

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

CARLOS TOSHIYUKI MATSUMI

**GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROBOLHAS
MONODISPERSAS COM REVESTIMENTO LIPÍDICO UTILIZANDO
DISPOSITIVOS DE ENTRONCAMENTO MICROFLUÍDICOS**

TESE DE DOUTORADO

CURITIBA
2018

CARLOS TOSHIYUKI MATSUMI

**GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROBOLHAS
MONODISPERSAS COM REVESTIMENTO LIPÍDICO UTILIZANDO
DISPOSITIVOS DE ENTRONCAMENTO MICROFLUÍDICOS**

Tese 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. Wilson José da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Joaquim Miguel Maia
Prof. Dr. Fábio Kurt Schneider

CURITIBA
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Matsumi, Carlos Toshiyuki

Geração e caracterização de microbolhas monodispersas com revestimento lipídico utilizando dispositivos de entroncamento microfluídicos / Carlos Toshiyuki Matsumi.-- 2018.

1 arquivo texto (100 f.) : PDF ; 4,17 MB

Modo de acesso: World Wide Web

Texto em português com resumo em inglês

Tese (Doutorado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Curitiba, 2018

Bibliografia: f. 93-100

1. Engenharia elétrica - Teses. 2. Microbolhas - Produção. 3. Microbolhas. 4. Micropipetas. 5. Emulsões. 6. Microfluídica. I. Silva, Wilson José da. II. Maia, Joaquim Miguel. III. Schneider, Fábio Kurt. IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial. V. Título.

CDD: Ed. 23 -- 621.3

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba
Bibliotecário: Adriano Lopes CRB-9/1429

TERMO DE APROVAÇÃO DE TESE Nº 183

A Tese de Doutorado intitulada “**Geração e Caracterização de Microbolhas Monodispersas com Revestimento Lipídico Utilizando Dispositivos de Entroncamento Microfluídicos**”, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Carlos Toshiyuki Matsumi**, no dia 29 de novembro de 2018, foi julgada para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Engenharia Biomédica, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial.

BANCA EXAMINADORA:

Prof(a). Dr(a). Wilson José da Silva - Presidente – (UTFPR)
Prof(a). Dr(a). Vitoldo Swinka Filho – (UFPR)
Prof(a). Dr(a). José Carlos da Cunha – (UFPR)
Prof(a). Dr(a). Sergio Francisco Pichorim – (UTFPR)
Prof(a). Dr(a). Paula Cristina Rodrigues – (UTFPR)

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 29 de novembro de 2018.

Dedico este trabalho a minha esposa Fabiana e aos meus filhos Vinicius, Guilherme e Alexandre, pelo amor e carinho dedicado.

Ao meu pai, Shigueru Matsumi e minha mãe, Toshiko Matsumi (in memoriam) pelos ensinamentos e exemplo de retidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, por me conceder o dom da vida e por ter me iluminado por mais esta fase da minha vida.

Ao professor orientador Dr. Wilson José da Silva e professores coorientadores, prof. Dr. Fabio Kurt Schneider e prof. Dr. Joaquim Miguel Maia pela orientação, dedicação, amizade e ensinamentos para a realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Rigoberto E. M. Morales pelo apoio e orientação e ao Núcleo de Escoamento Multifásico (NUEM – UTFPR) por proporcionar as condições técnicas necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao prof. Dr. José Aguiomar Foggiatto e ao Núcleo de Manufatura Aditiva e Ferramental (NUFER – UTFPR) pelo apoio e suporte técnico na fabricação dos dispositivos microfluídicos necessários para realização dessa pesquisa.

Ao Instituto Federal de Santa Catarina – IFSC pela concessão de afastamento e utilização dos laboratórios para a realização do doutorado.

Ao prof. Dr. Walter Duarte Araújo Filho, pela amizade e partilha de dúvidas no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colaboradores do NUEM, Amanda Z. Guembaroski e Rafael Fabrício Alves pelo apoio e atenção dispensada no desenvolvimento deste trabalho no Laboratório.

Aos colaboradores do NUFER, Lucas Gabriel Santos e Renata Marielli Coradin pela atenção dispensada no desenvolvimento dos protótipos 3D.

Aos colegas do Laboratório de Sensores Biomédicos e Dispositivos Semicondutores (LSBDS), Acácio José Zimbico, Charles Fung, Eduardo Tondin, Leonardo Zanin e Philipe Dias pela companhia e amizade.

Aos colegas do Instituto Federal de Santa Catarina, em especial ao colega Michael Klug pelo auxílio e atenção dispensada sempre que solicitados para a realização desse trabalho e aos colegas Nivaldo Teodoro Schiefler, José Flávio Dums e Jeferson Luiz Curzel, companheiros nesta caminhada de doutorado.

A todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e que não estão presentes entre essas palavras, mas certamente fazem parte do meu pensamento e de minha gratidão.

E por fim, a todos os amigos, que abdicaram de tão importante tempo da nossa amizade.

RESUMO

MATSUMI, Carlos Toshiyuki. Geração e caracterização de microbolhas monodispersas com revestimento lipídico utilizando dispositivos de entroncamento microfluídicos. 2018. 100 f. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

Atualmente existe um crescente interesse na utilização de microbolhas em vários campos da medicina, farmacologia e química, bem como na indústria de alimentos. Existem diversas técnicas utilizadas para a produção de microbolhas monodispersas, como por exemplo, a atomização eletro-hidrodinâmica coaxial (CEHDA), os métodos de insonação e os dispositivos microfluídicos. Algumas destas técnicas requerem procedimentos de segurança durante a aplicação de campos elétricos intensos (por exemplo, CEHDA) ou equipamentos de microlitografia macia para a produção de dispositivos microfluídicos que necessitam de sala limpa e ambiente controlados, evitando a contaminação no processo de microlitografia dos dispositivos. Os dispositivos de entroncamento microfluídicos possuem a menor taxa de dispersão do tamanho das microbolhas geradas, em comparação as técnicas de Insonação e CEHDA. Este trabalho apresenta o processo de geração das microbolhas com revestimento lipídico, pelo método de entroncamento de canal *T- Junction*, utilizando micropipetas de uso clínico inseridas em dispositivos microfluídicos desenvolvidos por impressora 3D, onde foram geradas microbolhas de tamanhos variados em relação às diferentes micropipetas utilizadas durante os experimentos. Os diâmetros das microbolhas geradas foram de 16,55 μm a 57,70 μm , conforme a micropipeta utilizada, e índice de polidispersidade (PDI) próximo de 1%. Com estes resultados foi possível elaborar uma curva característica relacionando o diâmetro da micropipeta em função do diâmetro da microbolha a ser gerada, por intermédio de um polinômio de 2ª ordem. Os resultados foram comparados a outras pesquisas que utilizaram a matriz lipídica como revestimento e ar como fase gasosa da microbolha. O erro percentual ficou entre 2,75% e 6,62% e erro absoluto entre 0,11 μm e 4,64 μm . De acordo com a curva característica elaborada, o dispositivo microfluídico possibilita a produção de microbolhas de tamanhos adequados à utilização para uso clínico, utilizando micropipeta com diâmetro interno inferior a 3 μm . Na continuidade deste trabalho foram realizados estudos da geração de microbolhas em elevada taxa de fluxo do líquido e fluxo do gás e da estabilidade da microbolha devido a alteração do revestimento (óleo de girassol e emulsificante) em diferentes proporções de massa e a associação de emulsificantes. A taxa de produção de microbolhas foi de 1800 bolhas por segundo, com diâmetro médio de 42,8 μm e índice de polidispersidade de 3%. Para a análise da estabilidade, foi possível mensurar o aumento da estabilidade pela associação de diferentes emulsificantes na camada de revestimento. A estabilidade obtida ficou compreendida entre 10 s a 900 s para uma microbolha com diâmetro inicial de aproximadamente 25 μm .

Palavras-chave: dispositivos de entroncamento microfluídicos, microbolhas, micropipetas, estabilidade de microbolhas.

ABSTRACT

MATSUMI, Carlos Toshiyuki. Generation and characterization of lipid-coated monodisperse microbubbles using microfluidic junction devices. 2018. 100 f. Doctoral thesis – Graduate Program in Electrical and Computer Engineering, Federal University of Technology Paraná. Curitiba, 2018.

There is a growing currently interest in the use of microbubbles in various fields of medicine, pharmacology and chemistry, as well as in the food industry. There are several techniques used for the production of monodisperse microbubbles, such as coaxial electro-hydrodynamic atomization (CEHDA), insonation methods and microfluidic devices. Some of these techniques require safety procedures during the application of intense electric fields (eg CEHDA) or soft microlithography equipment for the production of microfluidic devices, which require a clean room and controlled environment, avoiding the contamination in the microlithography process of the devices. The microfluidic trunking devices have the lowest dispersion rate of microbubble size generated, compared to the Insonation and CEHDA techniques. This work presents the process of generation of lipid-coated microbubbles by the T-junction channel junction method using clinical-use micropipettes inserted into microfluidic devices developed by a 3D printer, where microbubbles of different sizes were generated in relation to the different micropipettes used during the experiments. The diameters of the microbubbles generated were 16.55 μm at 57.7 μm , according to the micropipette used, and polydispersity index close to 1%. With these results it was possible to elaborate a characteristic curve relating the diameter of the micropipette as a function of the diameter of the microbubble to be generated, by means of a 2nd order polynomial. The results were compared to other studies that used the lipid matrix as coating and air as the gas phase of the microbubble. The percentage error was between 2.75% and 6.62% and absolute error between 0.11 μm and 4.64 μm . According to the elaborated characteristic curve, the microfluidic device allows the production of microbubbles of sizes suitable for clinical use, using a micropipette with internal diameter of less than 3 μm . In the continuity of this work, studies were carried out on the microbubble generation at high liquid flow rate and gas flow and microbubble stability due to alteration of the coating (sunflower oil and emulsifier) in different mass proportions and the association of emulsifiers. The microbubble production rate was 1800 bubbles per second, with an average diameter of 42.8 μm and a polydispersity index of 3%. For the stability analysis, it was possible to measure the increase in stability by the association of different emulsifiers in the coating layer. The stability obtained was between 10 s and 900 s for a microbubble with an initial diameter of approximately 25 μm .

