foi determinado o número de *pixels* que corresponde a 100  $\mu\text{m}$ . Esta proporção (isto é, 7,45 *pixels* /  $\mu\text{m}$ ) foi utilizada para medir o diâmetro da microbolha a partir da relação entre o diâmetro e a área. Utilizando ferramentas específicas do programa computacional Matlab, foi obtida a análise estatística dos resultados e gerados os gráficos da distribuição do diâmetro em relação ao número de eventos (microbolhas isoladas). Além disso, foi determinado o coeficiente de variação percentual do diâmetro das microbolhas.

---

<sup>9</sup> Instrumento de calibração utilizado para medir imagens microscópicas: a escala de 1 mm é dividida em 100 partes (10  $\mu\text{m}$ ).

### 3.2.2 Estudo da Estabilidade da Microbolha

As amostras das microbolhas geradas a partir de cada um dos dispositivos foram recolhidas numa placa de vidro plano contendo água deionizada. Foram obtidas imagens das amostras no intervalo de tempo de um minuto para estudar a estabilidade da população das microbolhas em relação ao tempo. Este estudo foi realizado a uma temperatura de 22°C e a uma pressão atmosférica local de 91 kPa.

A partir das imagens capturadas, foi encontrada a curva de estabilidade da população das microbolhas para cada amostra. O estudo da estabilidade foi baseado no referencial teórico dado pela equação de Epstein-Plesset (Equação 2), apresentada na seção 2.2.

### 3.2.3 Obtenção dos Padrões de Fluxo

A caracterização dos padrões de fluxo em um escoamento bifásico constitui uma das ferramentas mais importantes para se estudar o comportamento dinâmico dos fluidos confinados neste regime. Como foi tratado anteriormente na Seção 2.3, estes procedimentos fornecem informações importantes sobre a dinâmica do processo a partir da aquisição de imagens obtidas por meio de uma câmera fotográfica ou filmadora.

Na obtenção dos padrões de fluxo objeto deste trabalho, foi utilizado o mesmo equipamento experimental gerador das microbolhas. Foi dada ênfase à região de transição entre os padrões de fluxo: microbolhas monodispersas isoladas e microbolhas alongadas (*slugs*).

As imagens dos padrões de fluxo foram obtidas através da câmera digital de alta velocidade Fastec Imaging model FASTEC 5 4G, a uma taxa de 500 fps. Foi utilizada como fase líquida a mesma emulsão usada na geração das microbolhas, constituída de água deionizada como fase dispersante, óleo de girassol, e Tween 80 como fase dispersa, na

proporção de massa de 100:1:2 respectivamente, de viscosidade relativa  $\eta_r$  igual a 2,2 mPa.s, possuindo um comportamento típico newtoniano.

Na obtenção dos padrões de fluxo, foi utilizado o dispositivo híbrido descrito detalhadamente na seção 3.1. A alimentação fase líquida foi feita através de uma bomba de seringa, e a alimentação da fase gasosa por meio do compressor Mega Air C-6 L.

Um regulador de pressão Dwyer Series MPR foi utilizado para fornecer pressões constantes de funcionamento até 20 kPa. Para permitir uma vazão estável de operação, utilizou-se o controlador SMC AS2000, além do medidor AALBORG-GFM17 para quantificar a vazão da fase gasosa.

Para uma determinada vazão da fase gasosa ( $Q_G$ ), variou-se a vazão da fase líquida ( $Q_L$ ) até a obtenção do padrão de fluxo desejado. Depois da estabilização do padrão, foram obtidas filmagens por meio da câmera digital no período de 2s, utilizando uma taxa de 500 fps. Durante todo processo, a pressão da fase gasosa foi mantida constante no valor de 20 kPa. O diâmetro hidráulico do canal de condução ( $D_h$ ) foi de 400  $\mu\text{m}$ , o orifício de abertura da alimentação da fase gasosa (diâmetro interno do micro capilar) foi de 70  $\mu\text{m}$  e o comprimento do canal de condução igual 30 mm. O regime de fluxo foi tipicamente laminar com  $Re \ll 2000$ .

#### 3.2.4 Elaboração do Mapa de Regime de Fluxo

Depois da obtenção dos padrões de fluxo, foi elaborado o mapa do regime de fluxo enfatizando a região de fronteira entre os padrões: microbolhas monodispersas individuais e microbolhas alongadas.

Para uma determinada vazão da fase gasosa ( $Q_G$ ), variou-se a vazão da fase líquida ( $Q_L$ ) até a geração do padrão de fluxo desejado. Todo o processo foi filmado através da câmera digital Fastec Imaging model HISPEC 5 4G monocromática, no período de 2 s, a uma taxa de 500 fps. A partir dos dados obtidos foi elaborado o mapa de regime de fluxo enfatizando a região mencionada anteriormente.

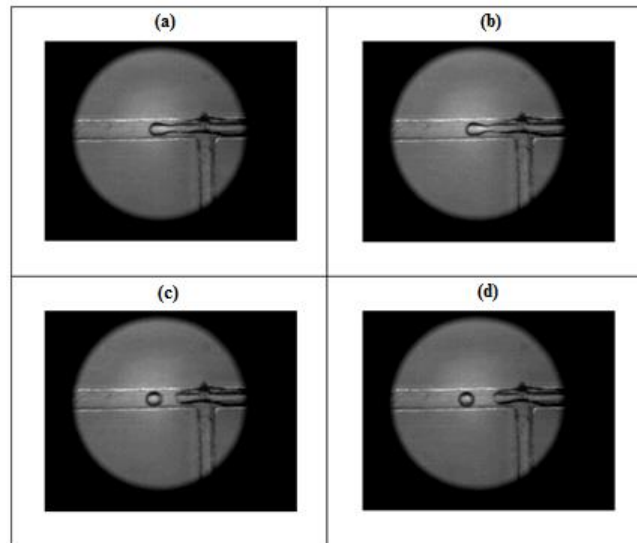
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados experimentais relativos ao processo de geração das microbolhas. Na Seção 4.1, serão apresentados os resultados experimentais associados à geração das microbolhas, caracterizando a dispersão e a homogeneidade destas. Serão levantadas e discutidas as curvas de distribuição do diâmetro das microbolhas, além de um levantamento estatístico caracterizando todo o processo de geração. Na Seção 4.2, serão apresentadas, analisadas e discutidas as curvas de estabilidade das microbolhas em relação ao tempo. Na Seção 4.3, serão apresentados e discutidos os padrões de fluxo na região limítrofe à geração de microbolhas monodispersas. Finalizando, na Seção 4.4 será levantado e discutido o mapa do regime de fluxo na região de fronteira à geração de microbolhas monodispersas.

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROBOLHAS GERADAS

Usando o dispositivo inicial (sem o acoplamento do microcapilar), e trabalhando com uma vazão da fase líquida  $Q_L = 720,00 \mu\text{l}/\text{min}$  e vazão da fase gasosa  $Q_G = 13,00 \mu\text{l}/\text{min}$ , iniciou-se o processo de geração das microbolhas. Foram capturadas no processo 2000 imagens a uma taxa de 500 fps, sendo detectadas 54 microbolhas isoladas. Na Figura 17 (a), observa-se a fase inicial da formação da microbolha no início do estrangulamento (*pinch-off*); na Figura 17(b), observa-se a separação da microbolha do canal de entrada da fase gasosa; e na Figura 17(c) e (d), avista-se o deslocamento da microbolha ao longo do canal.

**Figura 17** - Processo de formação da microbolha para vazão da fase líquida  $Q_L = 720,00 \mu\text{l}/\text{min}$  e vazão da fase gasosa  $Q_G = 13,00 \mu\text{l}/\text{min}$ .



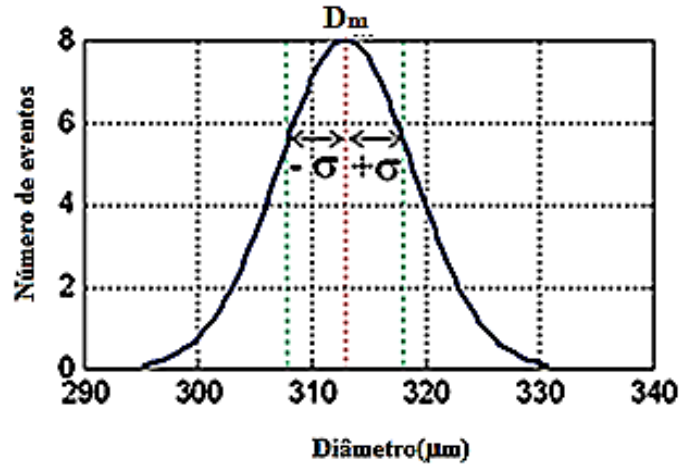
Fonte: Autoria própria.

Legenda: (a), Fase inicial da formação da microbolha no início do estrangulamento (pinch-off); (b), Separação da microbolha do canal de entrada da fase gasosa; (c) e (d), Deslocamento da microbolha ao longo do canal.

A Figura 18 apresenta a distribuição de Gauss do diâmetro das microbolhas, em função do número de eventos (microbolhas geradas no intervalo de tempo), usando o dispositivo sem o acoplamento do microcapilar para uma vazão da fase líquida de  $Q_L = 720,00 \mu\text{l}/\text{min}$ , vazão da fase gasosa de  $Q_G = 13,00 \mu\text{l}/\text{min}$ , viscosidade relativa  $\eta_r = 2,2 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ , número de Reynolds  $Re = 0,038$  e número capilar  $Ca = 2,8 \times 10^{-5}$ .

A curva de distribuição normal do diâmetro das microbolhas em função da ocorrência de um evento (microbolha isolada) apresentada na Figura 18, atesta a capacidade do dispositivo em gerar microbolhas monodispersas, tendo o óleo de girassol e Tween80 como matriz de lipídica de revestimento. O resultado comprova o elevado grau de uniformidade das microbolhas geradas, que apresentaram um diâmetro médio ( $D_m$ ) de  $313,0 \mu\text{m}$ , desvio-padrão ( $\sigma$ ) de  $5,9 \mu\text{m}$ , e coeficiente de variação percentual de  $1,9 \%$ . Estes resultados constam na Tabela 1 que apresenta, ainda, o valor do desvio absoluto médio ( $\delta_m$ ) de  $4,8$  e o erro percentual ( $\epsilon_p$ ) de  $1,5\%$ .

**Figura 18** - Curva de distribuição gaussiana do diâmetro de microbolhas em função do número de eventos, usando o dispositivo sem o acoplamento do microcapilar a uma vazão da fase líquida  $Q_L = 720,00 \mu\text{l}/\text{min}$  e vazão da fase gasosa  $Q_G = 13,00 \mu\text{l}/\text{min}$  e viscosidade relativa  $\eta_r = 2,2 \text{ mPa. s}$ , número de Reynolds  $Re = 0,038$  e número capilar  $Ca = 2,8 \times 10^{-5}$ .



Fonte: Autoria própria.

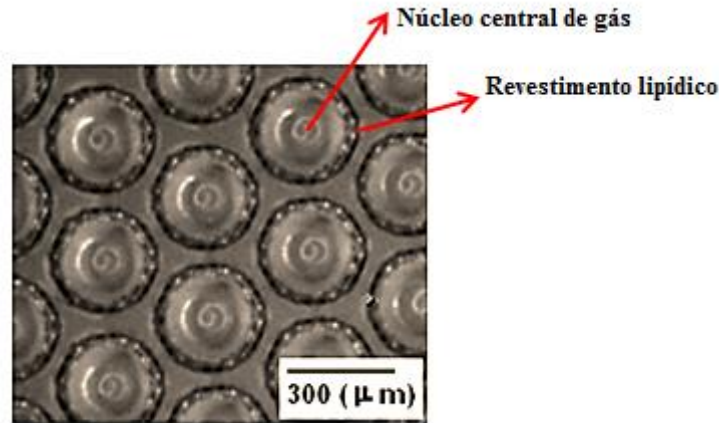
**Tabela 1** - Análise estatística das microbolhas geradas utilizando o dispositivo sem o acoplamento do microcapilar.

Diâmetro médio ( $D_m$ ) [ $\mu\text{m}$ ]	313,0
Desvio Padrão ( $\sigma$ )	5,9
Coefficiente de variação percentual ( $\chi$ ) [%]	1,9
Desvio absoluto médio ( $\delta_m$ )	4,8
Erro Percentual ( $\epsilon_p$ ) [%]	1,5

Fonte: Autoria própria.

As microbolhas geradas foram coletadas em um recipiente contendo água deionizada. Uma amostra da população de microbolhas foi retirada e colocada em meio aquoso, sobre uma lâmina de vidro e, em seguida, fotografada. A Figura 19 representa a fotografia da amostra de microbolhas dispersas em meio aquoso. Observa-se um núcleo central de gás e uma região periférica correspondente ao revestimento lipídico em cada uma das estruturas. Pode-se observar, ainda, o alto grau de uniformidade da população da amostra, atestando a capacidade do dispositivo em produzir microbolhas com baixo coeficiente de variação percentual.