Keywords: *Microfluidic junction devices, microbubbles, micropipettes, microbubble stability.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Técnicas de geração de microbolhas. (a) insonação, (b) CEHDA e (c) entroncamento <i>T-Junction</i>	21
Figura 2 – Dispositivo microfluídico. Onde: (a) apresenta o projeto com as especificações técnicas e (b) imagem do dispositivo microfluídico desenvolvido.	23
Figura 3 - Revestimentos de microbolhas, (a) Microbolha com revestimento de polímero e (b) Microbolha com revestimento de matriz lipídica e surfactante.....	26
Figura 4 - Estrutura de um tensoativo anfifílico.....	27
Figura 5 - Modos de transportes de fármacos (a) no interior da microbolha, (b) unidos à membrana interna, (c) na membrana externa e (d) associado a lipossomas unidos na camada externa.	27
Figura 6 - Representação do efeito de ressonância nas Microbolhas. Expansão e contração das microbolhas em sintonia com o período de rarefação e compressão do sinal acústico.....	28
Figura 7 - Campo ultrassônico aplicado sobre a microbolha. A microbolha é fragmentada por efeito de cavitação, liberando o fármaco que é absorvido pelo tecido permeado.	29
Figura 8 - Padrões de escoamento bifásico em dutos horizontais.	38
Figura 9 - Mapa de fluxo para escoamento horizontal de uma mistura ar-água em um tubo de 2,5 cm de diâmetro a 25°C e 1 bar.	39
Figura 10 - Técnica de insonação.....	41
Figura 11 - Representação da produção de microbolhas. Onde: (a) EDHA e (b) CEHDA.....	41
Figura 12 - Formato do escoamento do líquido pela aplicação do campo elétrico na CEDHA. Onde: (a) sem a aplicação de campo elétrico, (b) campo elétrico com intensidade média, (c) campo elétrico com intensidade elevada.	42
Figura 13 - Representação dos dispositivos de cofluxo.	43
Figura 14 - Representação dos dispositivos de fluxo focado. Onde: (a) representa ao fluxo focado aximétrico e (b) o fluxo focado planar.	44
Figura 15 - Representação dos dispositivos de fluxo cruzado. Onde: (a) representa o sistema <i>T-junction</i> e (b) o sistema <i>Y-junction</i>	45
Figura 16 - Curvas de distribuição do diâmetro das microbolhas em relação à frequência para as técnicas de geração (insonação, CEHDA e <i>T-junction</i>).	46
Figura 17 – Técnica de geração combinada, <i>T-junction</i> associado à CEHDA.....	47
Figura 18 - Técnica de geração combinada duplo <i>T-Junction</i>	48

Figura 19 - Representação do dispositivo de microfluídica (a) projeto do dispositivo de entroncamento desenvolvido em impressora 3D, (b) representação do entroncamento do canal do dispositivo e (c) o protótipo do dispositivo microfluídico desenvolvido.	50
Figura 20 - Modelos de dispositivos desenvolvidos e testados: (a) dispositivo móvel com micropipeta inserida em ponteira de pipeta, (b) dispositivo em <i>Y-junction</i> e (c) dispositivo em <i>T-junction</i> de dimensões reduzidas.....	51
Figura 21 - Representação de uma micropipeta de uso clínico, onde: (a) mostra a micropipeta com o comprimento, diâmetro externo da base e diâmetro interno da ponta e (b) mostra o ângulo de inclinação, comprimento da ponta e diâmetro interno da micropipeta em detalhe.	52
Figura 22 - Micropipeta com ponta no formato bisel.....	53
Figura 23 - Estrutura de duas camadas da Microbolha (matriz lipídica + tensoativo).....	54
Figura 24 – Aparato experimental utilizado na geração de microbolhas, onde: (a) Diagrama do aparato experimental e (b) Imagem real do aparato experimental.	56
Figura 25 – Imagem da régua com escala micrométrica.	57
Figura 26 - Aparato desenvolvido para visualizar o diâmetro da microbolha. Onde (a) é a imagem do aparato sobre a placa de petri contendo a régua micrométrica e (b) a imagem ampliada do aparato e escala de 1 DIV/10 μm da régua micrométrica.....	58
Figura 27 - Aquisição das microbolhas durante a coleta das microbolhas geradas pelo dispositivo microfluídico em alta taxa de produção.....	59
Figura 28 – Imagem da região de análise após o processamento do sistema de detecção de objetos circulares através da transformada de Hough.	59
Figura 29 – Sequência de imagens para determinar a curva de estabilidade da população de microbolhas.	61
Figura 30 - Captação e processamento do diâmetro da microbolha monodispersa para a curva de Estabilidade.....	61
Figura 31 – Imagem da geração de microbolhas monodispersas utilizando uma micropipeta inserida em dispositivo microfluídico (dispositivo híbrido).....	63
Figura 32 – Geração das microbolhas com dispositivo microfluídico híbrido, produzindo aproximadamente 1800 bolhas por segundo, com pressão do gás em 1,04 bar e vazão do líquido em 1,55 ml/min.....	65
Figura 33 – Imagens das microbolhas para cada experimento realizado.	65
Figura 34 - Curva de distribuição do diâmetro das microbolhas, utilizando a micropipeta MBB-BP-L-30.	69

Figura 35 - Imagem da microbolha gerada com micropipeta MBB-BP-L-30, (a) microbolha sobre a régua micrométrica e (b) imagem ampliada da microbolha com diâmetro aproximado de 60 μm .	69
Figura 36 - Curva de distribuição do diâmetro das microbolhas, utilizando a micropipeta MSC-20-30.	70
Figura 37 - Imagem da microbolha gerada com micropipeta MSC-20-30, (a) microbolha sobre a régua micrométrica e (b) imagem ampliada da microbolha com diâmetro aproximado de 40 μm .	70
Figura 38 - Curva de distribuição do diâmetro das microbolhas no experimento, utilizando a micropipeta MIC-SLM-30.	71
Figura 39 - Imagem da microbolha gerada com micropipeta MIC-SLM-30, (a) microbolha sob a régua micrométrica e (b) imagem ampliada da microbolha com diâmetro aproximado de 15 μm .	71
Figura 40 - Curva de distribuição gaussiana para microbolhas de diâmetros diferentes devido à alteração da vazão da fase líquida e fase gasosa.	73
Figura 41 – Gráfico da relação linear da produção de microbolhas referente à vazão da fase gasosa e vazão da fase líquida, com coeficiente de correlação de Pearson (R) de 0,9743. Onde, D_b é o diâmetro médio da microbolha, D_p é o diâmetro da micropipeta, Q_G é a vazão da fase gasosa e Q_L é a vazão da fase líquida.	73
Figura 42 - Gráfico da curva de estimativa do diâmetro da micropipeta em função do diâmetro da microbolha, apresentando o erro percentual (%) entre o ponto real e o ponto interpolado pela equação (1).	75
Figura 43 - Curva de distribuição do primeiro experimento de microbolhas geradas em alta taxa de produção.	77
Figura 44 - Curva de distribuição do segundo experimento de microbolhas geradas em elevada taxa de produção.	77
Figura 45 – Curva de distribuição do somatório dos experimentos em elevada taxa de produção.	78
Figura 46 - Curva de estabilidade da população de microbolhas para emulsão de água, óleo de girassol e polissorbato 80 (97: 2: 1).	80
Figura 47 - Curva de estabilidade da população de microbolhas para emulsão de água, óleo de girassol e polissorbato 80 (97: 1,5: 1,5).	80
Figura 48 - Curva de estabilidade da população de microbolhas para emulsão de água, óleo de girassol e polissorbato 80 (97: 1: 2).	81