**Figura 19** - Amostra de microbolhas geradas e dispersas em meio aquoso. Um núcleo central de gás e uma região periférica correspondente ao revestimento de dupla camada (óleo de girassol + Tween 80) são observados em cada uma das estruturas.



Fonte: Autoria própria.

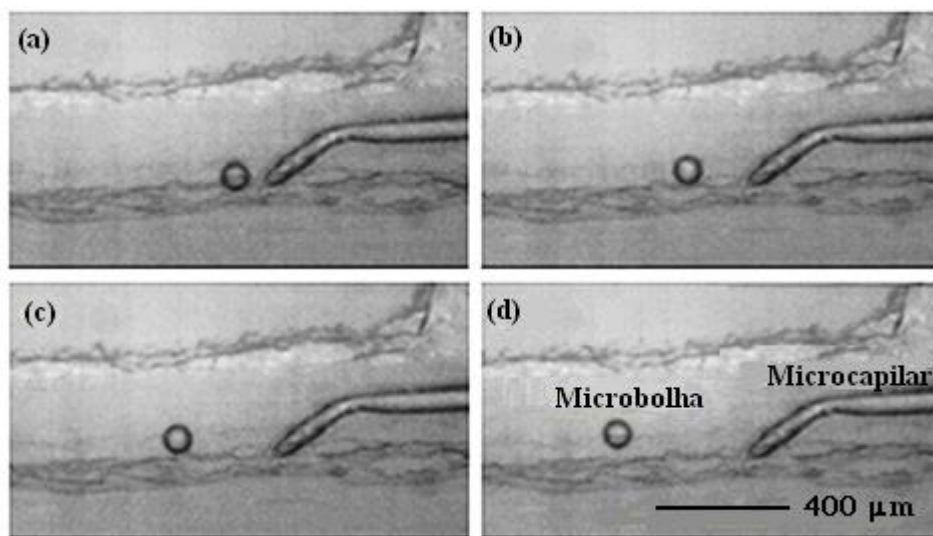
Apesar dos resultados alcançados, o diâmetro médio ( $D_m = 313,0 \mu\text{m}$ ) das microbolhas geradas pelo dispositivo sem o acoplamento do microcapilar foi trinta vezes maior do que o recomendado para as aplicações clínicas (isto é, menores que  $10\mu\text{m}$ ). Além disso, o coeficiente de variação percentual ( $\gamma$ ) alcançado foi maior do que o conseguido por Stride (isto é, 1%) (STRIDE; EDIRISINGHE, 2009).

Este resultado poderia estar associado ao controle da estabilidade do fluxo, e à largura do canal de entrada da fase gasosa. Baseado nestas hipóteses, um controlador de fluxo SMC AS2000 foi adicionado ao equipamento experimental, e um microcapilar de diâmetro externo de 1,00 mm e interno de  $70 \mu\text{m}$  foi introduzido no canal de alimentação da fase gasosa, constituindo assim o dispositivo híbrido. A máquina de impressão 3D, utilizada na fabricação dos dispositivos, só conseguia entregar canais com até  $400 \mu\text{m}$  de diâmetro, daí a necessidade do uso do microcapilar para contornar a limitação do equipamento disponível.

Assim, utilizou-se o dispositivo híbrido para testar a sua capacidade em produzir microbolhas monodispersas com diâmetros inferiores a  $313,0 \mu\text{m}$ . Trabalhando com uma vazão da fase líquida  $Q_L = 96,00 \mu\text{l}/\text{min}$  e vazão da fase gasosa  $Q_G = 0,16 \mu\text{l}/\text{min}$ , foram capturadas 2000 imagens utilizando a câmera digital Nanosense MKIII (Dantec Dynamics), a uma taxa de 500 fps, sendo detectadas 52 microbolhas isoladas. A Figura 20 mostra no

detalhe o canal do dispositivo, destacando a região do microcapilar de diâmetro interno de 70  $\mu\text{m}$  utilizado para diminuir a largura do canal de entrada da fase gasosa. A Figura 20(a) mostra a microbolha recém-formada se desgarrando do microcapilar após o processo de estrangulamento (*pinch-off*). As Figuras 20 (b), (c) e (d) mostram a microbolha se deslocando ao longo do canal.

**Figura 20** - Processo de formação de uma microbolha no sistema *T-junction* híbrido.



Fonte: Autoria própria.

Legenda: (a), Microbolha recém-formada deixando o microcapilar após o processo de estrangulamento; (b), (c) e (d), Microbolha se deslocando ao longo do canal, utilizando uma vazão da fase líquida de 96,00  $\mu\text{l}/\text{min}$ , e vazão da fase gasosa de 0,16  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

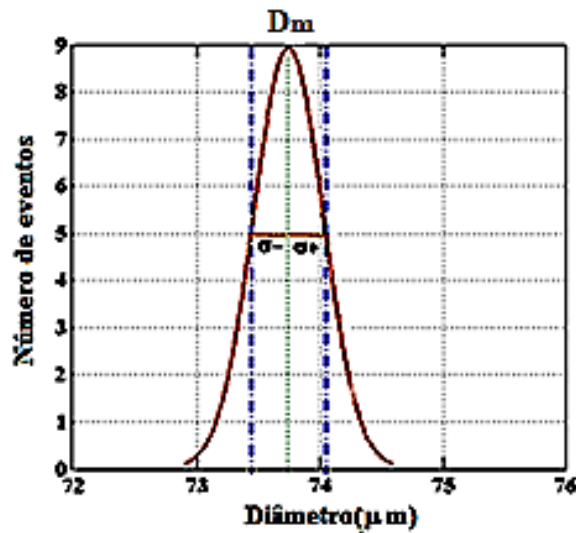
A Figura 21 apresenta a curva de distribuição de Gauss do diâmetro das microbolhas em função do número de eventos (microbolhas isoladas), usando o dispositivo híbrido, a uma vazão da fase líquida  $Q_L = 96,00 \mu\text{l}/\text{min}$  e vazão da fase gasosa  $Q_G = 0,16 \mu\text{l}/\text{min}$  e viscosidade relativa da fase líquida  $\eta_r = 2,2 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ , número de Reynolds  $R_e = 0,0059$ , e número capilar  $C_a = 3,69 \times 10^{-6}$ .

A curva de distribuição normal do diâmetro das microbolhas em função da ocorrência de um evento (microbolha isolada), apresentada na Figura 21, mostra um elevado



grau de uniformidade, com diâmetro médio ( $D_m$ ) de  $73,7 \mu\text{m}$  e desvio-padrão ( $\sigma$ ) de  $0,3 \mu\text{m}$ , confirmando o baixo grau de dispersão das microbolhas geradas no processo.

**Figura 21** - Curva de distribuição gaussiana do diâmetro das microbolhas em função do número de eventos, usando o dispositivo híbrido, a uma vazão da fase líquida  $Q_L = 96,00 \mu\text{l}/\text{min}$  e vazão da fase gasosa  $Q_G = 0,16 \mu\text{l}/\text{min}$  e viscosidade relativa  $\eta_r = 2,2 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ .



Fonte: Autoria própria.

A Tabela 2 apresenta os dados estatísticos em relação às microbolhas geradas no processo. Observa-se que o coeficiente de variação percentual do tamanho das microbolhas obtidas com o dispositivo híbrido, foi de 0,40%, o que resulta em uma significativa melhora quando comparado com o valor de 1% encontrado na literatura (STRIDE & EDIRISINGHE, 2009). O menor tamanho médio das microbolhas e o menor coeficiente de variação percentual do diâmetro foram devidos a um controle mais eficaz do fluxo da fase gasosa ( $Q_G$ ), aliado à adaptação do microcapilar no canal de alimentação da fase gasosa.

**Tabela 2** - Análise estatística das microbolhas geradas utilizando o dispositivo híbrido.

<b>Diâmetro médio (<math>D_m</math>) [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	<b>73,7</b>
<b>Desvio padrão (<math>\sigma</math>)</b>	<b>0,30</b>
<b>Coefficiente de variação percentual (<math>\chi</math>) [%]</b>	<b>0,40</b>
<b>Desvio absoluto médio (<math>\delta_m</math>)</b>	<b>0,20</b>
<b>Erro percentual (<math>\epsilon_p</math>) [%]</b>	<b>0,27</b>

Fonte: Autoria própria.

O diâmetro médio ( $D_m$ ) das microbolhas geradas nos dois dispositivos atende às previsões da relação experimental desenvolvida por Garstecki et al. (2006). Segundo a Equação 6, da Seção 2.3, a dimensão linear da microbolha (diâmetro) tem uma dependência direta da largura do canal de entrada da fase gasosa ( $W_d$ ), e da razão entre as vazões ( $Q_G$ ) e ( $Q_L$ ). Assim, para a largura do canal de entrada da fase gasosa do dispositivo híbrido (70  $\mu\text{m}$ ) o diâmetro esperado para a microbolha deveria estar em torno de 70  $\mu\text{m}$  para uma constante de proporcionalidade  $\alpha = 1$ . O valor do diâmetro previsto pela Equação 6 era de 70,0  $\mu\text{m}$ . O valor do diâmetro médio encontrado 73,7  $\mu\text{m}$ , está próximo da previsão determinada pela equação supracitada, com erro em torno de 5%.

Entretanto, a dimensão média do diâmetro das microbolhas geradas com o dispositivo híbrido ainda está sete vezes maior do que o recomendado (isto é, menores que 10  $\mu\text{m}$ ). O aperfeiçoamento do controle do fluxo da fase gasosa, associado à fabricação de dispositivos com canais de diâmetros inferiores a 70  $\mu\text{m}$ , tem um claro potencial para gerar microbolhas com diâmetros compatíveis ao recomendado nas aplicações clínicas.

O controle do fluxo da fase gasosa pode ser melhorado com a utilização de controladores de vazão com maior grau de precisão, associado ao acoplamento de microcapilares com diâmetros internos inferiores a 70  $\mu\text{m}$ . Aliado a isso, máquinas de impressão 3D, da série Objet Connex 3D Printer, fornecem uma resolução de 16  $\mu\text{m}$ , o que possibilita a fabricação de microdispositivos com canais de diâmetros compatíveis aos necessários para a obtenção de microbolhas voltadas para o uso clínico.

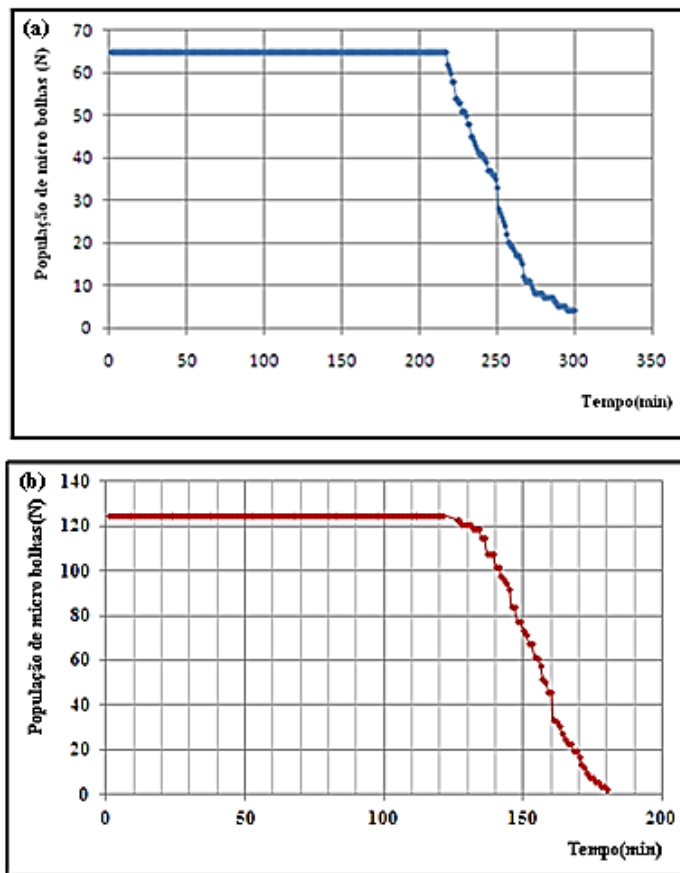
Outra maneira de superar a limitação técnica das máquinas de impressão 3D, é o acoplamento de micropipetas (*ORIGIO-small holding micropipets*) no canal de alimentação da fase gasosa do dispositivo, para diminuir a largura do canal de entrada da fase gasosa ( $W_d$ ).

Estas micropipetas têm diâmetros internos compreendidos entre 10 e 25  $\mu\text{m}$ , o que possibilita a geração de microbolhas com diâmetros compatíveis às aplicações clínicas.

#### 4.2 ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS MICROBOLHAS

A Figura 22 apresenta as curvas de estabilidade da população de microbolhas em relação ao tempo utilizando uma fase líquida de viscosidade igual a 2,2 mPa.s. A Figura 22 (a) apresenta a curva de estabilidade da população das microbolhas de diâmetro médio de 313,0  $\mu\text{m}$  geradas pelo dispositivo sem o acoplamento do microcapilar e dispersas em meio aquoso, retratando a evolução da população das microbolhas à temperatura ambiente de 22° C e pressão ambiente de 91 kPa. A Figura 22 (b) mostra a curva de estabilidade da população de microbolhas de diâmetro médio de 73,7  $\mu\text{m}$  geradas pelo dispositivo híbrido, dispersas também em meio aquoso sob as mesmas condições de temperatura e pressão.