Figura 49 - Curva de estabilidade média dos experimentos com óleo de girassol e emulsificante polissorbato 80.....	81
Figura 50 - Curva de estabilidade da população de microbolhas para emulsão de água, óleo de girassol, polissorbato 80 e lecitina de soja (97: 1: 1,5: 0,5).	82
Figura 51 - Curva de estabilidade da população de microbolhas para emulsão de água, óleo de girassol, polissorbato 80 e lecitina de soja 97: 1: 1: 1).....	83
Figura 52 - Curva de estabilidade da população de microbolhas para emulsão de água, óleo de girassol, polissorbato 80 e lecitina de soja (97: 1: 0,5: 1,5).	83
Figura 53 - Curva de estabilidade média dos experimentos com óleo de girassol e emulsificante polissorbato 80 associado ao emulsificante lecitina de soja.....	84
Figura 54 - Curva de estabilidade da população de microbolhas para emulsão de água, óleo de girassol, polissorbato 80 e mono e diglicerídeos (97: 1: 1,5: 0,5).....	85
Figura 55 - Curva de estabilidade da população de microbolhas para emulsão de água, óleo de girassol, polissorbato 80 e mono e diglicerídeos (97: 1: 1: 1).....	85
Figura 56 - Curva de estabilidade da população de microbolhas para emulsão de água, óleo de girassol, polissorbato 80 e mono e diglicerídeos (97: 1: 0,5: 1,5).....	86
Figura 57 - Curva de estabilidade média dos experimentos com óleo de girassol e emulsificante polissorbato 80 associado ao emulsificante mono e diglicerídeos.	86
Figura 58 - Curva característica de estabilidade das emulsões.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Micropipetas utilizadas na geração de microbolhas.....	52
Tabela 2 - Parametrização do diâmetro das microbolhas pelo número pixel correspondente para cada micrometro.	58
Tabela 3 - Tabela das micropipetas com melhores resultados.	63
Tabela 4 - Tabela de proporção de massa da fase líquida e viscosidade para a primeira etapa de testes.	67
Tabela 5 - Tabela de proporção de massa da fase líquida e viscosidade para a segunda etapa de testes.	67
Tabela 6 - Tabela de proporção de massa da fase líquida e viscosidade para a terceira etapa de testes.	67
Tabela 7 - Resultados obtidos utilizando as micropipetas MBB-BP-L-30, MSC-20-30 e MIC-SLM-30.....	72
Tabela 8 - Alteração do diâmetro da microbolha para diferentes ajustes da vazão da fase gasosa e da fase líquida para a micropipeta MIC-SLM-30.....	72
Tabela 9 - Diâmetro das microbolhas geradas em relação ao diâmetro interno das micropipetas.	74
Tabela 10 - Tabela de proporção de massa e concentração da emulsão água, óleo e polissorbato 80.	80
Tabela 11 - Tabela de proporção de massa e concentração da emulsão água, óleo, polissorbato 80 e Lecitina de Soja.	82
Tabela 12 - Tabela de proporção de massa e concentração da emulsão água, óleo, polissorbato 80 e mono e diglicerídeos.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

3D	3 Dimensões
CEHDA	<i>Coaxial Electro Hydrodynamics Atomization</i>
CMSC	<i>Contrast Media Safety Committee</i>
EHDA	<i>Electro Hydrodynamics Atomization</i>
ESUR	<i>European Society of Urogenital Radiology</i>
NUEM	Núcleo de Escoamentos Multifásicos
MEMs	<i>Micro Electro Mechanical Systems</i>
NUFER	Núcleo de Manufatura Aditiva e Ferramental
PFB	Perfluorobutane gas
PFC	Perfluorocarbon gas
PPGEM	Pós-Graduação em Engenharia Mecânica e de Materiais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SNC	Sistema Nervoso Central
TC	Tomografia computadorizada
MCA	<i>Middle Cerebral Artery</i>
VOF	<i>Volume of Fluid</i>
LSBDS	Laboratório de Sensores Biomédicos e Dispositivos Semicondutores
WPI	<i>World Precision Instruments</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

Φ	ângulo da ponta da micropipeta
$\dot{\gamma}$	taxa de cisalhamento
γ	tensão superficial
A	diâmetro interno maior da ponta bisel
a	diâmetro interno menor da ponta bisel
A_T	área transversal do tubo
B	constante universal dos gases perfeitos
C	comprimento total da micropipeta
C_a	número capilar
c_i	concentração inicial externa do meio líquido
c_s	concentração gasosa na superfície
d	diâmetro do canal de constrição
D	diâmetro do tubo cilíndrico de injeção de gás
D_b	diâmetro da microbolha
D_c	diâmetro do canal circular
D_h	diâmetro hidráulico
D_p	diâmetro interno da ponta da micropipeta
dr/dt	taxa de variação do raio em relação ao tempo
fps	frames por segundos
g	grama
H_2O_{DE}	água deionizada
ID	diâmetro interno
J	velocidade superficial da mistura
J_L	velocidade superficial do líquido
J_Q	velocidade superficial do gás
L	comprimento da ponta da micropipeta
l	comprimento do lado do quadrado
M	massa molar do gás
OD	diâmetro externo da micropipeta
O_{LG}	óleo de girassol
P_a	pressão atmosférica local

P_b	pressão interna da microbolha
P_b	pressão interna da bolha
PDI	índice de polidispersidade
P_G	pressão do gás
P_{PM}	proporção de massa
Q_G	vazão da fase gasosa
Q_L	vazão da fase líquida
R	raio da microbolha
r	raio instantâneo da microbolha
R_e	número de Reynolds
R_H	raio hidráulico do canal
R_o	raio inicial da microbolha
rpm	rotações por minuto
T	temperatura
t	tempo
T_{LS}	tensoativo lecitina de soja
T_{MD}	tensoativo mono e diglicerídeo
T_{T80}	tensoativo polisorbato 80
U_l	velocidade da fase líquida
V	velocidade
W_d	largura do canal de entrada da fase gasosa
α	constante de proporcionalidade
ΔP	variação da pressão
η	viscosidade
κ	coeficiente de difusividade
ρ	densidade
ρ_r	densidade relativa
σ	desvio padrão
τ	tensão de cisalhamento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	OBJETIVOS.....	22
1.2	JUSTIFICATIVA.....	22
1.3	ESTRUTURA DO TRABALHO.....	23
2	REVISÃO TEÓRICA.....	25
2.1	MICROBOLHAS.....	26
2.2	APLICAÇÕES DAS MICROBOLHAS EM TRATAMENTOS MÉDICOS.....	27
2.3	ESTABILIDADE DAS MICROBOLHAS.....	31
2.4	MICROFLUÍDICA APLICADA NA GERAÇÃO DE MICROBOLHAS.....	33
2.4.1	Sistemas microfluídicos.....	33
2.4.2	Comportamento dinâmico de fluidos em microcanais.....	35
2.5	DISPOSITIVOS DE GERAÇÃO DE MICROBOLHAS.....	40
2.5.1	Técnica de insonação.....	40
2.5.2	Técnica de atomização coaxial eletrohidrodinâmica (CEHDA).....	41
2.5.3	Técnica de entroncamento de canal.....	43
2.5.4	Técnicas de geração combinada.....	46
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1	INFRAESTRUTURA E INSTRUMENTAÇÃO.....	49
3.1.1	Dispositivo microfluídico de entroncamento de canal <i>T-junction</i>	50
3.1.2	Micropipetas.....	52
3.1.3	Composição da emulsão.....	53
3.1.4	Aparato experimental.....	55
3.1.5	Determinação do tamanho das microbolhas.....	56
3.1.6	Estudo da estabilidade da microbolha.....	60
3.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	62
3.2.1	Emulsão de matriz lipídica.....	62

3.2.2	Experimentos de geração de microbolhas com baixo índice de polidispersidade e diâmetro das microbolhas com dispositivo microfluídico híbrido	63
3.2.3	Experimentos de geração de microbolhas em elevada taxa de fluxo de líquidos e fluxo de gás com dispositivo microfluídico híbrido.....	64
3.2.4	Testes de estabilidade com alteração na concentração de fase dispersa	66
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS MICROBOLHAS GERADAS POR MODELO DE MICROPIPETA	68
4.1.1	Microbolhas geradas com micropipeta MBB-BP-L-30	68
4.1.2	Microbolhas geradas com micropipeta MSC-20-30	69
4.1.3	Microbolhas geradas com micropipeta MIC-SLM-30.....	70
4.1.4	Linearidade da produção de microbolhas com o dispositivo microfluídico	72
4.1.5	Curva de estimativa do diâmetro interno da micropipeta em função ao diâmetro da microbolha	74
4.2	TESTES DE GERAÇÃO DE MICROBOLHAS EM ELEVADA TAXA DE FLUXO DE LÍQUIDO E GÁS.....	76
4.3	ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS MICROBOLHAS	79
4.3.1	Estabilidade da emulsão óleo de girassol e emulsificante polissorbatato 80.....	79
4.3.2	Estabilidade da emulsão óleo de girassol e emulsificante polissorbatato 80 associado ao emulsificante lecitina de soja.....	82
4.3.3	Estabilidade da emulsão óleo de girassol e emulsificante polissorbatato 80 associado ao emulsificante mono e diglicerídeos.	84
4.3.4	Análise comparativa da estabilidade das microbolhas entre as emulsões.....	87
5	CONCLUSÃO.....	89
6	TRABALHOS FUTUROS.....	91
7	ARTIGOS PUBLICADOS.....	92

1 INTRODUÇÃO

Atualmente existe um crescente interesse na utilização de microbolhas (bolhas com diâmetro entre 1 a 1000 μm) em vários campos da medicina, farmacologia e química, bem como na indústria de alimentos. O tamanho das microbolhas varia de acordo com a sua aplicação, por exemplo, no tratamento da água, são necessárias microbolhas de 10 a 100 μm (TEMESGEN et al., 2017). Para a utilização em tratamentos médicos, imagens diagnósticas e como agentes carreadoras de genes e fármacos as microbolhas devem possuir dimensões abaixo de 10 μm , geralmente entre 2 a 8 μm para não ocasionar embolia pulmonar (WHEATLEY; SCHROPE; SHEN, 1990; MACE et al., 2011; CHEN; HWANG, 2013; SONG et al., 2013; KIM et al., 2014; ERRICO et al., 2015; KANG et al., 2015a; HWANG et al., 2016; JU et al., 2016; BEZ et al., 2017).

Existem diversos tratamentos terapêuticos utilizando as microbolhas como agente terapêutico, como por exemplo, na entrega de oxigênio, na dissolução de coágulos, na permeação temporária da barreira hematoencefálica e regeneração óssea (TRÜBESTEIN et al., 1976; TACHIBANA; TACHIBANA, 1995; MANALIGOD et al., 2000; CUIGNET; BAELE, 2002; MOLINA et al., 2006; CHO et al., 2016; BEZ et al., 2017; SAMIOTAKI et al., 2017).