**Figura 22** - Curvas de estabilidade para a população de microbolhas em relação ao tempo, à uma temperatura ambiente de 22° C e pressão de 91 kPa com uma fase líquida de viscosidade igual a 2,2 mPa. s.



Fonte: Autoria própria.

Legenda: (a), Curva de estabilidade da população de microbolhas de diâmetro médio em de 313,0 μm, geradas pelo dispositivo sem o acoplamento do micro-capilar; (b), Curva de estabilidade da população de microbolhas de diâmetro médio de 73,7 μm, geradas pelo dispositivo híbrido.

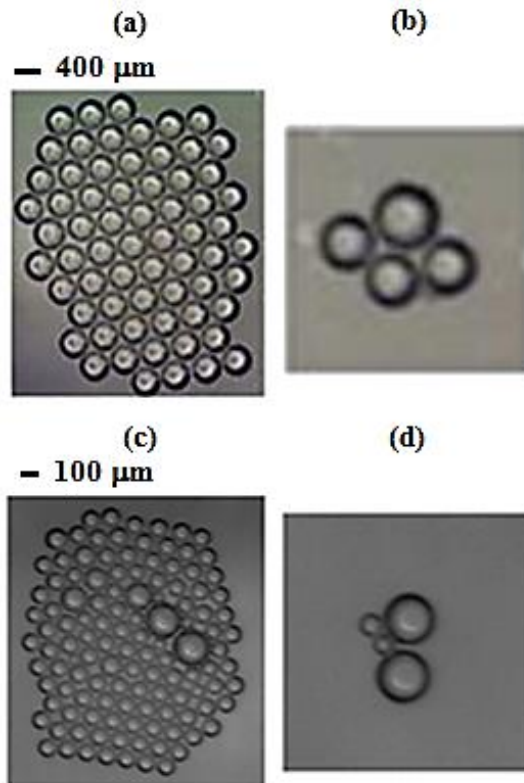
As curvas na Figura 22 comprovam que a matriz lipídica escolhida (óleo de girassol), associada ao tensoativo Tween 80 na proporção mássica referida, respondeu muito bem ao quesito de estabilidade. A população de microbolhas produzidas com o dispositivo sem o acoplamento do microcapilar manteve-se estável durante 217 minutos, com um valor populacional mínimo após 300 minutos. Para o dispositivo híbrido, a estabilidade da população das microbolhas durou 121 minutos, atingindo o valor populacional mínimo no final de 180 minutos. Este resultado já era esperado, devido ao menor diâmetro médio ( $D_m$ ) das microbolhas da segunda amostra, uma vez que, ao longo do tempo, ocorre troca gasosa entre o núcleo e o ambiente externo, causando uma perda gradual de gás do interior para o meio exterior, até o total desaparecimento das microbolhas.

Outro fator importante é a formação de estrutura de dupla camada. Este tipo de estrutura dificulta a troca gasosa entre o núcleo da microbolha e o ambiente externo, aumentando assim a sua estabilidade. Além da barreira física citada, a difusividade efetiva ( $\kappa$ ) da interface associada à massa molar do gás (M), desempenha um papel importante na estabilidade (MORGAN; ALLEN, 2000).

O uso de gases de baixa solubilidade em água e de massas molares mais elevadas como o perfluorobutano (PFB), aumenta a sobrevivência das microbolhas, devido a sua maior resistência de permeação à água. Neste trabalho, a fase gasosa utilizada para inflar as microbolhas foi o ar comprimido, cuja massa molar média é da ordem de 28,8 g/mol. A utilização de gases de massas molares mais elevadas e com baixa permeabilidade em relação à água, tal como o perfluorobutano (PFB) de massa molar 238,03 g/mol, pode aumentar ainda mais a estabilidade da população das microbolhas em comparação aos resultados aqui apresentados.

A Figura 23 apresenta o estado inicial e final da população das microbolhas com diâmetros médios diferentes obtidos pelos dois dispositivos. As Figuras 23 (a) e (b) representam a situação inicial e a situação final da população de microbolhas com um diâmetro médio de 313,0  $\mu\text{m}$ . As Figuras 23 (c) e (d) representam a situação inicial e a situação final da população de microbolhas com um diâmetro médio de 73,7  $\mu\text{m}$ .

**Figura 23** - Estado inicial e final da população das microbolhas de diferentes diâmetros.



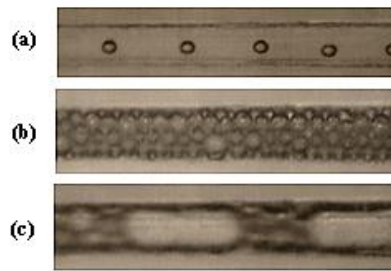
Fonte: Autoria própria.

Legenda: (a) e (b), representam a situação inicial e final da população de microbolhas com um diâmetro médio de 313,0  $\mu\text{m}$ ; (c) e (d), representam a situação inicial e final da população de microbolhas com um diâmetro médio de 73,7  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PADRÕES DE FLUXO

Na Figura 24 observam-se os padrões de fluxo característicos da região limítrofe à geração de microbolhas monodispersas isoladas. A Figura 24 (a) representa o padrão de microbolhas monodispersas isoladas, para  $Q_G$  variando entre 0,15 a 0,23  $\mu\text{l}/\text{min}$  e  $Q_L$  variando entre 84,00 a 252,00  $\mu\text{l}/\text{min}$ ,  $\eta_r = 2,2 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ,  $p_o = 20 \text{ kPa}$  e temperatura ambiente de 22° C. A Figura 24 (b) representa a região de transição representada pelo padrão de microbolhas dispersas agrupadas (zona de transição). A Figura 24 (c) representa o padrão de bolhas alongadas (*slugs*), para  $Q_G$  variando de 0,150 a 0,233  $\mu\text{l}/\text{min}$  e  $Q_L$  variando de 72 a 180  $\mu\text{l}/\text{min}$ ,  $\eta_r = 2,24 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  e  $p_o = 20 \text{ kPa}$ .

**Figura 24** – Padrões de fluxos no escoamento bifásico na região limítrofe à geração de microbolhas monodispersas.



Fonte: autoria própria.