No tratamento terapêutico convencional do câncer, é necessária uma concentração elevada de fármacos ministrada de maneira sistêmica, ocasionando muitas vezes, efeitos colaterais indesejáveis (LINDNER; KAUL, 2001; SAPRA; ALLEN, 2003). Métodos de tratamentos alternativos, como a utilização de microbolhas como agentes carreadores de fármacos para a entrega localizada, possibilita a entrega com concentração necessária na região de interesse do tratamento, minimizando o efeito tóxico da substância biologicamente ativa (fármacos) nas células saudáveis o que leva à diminuição dos efeitos colaterais (STRIDE, 2009).

As microbolhas são compostas por núcleo gasoso e uma camada externa de revestimento que pode ser constituída por diversos materiais, incluindo albumina humana, fosfolípidios, surfactantes e outros compostos (WHEATLEY; SCHROPE; SHEN, 1990; GRINSTAFF; SUSLICK, 1991; BORDEN; LONGO, 2002; SIRSI; BORDEN, 2012; CHEN et al., 2014). A camada externa (revestimento das microbolhas) constituída por lípidios possui características importantes como a biocompatibilidade e a ecogenicidade. O processo de produção do revestimento lipídico é mais simples, quando comparado ao revestimento por polímero (BANERJEE, 2001; BORDEN; LONGO, 2002; EDWARDS; BAEUMNER, 2006).

Existem diversas técnicas para a geração de microbolhas. Dentre elas, as técnicas mais utilizadas, incluem a insonação, a atomização coaxial eletrohidrodinâmica (CEHDA) e os dispositivos de entroncamento microfluídicos (STRIDE, 2009).

A técnica de insonação, mostrada na Figura 1 (a), envolve a utilização de ultrassom de alta intensidade para produzir microbolhas em uma suspensão de líquido contendo um determinado polímero ou surfactante que adere sobre a superfície das microbolhas formando estruturas estáveis, utilizando o ar ou outro gás como componente gasoso (PODELL et al., 1999; LEE et al., 2003). A distribuição do tamanho das microbolhas depende da frequência, da intensidade e do regime de pulso do ultrassom. Devido à não existência de uma teoria simples que relacione estas variáveis, o protocolo de fabricação é realizado de modo empírico (SUSLICK; GRINSTAFF, 1990).

A Figura 1 (b) apresenta a técnica da atomização coaxial eletrohidrodinâmica (CEHDA). Esta técnica possui procedimentos mais complexos no processo de fabricação das microbolhas comparados às técnicas de entroncamentos e insonação, mas, possibilita a fabricação de multicamadas de revestimento (AHMAD et al., 2008). Sua configuração é baseada na existência de dois canais coaxiais concentricamente alinhados, sendo que o canal interno é percorrido por um gás e o canal externo por uma emulsão de propriedade conhecida. Um campo elétrico é aplicado entre o canal externo e uma base coletora aterrada, com intensidade suficiente para ultrapassar o limiar da tensão superficial do líquido, formado um cone a partir do bocal do canal de onde emerge um jato muito fino. Esse jato rompe-se formando gotas associadas às microbolhas. A geração contínua e uniforme das microbolhas depende da combinação do ajuste dos parâmetros do fluxo do gás, fluxo do líquido, campo elétrico aplicado, viscosidade e tensão superficial do líquido (KIM; KIM, 2011).

Outra técnica utilizada na geração de microbolhas tem como base os dispositivos microfluídicos de entroncamento, mostrada na Figura 1(c). Estes dispositivos são capazes de gerar microbolhas monodispersas com taxas de dispersão menores comparadas às técnicas de insonação e CEHDA. Na configuração do dispositivo em *T-Junction*, dois canais são dispostos perpendicularmente e convergem para um ponto comum. Um dos canais é alimentado pela fase líquida e o outro pela fase gasosa. Devido à instabilidade da interface entre gás e líquido, ocorre o processo denominado de estrangulamento no ponto de encontro dos canais, levando à geração das microbolhas (PANCHOLI et al., 2008; PANCHOLI; STRIDE; EDIRISINGHE, 2008).

Dependendo da rapidez do estrangulamento (processo pelo qual pode ser realizado alterando a vazão da fase líquida e da fase gasosa) pode-se produzir microbolhas com tamanhos

diferentes. O processo de estrangulamento para gerar as microbolhas depende diretamente da composição da fase líquida, da composição do gás, da pressão, da viscosidade da fase líquida e principalmente da largura do canal de alimentação da fase gasosa (FU et al., 2009).

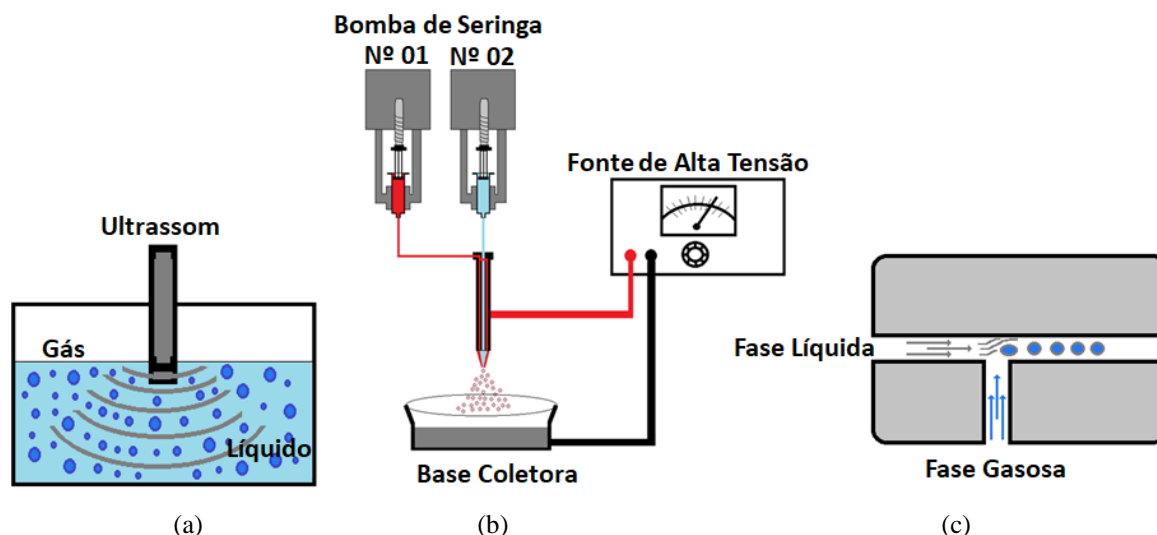


Figura 1 - Técnicas de geração de microbolhas. (a) insonação, (b) CEHDA e (c) entroncamento T-Junction.

Fonte: Autoria própria.

De acordo com Stride e Edirisinghe (2008, 2009), a técnica *T-junction* pode gerar microbolhas em uma única etapa, com coeficiente de variação (índice de polidispersidade) em torno de 1,0%, com menores custos operacionais (STRIDE; EDIRISINGHE, 2008, 2009). O índice de polidispersidade (PDI) é definido pela razão entre o desvio padrão e o diâmetro médio em percentual (PARHIZKAR; STRIDE; EDIRISINGHE, 2014).

Uma característica importante para a modalidade de entrega de fármacos é a uniformidade da população das microbolhas, pois a eclosão desta, para a liberação do fármaco ou gene na região de interesse depende da aplicação de um campo ultrassônico incidente, numa determinada frequência de ressonância (cavitação) que depende de maneira quase direta ao seu diâmetro (STRIDE; EDIRISINGHE, 2008; STRIDE, 2009).

1.1 OBJETIVOS

O presente trabalho apresenta a técnica de geração de microbolhas monodispersas através de dispositivos microfluídicos híbridos de entroncamento de canal *T-junction*, tendo como objetivo o desenvolvimento de um aparato de geração de microbolhas e dispositivos microfluídicos de baixo custo, produção de microbolhas em elevada taxa de fluxo de líquido e gás e redução do diâmetro da microbolha gerada pela técnica *T-junction* para valores próximos do tamanho para uso clínico.

Dentro do objetivo geral proposto, têm-se os seguintes objetivos específicos:

- Projetar e fabricar dispositivos microfluídicos de entroncamento de canal utilizando a técnica de impressão 3D, para a inserção de micropipetas de uso clínico na geração de microbolhas monodispersas;
- Realizar experimentos com o dispositivo de entroncamento microfluídico, usando diferentes modelos de micropipetas, investigando a eficácia na produção de microbolhas monodispersas e estabelecer uma curva de estimativa do diâmetro da micropipeta em função do diâmetro da microbolha gerada;
- Analisar a relação linear da produção de microbolhas referente à vazão da fase gasosa e vazão da fase líquida do dispositivo de entroncamento microfluídico.
- Avaliar o desempenho do dispositivo microfluídico na capacidade de produção de microbolhas em alta taxa de fluxo de líquido e gás.
- Realizar experimentos para estudar a estabilidade das microbolhas, alterando a composição da fase dispersa da emulsão composta por óleo de girassol (matriz lipídica) e emulsificante polisorbato 80 (Tween™ 80) em diferentes percentuais e pela associação de diferentes emulsificantes.