Legenda: (a), Microbolhas monodispersas isoladas, para  $Q_G$  variando entre 0,15 a 0,23  $\mu\text{l}/\text{min}$  e  $Q_L$  variando entre 84,00 a 252,00  $\mu\text{l}/\text{min}$ ,  $\eta_r = 2,2$  mPa.s,  $p_o = 20$  kPa r e temperatura ambiente de 22°C; (b), Microbolhas dispersas agrupadas (zona de transição); (c), Bolhas alongadas (*slugs*), para  $Q_G$  variando de 0,15 a 0,23  $\mu\text{l}/\text{min}$  e  $Q_L$  variando de 72,00 a 180,00  $\mu\text{l}/\text{min}$ ,  $\eta_r = 2,2$  mPa.s e  $p_o = 20$  kPa.

Em relação à caracterização dos padrões de fluxo, os resultados obtidos apontam para a existência de uma região de fronteira bem definida em relação ao padrão de escoamento na qual se concentra este trabalho. Entre os padrões microbolhas monodispersas isoladas e bolhas alongadas (*slugs*), existe uma região de fronteira formada por microbolhas dispersas agrupadas (zona de transição), como mostra a Figura 25 (b). Nesta região, o comportamento do escoamento é bastante instável, e qualquer variação da vazão das fases líquida e gasosa propicia a transição para qualquer um dos padrões, o que já era esperado, levando-se em conta que o mecanismo de geração das microbolhas depende do controle crítico das vazões das duas fases (STRIDE, 2009).

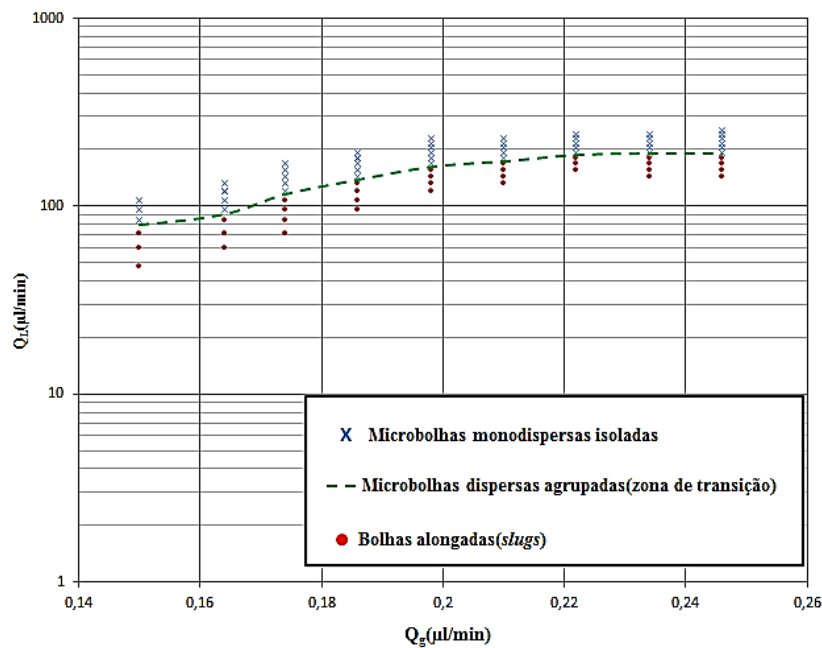
#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DO MAPA DE REGIME DE FLUXO

Na Figura 25, o mapa de regime de fluxo, apresenta claramente a região de fronteira onde ocorre a transição dos padrões. A região superior da curva corresponde ao regime de escoamento caracterizado pela presença de microbolhas monodispersas isoladas, com diâmetro médio variando de 73,7  $\mu\text{m}$ . Foi observado o aumento da frequência de geração de microbolhas com a variação positiva das vazões das fases líquida e gasosa. Esta constatação

demonstra a versatilidade do dispositivo em produzir microbolhas monodispersas isoladas a partir de uma determinada faixa de vazão, possibilitando uma escolha específica dos parâmetros de geração, que, por sua vez, está ligado à concentração das microbolhas em relação ao meio dispersante.

A escolha adequada dos parâmetros de geração (isto é,  $Q_L$  e  $Q_G$ ) constitui um fator determinante para se estabelecer a quantidade fármaco, uma vez que cada microbolha carrega individualmente uma dosagem do agente farmacológico específico para tratar um determinado tipo de doença.

**Figura 25** - Mapa de regime de fluxo na região de transição entre os padrões: microbolhas monodispersas isoladas e bolhas alongadas.



Fonte: Autoria própria.

Nota: O gráfico mostra ainda a região de microbolhas dispersas agrupadas (zona de transição).

A emulsão que constituiu a fase líquida do sistema bifásico (isto é, Tween 80 + água deionizada + óleo de girassol), desempenhou um papel importante no processo de obtenção do mapa de regime de fluxo. A viscosidade relativa ( $\eta_r$ ) da referida emulsão foi de 2,2 mPa.s, o que representa mais do que o dobro da viscosidade da água (1,00 mPa.s), possibilitando a



geração de microbolhas com menor grau de dispersão e de menor diâmetro médio, levando-se em conta que o aumento da viscosidade está associado à diminuição da tensão superficial (QUEIMADA; MARRUCHO, 2004), o que, por sua vez, facilita a formação de microbolhas com diâmetros menores (ver equação de Laplace na seção 2.2).

Como foi citado anteriormente, a obtenção do mapa de regime de fluxo se restringiu a uma região bem definida, correspondente à região limítrofe da geração de microbolhas monodispersas. Devido a esta especificidade, a vazão da fase gasosa foi reduzida a uma faixa estreita de valores, compreendidos entre 0,16  $\mu\text{l}/\text{min}$  a 0,23  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Nesta faixa de vazão foi possível produzir microbolhas monodispersas com o menor coeficiente de variação percentual ( $\chi=0,4\%$ ) e menor diâmetro médio ( $D_m=73,7 \mu\text{m}$ ).

## 5 CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

### 5.1 CONCLUSÕES

A técnica da impressão 3D possibilitou a fabricação dos dispositivos microfluídicos em uma única etapa a um custo de U\$ 37,50 por unidade fabricada, o que a torna competitiva comparada com as outras técnicas existentes (microlitografia). Aliado a isso, ela suprime os procedimentos adicionais de adaptação de conexões, além de produzir canais de seções circulares.

O dispositivo microfluídico híbrido, fabricado segundo esta técnica, foi capaz de produzir microbolhas com alto grau de uniformidade e coeficiente de variação percentual de 0,4%, o que representa um valor menor que o conseguido por Stride (2009), isto é, em torno de 1%. Em relação ao diâmetro das microbolhas, o dispositivo híbrido fabricado segundo a técnica de impressão 3D, conseguiu produzir bolhas com um diâmetro médio de 73,7 mm, que é ainda um valor sete vezes maior do que o ideal para as aplicações clínicas (isto é, menores que 10 mm).