1.2 JUSTIFICATIVA

Nos estudos realizados por Araújo et al. (2012), foi desenvolvido um dispositivo microfluídico de entroncamento de canal *T-junction*, utilizando a técnica de impressão 3D, com capacidade de gerar microbolhas de diâmetros de 73,7 μm , utilizando micropipetas de diâmetro interno de 70 μm , com índice de polidispersidade de 0,4%, sendo produzido um total de 52 microbolhas isoladas e taxa de produção de 13 microbolhas por segundo. A Figura 2, mostra o

dispositivo desenvolvido por Araújo e colaboradores (ARAÚJO; SCHNEIDER; MORALES, 2012; ARAÚJO, 2013).

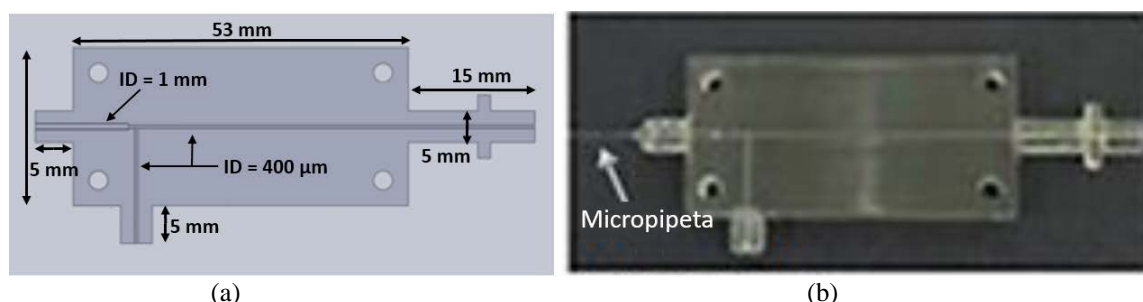


Figura 2 – Dispositivo microfluídico. Onde: (a) apresenta o projeto com as especificações técnicas e (b) imagem do dispositivo microfluídico desenvolvido.

Fonte: Adaptado de Araújo et al. (2012).

O diâmetro das microbolhas geradas nos experimentos de Araújo et al. (2012), possui dimensões de aproximadamente 7,5 vezes acima do uso clínico e baixa taxa de produção, comparada as técnicas *T-junction* de dispositivos desenvolvidos por microlitografia suave, onde a taxa de produção é cerca de 1000 microbolhas por segundo (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2015). Em gerações em alta taxa de microbolhas para uso clínico, o diâmetro deve compreender a faixa de 2 a 8 μm e o índice de polidispersidade das microbolhas abaixo de 5% (HETTIARACHCHI et al., 2007; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2015).

Devido a estas necessidades, a proposta deste trabalho foi desenvolver um dispositivo microfluídico de entroncamento de canal *T-junction*, com capacidade de gerar microbolhas de menor tamanho, estabelecer uma curva de estimativa do diâmetro da micropipeta em função do diâmetro da microbolha gerada, para produção de microbolhas de dimensões de uso clínico (menores que 10 μm) e taxa de produção semelhante às técnicas *T-junction* de dispositivos desenvolvidos por microlitografia suave.

1.3 ESTRUTURA DO TRABALHO

Neste trabalho, os capítulos foram estruturados em um total de sete, sendo separados por assuntos. Desta forma, este primeiro capítulo, designado de introdução, traz uma contextualização das microbolhas e aplicações terapêuticas, as técnicas de geração mais utilizadas. Além disso, foram apresentados os objetivos e as justificativas desta pesquisa.

O segundo capítulo apresenta uma revisão teórica da microbolha como carreadora de fármacos e genes, tratamentos terapêuticos com o uso das microbolhas, estabilidade, a microfluídica aplicada na geração e as técnicas de geração mais utilizadas.

No terceiro capítulo é mostrado a infraestrutura, instrumentação utilizada neste trabalho e os procedimentos experimentais desenvolvidos.

O quarto capítulo trata da discussão e os resultados obtidos na caracterização da geração das microbolhas conforme o modelo de micropipeta utilizada, na geração de microbolhas em alta taxa de produção e a estabilidade da população das microbolhas com a alteração do revestimento.

O quinto capítulo aborda a conclusão, ressaltando a contribuição deste trabalho na caracterização da geração de microbolhas pela técnica de entroncamento de canal, utilizando dispositivos microfluídicos híbridos, na geração de microbolhas em alta taxa de produção e da caracterização da estabilidade da população das microbolhas com a alteração do revestimento. Apresenta também, a continuidade do trabalho.

O sexto capítulo aborda os trabalhos futuros a serem desenvolvidos, para o aprimoramento da técnica de impressão 3D aplicada em dispositivos microfluídicos na geração de microbolhas.

Por fim, o sétimo capítulo apresenta os artigos publicados.

2 REVISÃO TEÓRICA

Atualmente existe um crescente interesse na utilização de microbolhas (bolhas com diâmetro entre 1 a 1000 μm) em vários campos da medicina, farmacologia e química, bem como na indústria de alimentos. As aplicações são completamente díspares, como a aeração da água e o tratamento de resíduos, cultivo de algas em larga escala, o aprimoramento da sensação cremosa dos produtos dietéticos entre outros exemplos de aplicações (FISCHER et al., 2009; ZIMMERMAN et al., 2009; TERASAKA et al., 2011). O tamanho das microbolhas varia de acordo com a sua aplicação, por exemplo, no tratamento da água, são necessárias microbolhas de 10 a 100 μm (TEMESGEN et al., 2017).

A utilização do ultrassom na obtenção de imagens médicas para diagnóstico se popularizou devido à baixa invasividade, capacidade de diagnóstico em tempo real e baixo custo operacional comparado à tomografia computadorizada (TC) e à ressonância magnética nuclear (RMN) (NOMIKOU; MCHALE, 2010).

A imagem por ultrassom é frequentemente usada para avaliar e diagnosticar muitos tipos de órgãos, tecidos moles e fluxo sanguíneo. As principais aplicações clínicas de imagens de ultrassom são a cardiologia (abdominal, tireoide, coração e vasos sanguíneos) e obstetrícia, principalmente para o diagnóstico de várias doenças, incluindo tumores (STRIDE; SAFFARI, 2003). Com o avanço técnico da ultrassonografia, outras aplicações surgiram, tais como, imagem cerebral, imagens de fusão, biofísica celular e tratamentos terapêuticos diagnósticos (theragnosis) (LEE et al., 2011; MACE et al., 2011; MONTILLA et al., 2013; SONG et al., 2013; KIM et al., 2014; ERRICO et al., 2015; KANG et al., 2015a, 2015b; HWANG et al., 2016; YOON et al., 2016; JU et al., 2016). Nestes procedimentos, utilizam-se agentes de contraste ampliando o uso do ultrassom em novas aplicações clínicas. Entre os vários agentes de contraste disponíveis, as microbolhas foram utilizadas como agente de contraste nas imagens de ultrassom e também em tratamentos terapêuticos diagnósticos (BLOMLEY et al., 2001). A melhoria nas imagens é devido ao aumento dos ecos produzidos pelas microbolhas, uma vez que, possuem características acústicas diferentes do meio circundante, realçando a imagem ultrassonográfica (MILLER; NANDA, 2004).

As diretrizes para o uso clínico de agentes de contraste aplicados em humanos foram revisadas e discutidas pelo Comitê de Segurança do uso de agentes de contraste (Contrast Media Safety Committee – CMSC) da Sociedade Europeia de Radiologia Urogenital (European Society of Urogenital Radiology – ESUR) e no 11º Simpósio Europeu de Radiologia Urogenital em

Santiago de Compostela, Espanha em 2004, onde poucos produtos foram aprovados para uso clínico, e somente os agentes de contraste utilizando microbolhas foram aprovados (JAKOBSEN et al., 2005).

2.1 MICROBOLHAS

As microbolhas são compostas por um núcleo gasoso (ar, nitrogênio, perfluorobutano, entre outros) revestido por uma camada externa de albumina humana, lipídios, surfactantes, polímeros, proteínas entre outros (WHEATLEY; SCHROPE; SHEN, 1990; GRINSTAFF; SUSLICK, 1991; BORDEN; LONGO, 2002; CUIGNET; BAELE, 2002; GARG; THOMAS; BORDEN, 2013; CHEN et al., 2014; SONG et al., 2015). A Figura 3 mostra a composição da microbolha e fármaco em seu interior com o revestimento por polímero e por revestimento de matriz lipídica e surfactante.

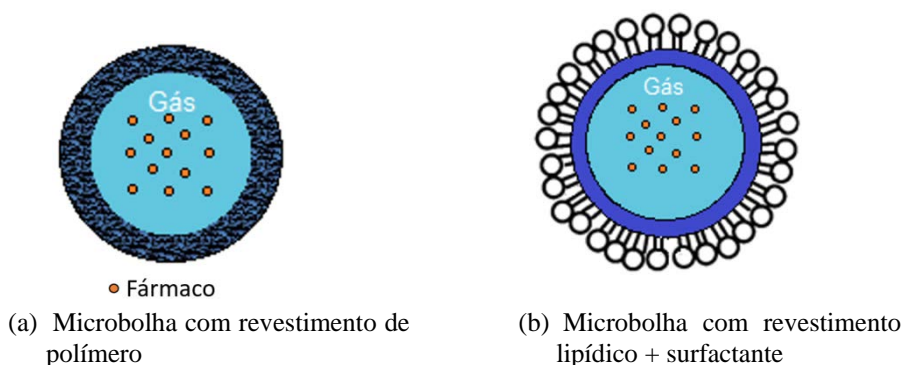


Figura 3 - Revestimentos de microbolhas, (a) Microbolha com revestimento de polímero e (b) Microbolha com revestimento de matriz lipídica e surfactante.

Fonte: Autoria própria.

A camada externa lipídica (revestimento lipídico) possui características importantes como a biocompatibilidade, a ecogenicidade e processo de produção mais simples, quando comparadas ao revestimento por polímeros (BORDEN; LONGO, 2002; UNGER et al., 2004). Outra característica importante do revestimento lipídico é a possibilidade de formar micelas e lipossomas, capazes de agregar ou encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, devido a sua propriedade anfifílica (moléculas que apresentam características hidrofílicas e hidrofóbicas). Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos são muito utilizados na entrega de fármacos e genes (BANERJEE, 2001; EDWARDS; BAEUMNER, 2006).

Os surfactantes (tensoativos ou emulsificantes) são substâncias que alteram as propriedades interfaciais e superficiais de um líquido diminuindo a tensão superficial entre eles (FAROOK et al., 2007). Essas substâncias possuem uma estrutura composta por uma parte polar (hidrofílica) e uma parte apolar (hidrofóbica) e por apresentarem uma região hidrofóbica

e outra região hidrofílica estas estruturas são conhecidas como substâncias anfifílicas. A Figura 4 apresenta esta estrutura.

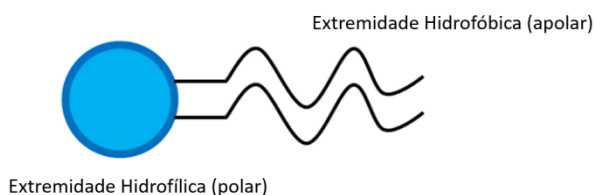


Figura 4 - Estrutura de um tensoativo anfifílico.
Fonte: Autoria própria.

As microbolhas utilizadas como agente terapêutico podem transportar fármacos ou genes de diferentes maneiras. A Figura 5 apresenta os diversos meios de transporte de fármacos utilizando as microbolhas: (a) fármacos podem encontrar-se no interior das microbolhas associados ao gás; (b) fármacos podem unir-se à membrana interna que envolve a microbolha; (c) fármacos podem ser parte integrante da membrana externa que envolve a microbolha; (d), fármacos podem ainda se associar a lipossomas, unindo-se eletrostaticamente na camada externa da microbolha.

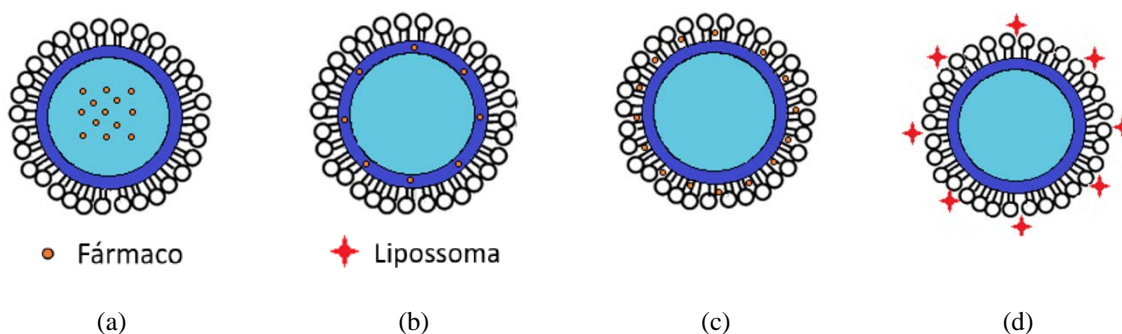


Figura 5 - Modos de transportes de fármacos (a) no interior da microbolha, (b) unidos à membrana interna, (c) na membrana externa e (d) associado a lipossomas unidos na camada externa.
Fonte: Autoria própria.

2.2 APLICAÇÕES DAS MICROBOLHAS EM TRATAMENTOS MÉDICOS

Nos tratamentos terapêuticos diagnósticos as microbolhas são utilizadas em conjunto com o ultrassom (SONG et al., 2013; KIM et al., 2014). A aplicação dos pulsos ultrassônicos nas microbolhas promove fenômenos físicos conhecidos como cavitação e sonoporação (WALTON; SHOHET, 2009; SIRSI; BORDEN, 2012). A cavitação é um fenômeno que envolve a oscilação das microbolhas pela aplicação de pulsos ultrassônicos, onde, podem ser estáveis e instáveis (WALTON; SHOHET, 2009).

Na cavitação estável, as microbolhas oscilam de forma linear, ou seja, sofrem contração e expansão uniforme, conforme os efeitos de compressão e rarefação do pulso ultrassônico (efeito ressonância). Ao excitar a microbolha com pulso de maior intensidade, o encapsulamento que envolve a microbolha se romperá (cavitação instável) (DAYTON et al., 1999; DE JONG et al., 2000; MILLER; NANDA, 2004; TSUTSUI; XIE; PORTER, 2004; MEHIER-HUMBERT et al., 2005). A Figura 6 apresenta o efeito de ressonância nas microbolhas.

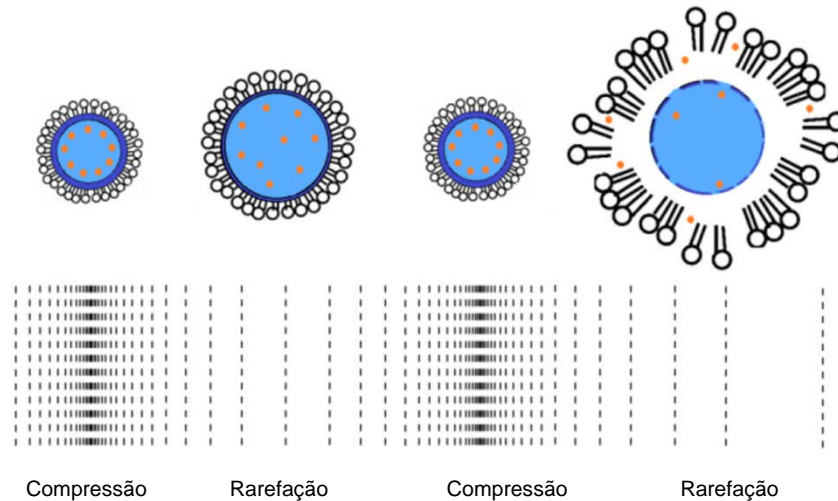


Figura 6 - Representação do efeito de ressonância nas Microbolhas. Expansão e contração das microbolhas em sintonia com o período de rarefação e compressão do sinal acústico.

Fonte: Autoria própria.

Durante a cavitação, as microbolhas estando próximas a uma membrana celular, podem apresentar uma deformação ou fragmentação, aumentando a porosidade (permeação) da membrana. Este aumento de porosidade da membrana da célula por meio do ultrassom é conhecido como sonoporação (TSUNODA et al., 2005; LIANG et al., 2010; KOOIMAN et al., 2011; SIRSI; BORDEN, 2012; LENTACKER et al., 2014).

A Figura 7 apresenta os efeitos da cavitação e sonoporação com o uso das microbolhas mediada por ultrassom, onde se mostra a eclosão da microbolha liberando o agente farmacológico carregado e a permeação na membrana celular.

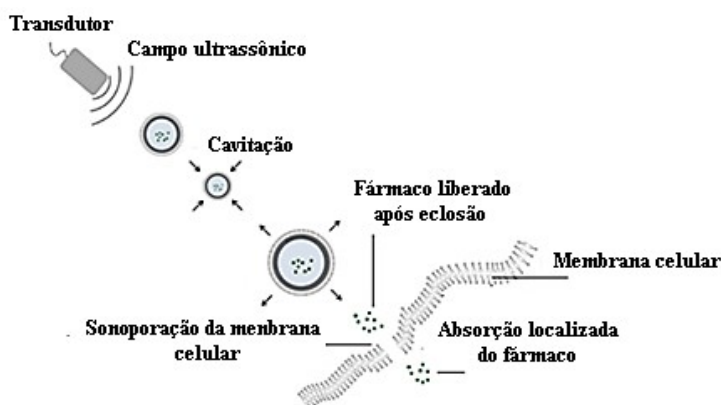


Figura 7 - Campo ultrassônico aplicado sobre a microbolha. A microbolha é fragmentada por efeito de cavitação, liberando o fármaco que é absorvido pelo tecido permeado.

Fonte: Adaptado de Lentacker (2009).

O mecanismo exato que envolve este processo ainda não é completamente compreendido, mas se supõem que as microbolhas oscilantes induzam a cavitação, enquanto que as fragmentações das microbolhas podem criar perfurações nas paredes da célula (TSUTSUI; XIE; PORTER, 2004; MEHIER-HUMBERT et al., 2005).

Existem diversas aplicações terapêuticas com o uso das microbolhas mediadas por ultrassom, em grande parte, associadas a fármacos e aos fenômenos da cavitação e sonoporação.

As microbolhas podem ser utilizadas na entrega de oxigênio, onde o gás perfluorocarbono (PFC) é enriquecido com oxigênio, oferecendo mais oxigênio por unidade de volume do que os PFCs líquidos utilizados como substitutos do sangue (MANALIGOD et al., 2000; CUIGNET; BAELE, 2002; UNGER; MCCREERY; WU, 2003; WOLF et al., 2008).

Desde a década de 70, Trübestein e colaboradores demonstraram a aplicação de ultrassom de alta frequência na dissolução de trombos (coágulo sanguíneo em veias) a administração conjunta das microbolhas e fármacos trombolíticos mediados por ultrassom aumentam ainda mais a capacidade na dissolução dos trombos (TRÜBESTEIN et al., 1976; TACHIBANA; TACHIBANA, 1995). Este efeito é em grande parte o resultado da cavitação de microbolhas, que influenciam na destruição do coágulo. Em outro estudo, Molina et al. (2006) mostraram que nos casos de acidente vascular cerebral, em pacientes com oclusão da artéria cerebral média (*Middle Cerebral Artery* - MCA) a utilização de fármacos associados a microbolhas e mediadas por ultrassom, foram significativamente mais eficazes do que a utilização do ultrassom e fármacos apenas (MOLINA et al., 2006).