A utilização de máquinas de impressão 3D com maior resolução deverá proporcionar a fabricação de dispositivos com canais de diâmetros inferiores a 70 mm. Aliado a isso, micropipetas (*ORIGIO-small holding micropipets*) podem ser acopladas aos dispositivos fabricados para diminuir a largura do canal de entrada da fase gasosa (Wd). A superação desta limitação técnica possibilitará a fabricação de dispositivos capazes de gerar microbolhas com diâmetros compatíveis para serem utilizadas como unidades carregadoras de fármacos.

A escolha da matriz lipídica de revestimento utilizada neste trabalho (óleo de girassol), respondeu satisfatoriamente em relação à capacidade de manter a população de microbolhas como estruturas individuais (estáveis) por um período mínimo de 121 minutos tendo o ar como fase gasosa. Os resultados sinalizam o grande potencial do óleo de girassol em se constituir uma alternativa viável de revestimento de microbolhas, visando a futuras aplicações clínicas. Aliado a isso, o óleo de girassol como matriz lipídica pode potencialmente agregar substâncias lipossolúveis, acenando a possibilidade da geração de microbolhas com o

princípio ativo (fármaco) já instalado.

Em relação à caracterização dos padrões de fluxo da região limítrofe à geração das microbolhas, os resultados apontaram para duas regiões de padrões bem definidos: microbolhas monodispersas isoladas e bolhas alongadas (*slugs*), além de uma região de transição caracterizada pelo padrão de microbolhas dispersas agrupadas com um comportamento muito instável.

A elaboração do mapa de regime de fluxo possibilitou uma visualização quantitativa do comportamento dinâmico do dispositivo gerador de microbolhas. Este procedimento proporcionou uma identificação precisa das vazões da fase líquida e gasosa, associadas à geração de microbolhas monodispersas isoladas.

Todos os objetivos propostos foram alcançados, apenas aquele relacionado ao diâmetro operacional das microbolhas para uso terapêutico (10  $\mu\text{m}$ ) não foi atingido em função das limitações técnicas relacionadas à fabricação dos dispositivos microfluídicos.

## 5.2 TRABALHOS FUTUROS

No decorrer deste trabalho surgiram dificuldades que não foram superadas, além de alguns assuntos pertinentes, que não foram tratados no seu desenvolvimento. Sendo assim, a seguir estão relacionados alguns tópicos que serão objetos de estudos para a realização de trabalhos futuros.

- Aperfeiçoar o dispositivo microfluídico de geração, visando produzir microbolhas de diâmetros compatíveis às aplicações terapêuticas.
- Pesquisar substâncias lipossolúveis e biocompatíveis que possam ser agregadas à camada de revestimento das microbolhas, visando a futuras aplicações terapêuticas.
- Estudar a estabilidade da população de microbolhas *in-vitro* quando submetidas às temperaturas de 36,5 a 37,5 °C (temperatura média corporal).
- Estudar o comportamento da população de microbolhas quando submetidas a um campo ultrassônico de frequência conhecida.

## REFERÊNCIAS

- BECKER, H. Microfluidics: a technology coming of age. **Med Device Technol**, v. 19, n. 3, p. 21-24, 2008.
- BECKER, H.; GARTNER, C. Microfluidics and the life sciences. **Sci Prog** v. 95, pt 2, p. 175-198, 2012.
- BEEBE, D. J. et al. Physics and applications of microfluidics in biology. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 4, p. 261-286, 2002.
- BORDEN, M. A.; LONGO, M. L. The dependence of lipid-coated microbubble dissolution behavior on acyl chain length. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 1, p. 35a-35a, 2002.
- BORDEN, M. A.; LONGO, M. L. Dissolution behavior of lipid monolayer-coated, air-filled microbubbles: Effect of lipid hydrophobic chain length. **Langmuir**, v. 18, n. 24, p. 9225-9233, 2002.
- BORDEN, M. A. et al. Lateral phase separation in lipid-coated microbubbles. **Langmuir**, v. 22, n. 9, p. 4291-4297, 2006.
- BRESLAUER, D. N. et al. Microfluidics-based systems biology. **Molecular Biosystems**, v. 2, n. 2, p. 97-112, 2006.
- COLEMAN, J. W.; GARIMELLA, S. Characterization of two-phase flow patterns in small diameter round and rectangular tubes. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 42, n. 15, p. 2869-2881, 1999.
- DITTRICH, P. S.; MANZ, A. Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 3, p. 210-218, 2006.
- EPSTEIN, P. S.; PLESSET, M. S. On the Stability of Gas Bubbles in Liquid-Gas Solutions. **Journal of Chemical Physics**, v. 18, n. 11, p. 1505-1509, 1950.
- FAROOK, U. et al. Novel co-axial electrohydrodynamic in-situ preparation of liquid-filled polymer-shell microspheres for biomedical applications. **J Microencapsul**, v. 25, n. 4, p. 241-247, 2008.
- FAROOK, U. et al. Preparation of suspensions of phospholipid-coated microbubbles by coaxial electrohydrodynamic atomization. **J R Soc Interface**, v. 6, n. 32, p. 271-277, 2009.
- FAROOK, U. et al. Preparation of microbubble suspensions by co-axial electrohydrodynamic atomization. **Medical Engineering & Physics** v. 29, n. 7, p. 749-754, 2007.

FERRARA, K. et al. Ultrasound microbubble contrast agents: fundamentals and application to gene and drug delivery. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 9, p. 415-447, 2007.

FIORINI, G. S.; CHIU D. T. Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application. **Biotechniques**, v. 38, n. 3, p. 429-446, 2005.

FANG, G.; CHEN, B. Numerical study on Taylor bubble formation in a micro-channel t-junction using VOF method. **Microgravity Science and Technology**, v. 21, p. 51-58, 2009.

FU, T. T. et al. Bubble formation and breakup mechanism in a microfluidic flow-focusing device. **Chemical Engineering Science** v. 64, n. 10, p. 2392-2400, 2009.

GARSTECKI, P. Formation of Droplets and Bubbles in Microfluidic Systems. **Microfluidics Based Microsystems: Fundamentals and Applications**, p. 163-181, 2010.

GARSTECKI, P. et al. Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction-scaling and mechanism of break-up. **Lab on a Chip**, v. 6, n. 3, p. 437-446, 2006.

GESCHKE, O. Microfluidics for bioapplications. **Anal Bioanal Chem**, v. 395, n. 3, p. 619, 2009.