Outro exemplo seria a permeação temporária da barreira hematoencefálica para a entrega de fármacos. A barreira hematoencefálica é composta de células endoteliais ligadas por junções apertadas e responsável pelo transporte seletivo de moléculas para o sistema nervoso central (SNC), protegendo o cérebro de substâncias externas como, por exemplo, os compostos

tóxicos ou agentes patogênicos (CORDON-CARDO et al., 1989; KINOSHITA et al., 2006). A cavitação estável é considerada o principal mecanismo de abertura da barreira. O estresse mecânico e de cisalhamento, gerado pela cavitação estável de microbolhas, aumenta a permeabilidade das paredes dos vasos sanguíneos no cérebro, resultando na redução de junções apertadas entre as células endoteliais vasculares (YANG et al., 2008; TUNG et al., 2011; CHO et al., 2016; SAMIOTAKI et al., 2017).

Outra modalidade de aplicação é a entrega de genes, como por exemplo, na regeneração óssea. Os ossos fraturados são tratados com matrizes de colágeno (proteína necessária para reconstrução óssea), que atraem as células-tronco e iniciam a reconstrução óssea. Em seguida são inseridas microbolhas carregadas com genes, proporcionando a entrega destes nas células, reduzindo as complicações durante o tratamento ortopédico e com propriedades biomecânicas equivalentes aos enxertos ósseos (BEZ et al., 2017).

O tratamento terapêutico convencional com a utilização de fármacos utilizados de modo sistêmico no intuito de evitar ou inibir o crescimento e a disseminação de células cancerígenas (tumores) acarreta na toxicidade sistêmica, resultando em citotoxicidade para as células e tecidos normais, causando efeitos colaterais. A limitação da quantidade do fármaco, concentração ou da relação destas, requer procedimentos cumulativos da aplicação durante o tratamento, podendo levar a metástases e o aumento da resistência da célula cancerígena contra os fármacos (LINDNER; KAUL, 2001; SAPRA; ALLEN, 2003). A utilização das microbolhas como método de tratamento alternativo, possibilita a entrega de fármacos em quantidade e concentração necessária, numa determinada região específica, através do transporte do fármaco agregado na microbolha, limitando a toxicidade de células e tecidos saudáveis fora desta região, diminuindo os efeitos colaterais e possibilitando uma melhor qualidade de vida aos pacientes durante o tratamento (STRIDE; EDIRISINGHE, 2008; STRIDE, 2009).

Devido aos diferentes tamanhos de uma população de microbolhas (CHIN; BURNS, 2000), assim como o efeito adicional da frequência, os limiares da potência do sinal acústico nos fenômenos da cavitação não são precisos e variam entre os diferentes tipos de bolhas (comportamento está diretamente relacionado às propriedades do gás e do encapsulamento utilizado) os processos que envolvem estes fenômenos não são completamente compreendidos (DE JONG et al., 2000).

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 ao qual está dispersa.

As pesquisas de microbolhas estão no centro das atenções em imagens de ultrassonografia e terapias diagnósticas devido ao seu contraste sensível e à sua eficiência terapêutica. No entanto, ainda existem limitações de estabilidade, causadas pela difusão do gás central através do revestimento. Muitos estudos estão sendo realizados para superar esta limitação, utilizando materiais diversos na composição da estrutura dos revestimentos, como por exemplo, o polietilenoglicol (PEG) ou pela utilização de gases de alta densidade (perfluorocarbonos) (SCHUTT et al., 2003). A estabilidade do revestimento pode melhorar significativamente a funcionalidade das microbolhas e as estratégias de aplicação terapêutica *in vivo*.

Atualmente, o tamanho das microbolhas é controlado por meio de vários métodos, incluindo centrifugação e sistemas microfluídicos (HETTIARACHCHI et al., 2007; STRIDE; EDIRISINGHE, 2008; FESHITAN et al., 2009; STRIDE, 2009). O tamanho da microbolha é uma característica que necessita intensa investigação, como por exemplo, a frequência de ressonância para a cavitação (DE JONG; BOUAKAZ; FRINKING, 2002).

2.3 ESTABILIDADE DAS MICROBOLHAS

A estabilidade é a capacidade da microbolha se manter intacta, conservando o fármaco para a entrega localizada desejada, pois, caso contrário, o fármaco pode ser liberado em local aleatório.

As microbolhas geradas sem encapsulamento adequado (sem revestimento polimérico ou lipídico) possuem baixa estabilidade e se dissolvem de forma espontânea, quase imediata. Esta situação é devido à tensão superficial da interface entre gás e líquido. A tensão superficial (γ) ocorre entre duas fases imiscíveis, produzindo uma interface entre elas. A diferença de pressão entre as fases resulta em uma curvatura, onde a pressão mais elevada está no lado côncavo e a menor pressão está no lado convexo. A queda de pressão através da interface da microbolha é dada pela equação de Young e Laplace (BORDEN; QIN; FERRARA, 2009), como mostra a equação (2.1).

$$\Delta P = P_b - P_a = \frac{2\gamma}{R} \quad (2.1)$$

Onde: P_a é a pressão ambiente, P_b a pressão interna da microbolha, γ a tensão superficial e R o raio da microbolha. É necessário que haja uma barreira entre a interface gás - líquido para impedir a perfusão do gás.

O processo da estabilidade da microbolha é descrito pelo modelo proposto por Epstein-Plesset, o qual pressupõe uma geometria da bolha perfeitamente esférica durante a dissolução, no entanto, fornece informações úteis para mostrar o efeito da estabilização da microbolha, mostrado pela equação (2.2) (EPSTEIN; PLESSET, 1950).

$$\frac{dr}{dt} = \frac{\kappa(c_i - c_s)BT}{M \left(P_a + \frac{4\gamma}{3R_0} \right)} \left[\frac{1}{R_0} + \frac{1}{\sqrt{\pi\kappa t}} \right] \quad (2.2)$$

Onde: dr/dt representa a taxa de variação do raio da microbolha em relação ao tempo, κ é o coeficiente de difusividade do gás no líquido, c_i a concentração inicial do gás numa solução gás e líquido, c_s a concentração do gás dissolvido na solução saturada para uma determinada temperatura e pressão, B é a constante universal dos gases perfeitos, T a temperatura, M a massa molar do gás, P_a a pressão ambiente, γ a tensão superficial, R_0 o raio inicial da bolha e t o tempo.

Conforme a equação (2.2), a taxa de variação do raio da microbolha (dr/dt) é diretamente proporcional a relação da diferença da concentração de c_i e c_s ($c_i - c_s$), quanto menor for à diferença entre c_i e c_s , menor será a taxa de variação do raio. Outro fator que afeta a estabilidade da microbolha é a difusividade efetiva da interface (κ). As constantes κ e γ dependem do gás e do líquido sob investigação e qualquer outro material presente no revestimento na superfície da microbolha, o que pode reduzir a tensão superficial e diminuir significativamente a perfusão gás (BORDEN; LONGO, 2002). A taxa de variação do raio também será afetada pela temperatura e pressão na superfície.

Borden, Qin e Ferrara (2009) mostraram que o efeito da resistência de permeação gasosa no invólucro da microbolha é tanto maior quanto maior for à massa molar (M) da fase gasosa, logo, conforme a equação (2.2), quanto maior for a massa molar, menor será a variação do raio da microbolha.

O aumento da estabilidade da microbolha pode ser feito utilizando gases com massa molar maior, como por exemplo, o perfluorobutano (PFB) que possui uma resistência de permeação em relação à água de 100 vezes maior do que a resistência de permeação do ar em um mesmo meio (BORDEN; QIN; FERRARA, 2009).

Outra maneira de aumentar a estabilidade é pela diminuição da perfusão do gás com o meio. Um encapsulamento adequado da microbolha por meio de revestimento polimérico ou lipídico propicia a diminuição da perfusão do gás, melhorando a estabilidade das microbolhas (UNGER et al., 2004). Nos encapsulamentos por matriz lipídica, os agentes emulsivos, responsáveis pela diminuição da tensão interfacial entre óleo e água possuem um papel importante na estabilidade das emulsões, dependendo do agente emulsionante utilizado e das características físicas da película interfacial formada, a estabilidade da microbolha pode ser aumentada. Estudos realizados por Shen et al. (2008) comprovam o aumento da estabilidade de microbolhas revestidas com um emulsionante alimentar monostearina em combinação com estearato de polietilenoglicol 40 (PEG40). Neste mesmo estudo, foram observados outros emulsionantes, que não possibilitaram a formação de uma camada de revestimento adequada (SHEN; POWELL; LONGO, 2008).

Para que a microbolha tenha uma estabilidade adequada para a entrega de fármaco, sem que haja a sua eclosão antecipada, a camada de revestimento deve possuir uma resistência específica que minimize a tensão superficial e simultaneamente resistir à permeação do gás, aumentando a estabilidade (BORDEN; QIN; FERRARA, 2009).