GRAMIAK, R; SHAH, P. M. Echocardiography of the aortic root. **Invest Radiology**, v. 3, n. 5, p. 356-366, 1968.

JAKOBSEN, J. A. Safety of ultrasound contrast agents. **Eur Radiol** v. 15, n. 5, p. 941-945, 2005.

KHEIROLOMOOM, A. et al. Acoustically-active microbubbles conjugated to liposomes: characterization of a proposed drug delivery vehicle. **J Control Release**, v. 118, n. 3, p. 275-284, 2007.

KUHN, R.; HOFFSTETTER, S. Capillary Electrophoresis: Principles and Practice. **Springer Laboratory**, Berlin, 1993.

LENTACKER, I. et al. Design and evaluation of doxorubicin-containing microbubbles for ultrasound-triggered doxorubicin delivery: cytotoxicity and mechanisms involved. **Mol Ther** v. 18, n. 1, p. 101-108, 2010.

LIANG, H. J. et al. Sonoporation, drug delivery, and gene therapy. **Proc Inst Mech Eng H**. v. 224, n. 2, p. 343-61, 2010.

LIANG, H. J. et al. Phospholipid-Tween 80 mixed micelles as an intravenous delivery carrier for paclitaxel. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 5 p. 597-605, 2011.

LIN, G.; LEE, A. P. Microfluidics: an emerging technology for food and health science. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1190, p. 186-192, 2010.

LINDNER, J. R.; KAUL, S. Delivery of drugs with ultrasound. **Echocardiography** v. 18, n. 4, p. 329-337, 2001.

LUTZ, B. R. et al. Microfluidics without microfabrication. **Proc Natl Acad Sci U S A** v. 100, n. 8, p. 4395-4398, 2003.

MORGAN, K. E. et al. Experimental and theoretical evaluation of microbubble behavior: Effect of transmitted phase and bubble size. **IEEE Transactions on Ultrasonics Ferroelectrics and Frequency Control**, v. 47, n. 6, p. 1494-1509, 2000.

NIKOLAEVSKY, A. N. et al. Inhibitory Properties of Some of Antioxidants of Sun-Flower Oil Oxidation. **Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal**, v. 14, n. 11, p. 102-106, 1980.

NOMIKOU, N.; MCHALE A. P. Exploiting ultrasound-mediated effects in delivering targeted, site-specific cancer therapy. **Cancer Lett** v. 296, n. 2, p. 133-143, 2010.

NOMIKOU, N.; MCHALE, A. P. Microbubble-enhanced ultrasound-mediated gene transfer--towards the development of targeted gene therapy for cancer. **Int J Hyperthermia**, v. 28, n. 4, p. 300-310, 2012.

PANCHOLI, K. et al. Dynamics of bubble formation in highly viscous liquids. **Langmuir**, v. 24, n. 8, p. 4388-4393, 2008.

PANCHOLI, K. et al. Generation of microbubbles for diagnostic and therapeutic applications using a novel device. **J Drug Target**, v. 16, n. 6, p. 494-501, 2008.

PANCHOLI, K. P. et al. Novel methods for preparing phospholipid coated microbubbles. **Eur Biophys J**, v. 37, n. 4, p. 515-520, 2008.

QUEIMADA, A. J. et al. Generalized relation between surface tension and viscosity: a study on pure and mixed n-alkanes. **Fluid Phase Equilibria**, v. 222, p. 161-168, 2004.

SIMBERG, D.; MATTREY, R. Targeting of perfluorocarbon microbubbles to selective populations of circulating blood cells. **J Drug Target**, v. 17, p. 5, p. 392-398, 2009.

SQUIRES, T. M.; QUAKE, S. R. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. **Reviews of Modern Physics**, v. 77, n. 3, p. 977-1026, 2005.

STRIDE, E. Physical principles of microbubbles for ultrasound imaging and therapy. **Cerebrovasc Dis**, v. 27, Suppl 2, p. 1-13, 2009.

STRIDE, E.; EDIRISINGHE, M. Novel preparation techniques for controlling microbubble uniformity: a comparison. **Med Biol Eng Comput**, v. 47, n. 8, p. 883-892, 2009.

STRIDE, E.; SAFFARI, N. Microbubble ultrasound contrast agents: a review. **Proc Inst Mech Eng H**, v. 217, n. 6, p. 429-447, 2003.

TABELING, P. **Introduction to microfluidics**. Oxford: Oxford University Press, 2005.

TAKAHASHI, M. et al. Contrast-enhanced intraoperative ultrasonography using perfluorobutane microbubbles for the enumeration of colorectal liver metastases. **Br J Surg**, v. 99, n. 9, p. 1271-1277, 2012.

THOMPSON, L. F. et al. Introduction to microlithography: theory, materials, and processing. **The Society**, 1983.

THOMPSON, L. F. Materials for microlithography: radiation-sensitive polymers. **American Chemical Society**, 1984.

UNGER, E. et al. Gas-filled lipid bilayers as ultrasound contrast agents. **Invest Radiol**, v. 29, Suppl 2, p. S134-136, 1994.

UNGER, E. C. et al. Therapeutic applications of microbubbles. **European Journal of Radiology**, v. 42, n. 2, p. 160-168, 2002.

UNGER, E. C. et al. Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 56, n. 9, p. 1291-1314.

URDAHL, O. et al. Viscosity measurements of water-in-crude-oil emulsions under flowing conditions: A theoretical and practical approach. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 123, p. 623-634, 1997.

WANG, C. J.; LEVCHENKO, A. Microfluidics technology for systems biology research. **Methods Mol Biol**, v. 500, p. 203-219, 2009.

WANG, Q. Microfluidic one-step fabrication of radiopaque alginate microgels with in situ synthesized barium sulfate nanoparticles. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 22, p. 4781-4786, 2012.

WANG, W. et al. Lab-on-a-print: from a single polymer film to three-dimensional integrated microfluidics. **Lab on a Chip**, v. 9, n. 8, p. 1133-1137, 2009.

WHEATLEY, M. A. et al. Polymeric ultrasound contrast agents targeted to integrins: importance of process methods and surface density of ligands. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 516-522, 2007.

WHEATLEY, M. A. et al. Contrast agents for diagnostic ultrasound: development and evaluation of polymer-coated microbubbles. **Biomaterials**, v. 11, n. 9, p. 713-717, 1990.

WHITESIDES, G. M. et al. Soft lithography in biology and biochemistry. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 3, p. 335-373, 2001.

WIDMER, H. M. Trends in Industrial Analytical-Chemistry. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 2, n. 1, p. R8-R10, 1983.