2.4 MICROFLUÍDICA APLICADA NA GERAÇÃO DE MICROBOLHAS

A Microfluídica surgiu no final da década de 1970, sendo parte da tecnologia de sistemas microeletromecânicos (*Micro Electro Mechanical Systems - MEMS*), e se apresenta como uma grande ferramenta em áreas como análises químicas, biotecnologia e processos químicos. A microfluídica utiliza dispositivos capazes de processar pequenas quantidades de fluidos, permitindo operações contínuas em uma única fase ou na formação de gotas (duas fases imiscíveis) (NGUYEN; WERELEY, 2006; WHITESIDES, 2006).

2.4.1 Sistemas microfluídicos

Os sistemas microfluídicos são constituídos de canais que podem variar de dezenas a centenas de micrômetros, com geometrias diversas e podem ser microfabricados em substratos como polímeros, silício, metais, cerâmicas e vidros (WHITESIDES, 2006; SACKMANN; FULTON; BEEBE, 2014). Para obtenção de estruturas com dimensões micrométricas, técnicas

como fotolitografia, de corrosão e de deposição de filmes são amplamente utilizadas (WHITESIDES, 2006).

Nos sistemas microfluídicos, a produção de emulsões é o primeiro exemplo da aplicação dos dispositivos para obtenção de partículas na microescala. As emulsões são constituídas de uma fase dispersas (gotas) em outra fase líquida imiscível e são importantes na produção de cremes, encapsulação de reagentes e fármacos, entre outras aplicações (ENGL; BACKOV; PANIZZA, 2008). As emulsões podem ser de camada simples ou dupla, e sua obtenção nos sistemas microfluídicos pode envolver processos passivos ou ativos. Nos processos ditos passivos, as gotas são obtidas em função da geometria dos microcanais e do controle dos fluxos da fase contínua e da fase dispersa. Por conta das características dos fluidos e das condições de taxa de vazão escolhidas, o fluxo disperso sofre constrição, quebrando em gotas por conta da instabilidade na interface entre os dois fluidos. Nos processos ativos, a quebra da gota resulta da atuação pneumática, com uso de piezoelétricos ou ainda pelo uso de eletrodos, podendo gerar gotas na escala micrométrica (ZHAO; MIDDELBERG, 2011).

Os fluidos, nesta escala micrométrica assumem um comportamento diferente do observado na escala macrométrica. Na microescala os fluidos podem ser estudados como fluxo molecular ou meio contínuo.

Para o modo como fluxo molecular, o fluido pode ser considerado como um conjunto de moléculas, podendo ser trabalhado de forma determinística (mecânica newtoniana) ou probabilística (mecânica estatística) (LIN; LEE, 2010).

No caso do fluido modelado como um meio contínuo, ele pode ser caracterizado pelas equações de Navier-Stokes (equações diferenciais que descrevem o escoamento de fluidos newtonianos) 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; WALKER, 2002).

A viscosidade é a propriedade física que descreve o escoamento de um fluido, ou seja, é a resistência que o fluido oferece à deformação por cisalhamento. Assim, fluidos mais viscosos necessitam de maior força para se mover do que aqueles menos viscosos (STEFFE, 1996) e dependem de alguns fatores de natureza físico-química, tais como a temperatura (o aumento da temperatura diminui a viscosidade); a pressão (a viscosidade apresenta um aumento diretamente proporcional ao aumento da pressão); a taxa de cisalhamento (dependendo do material,

a viscosidade pode aumentar ou diminuir conforme o aumento da taxa de cisalhamento) e o tempo (a viscosidade varia com o tempo de atuação na deformação em fluidos, cuja viscosidade depende tanto do valor instantâneo como dos valores anteriores de tensão de cisalhamento (SCHRAMM, 1994).

O comportamento do escoamento de um líquido (descrito por Isaac Newton) apresenta a tensão de cisalhamento (força aplicada) como uma relação direta da constante intrínseca de proporcionalidade do gradiente de deformação (taxa de cisalhamento) e a resistência do fluido (viscosidade). A Equação (2.3), mostra a relação deste comportamento de escoamento (SCHRAMM, 1994).

$$\tau = \eta \times \dot{\gamma} \quad (2.3)$$

Onde: τ = tensão de cisalhamento (Pa), $\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento (s^{-1}) e η = viscosidade (Pa.s).

Os fluidos podem ser classificados como newtonianos e não newtonianos. Para um fluido newtoniano, a tensão de cisalhamento é uma função linear da taxa de cisalhamento e a constante de proporcionalidade para esta relação, η é chamada de viscosidade newtoniana (SCHRAMM, 1994). Muitos fluidos são newtonianos, como por exemplo, a água, solventes, óleos vegetais e soluções muito diluídas (STEFFE, 1996).

2.4.2 Comportamento dinâmico de fluidos em microcanais

O regime de fluxo na escala micrométrica é caracteristicamente laminar e apresenta baixos valores do número de Reynolds. O número de Reynolds pode ser definido em três regimes de fluxo, sendo: laminar para o número de Reynolds com valor muito menor que 2000 ($Re \ll 2000$), transitório para valores de Reynolds entre 2000 e 4000 ($2000 \leq Re \leq 4000$) e turbulento para valores de Reynolds maior que 4000 ($Re > 4000$) (TABELING, 2005). O número de Reynolds é definido pela equação (2.4).

$$Re = \frac{\rho V D_h}{\eta} \quad (2.4)$$

Onde, ρ representa a densidade, V é a velocidade média do fluxo no canal, D_h é o diâmetro hidráulico do canal e η é a viscosidade dinâmica do fluido.

O diâmetro hidráulico (D_h) do canal é dado pela equação (2.5):

$$D_h = 4R_H \quad (2.5)$$

Onde, R_H é o raio hidráulico, sendo para seções circulares $R_H = D_c/4$, onde D_c é o diâmetro da seção circular e para seções quadradas $R_H = l/4$, onde l é o comprimento de um lado do quadrado.

Para número de Reynolds menores que 1 ($Re < 1$) a dinâmica do fluido em microcanais é dominado pela força viscosa e pelo gradiente de pressão, desse modo, os efeitos das forças inerciais são desprezíveis (PARHIZKAR; STRIDE; EDIRISINGHE, 2014).

Outro parâmetro de grande importância no estudo do comportamento dinâmico de fluidos em microcanais é o número de capilaridade ou número capilar (Ca), que relaciona as forças viscosas (viscosidade) e a tensão superficial que atua na interface entre dois líquidos imiscíveis ou entre um gás e um líquido. O número capilar é definido pela equação (2.6).

$$Ca = \frac{\rho U_l}{\gamma} \quad (2.6)$$

Onde, ρ representa a densidade da fase líquida, U_l a velocidade da fase líquida e γ a tensão superficial entre as duas fases (líquida e gasosa).

Para números capilares muito menores que o valor unitário ($Ca \ll 1$), a interface da bolha gerada mantém a sua forma, minimizando a sua área superficial de modo independente do número capilar (Ca), entretanto, a geometria do dispositivo desempenha um papel importante na dinâmica de formação das microbolhas (GARSTECKI et al., 2006). Para valores de $Ca \ll 1$ o mecanismo de ruptura para a formação de microbolhas é conhecido como regime de compressão.

Guo e Chen (2009) desenvolveram um método de volume de fluidos (*Volume of Fluid Method* - VOF) que simula os fluxos de gás e líquido em microcanais do dispositivo *T-junction* e opera baseado no princípio de que dois ou mais fluidos não são interpenetráveis (GUO; CHEN, 2009).

Em 2006, Garstecki et al. demonstraram que a formação de microbolhas na região de entroncamento dos fluxos, em um sistema *T-junction* pode ser descrita utilizando uma equação experimental. Neste regime, a dimensão da microbolha (D_b) é determinada através da equação (2.7) (GARSTECKI et al., 2006).

$$\frac{D_b}{W_d} = 1 + \alpha \frac{Q_G}{Q_L} \quad (2.7)$$

Onde, W_d é a largura do canal da fase gasosa, Q_G é a vazão da fase gasosa, Q_L é a vazão da fase líquida e α uma constante de proporcionalidade.

A constante de proporcionalidade (α) depende das características geométricas do dispositivo (o formato geométrico e comprimento dos canais), mas é quase independente das propriedades do fluido. Neste caso específico, ao qual a largura do canal do gás é semelhante à largura do canal do líquido, α assume valores na ordem das unidades (isto é, α varia de valores entre 1 a 9) (GARSTECKI et al., 2006).

Diversos estudos são realizados para uma maior compreensão dos principais mecanismos que influenciam a dinâmica de escoamentos bifásicos e das características de transferência de calor em microcanais, sendo que estes mecanismos dependem principalmente dos efeitos da tensão superficial e da viscosidade, diferentemente das forças inerciais que preponderam nos sistemas de escoamento em macroescala (GARSTECKI et al., 2004, 2006; XIONG; BAI; CHUNG, 2007; GUO; CHEN, 2009).

O estudo do comportamento dinâmico de fluidos imiscíveis em microcanais, para o regime bifásico (gás e líquido), pode ser realizado 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, a partir das velocidades superficiais da fase líquida (J_L) e gasosa (J_G).

Os principais padrões de fluxo no contexto qualitativo de escoamento bifásico (líquido e gás) em processos adiabáticos para dutos horizontais são mostrados na Figura 8, sendo classificados em quatro regimes: estratificado, intermitente, anular e disperso (COLEMAN; GARIMELLA, 1999).



Figura 8 - Padrões de escoamento bifásico em dutos horizontais.

Fonte: Adaptado de Coleman e Garimella, 1999.

O regime estratificado pode ser liso ou ondulado, onde o estratificado apresenta pequenas flutuações na interface inferior do canal de condução. Este regime ocorre para vazões do gás mais elevado e baixa vazão do fluxo de líquido.

O regime de fluxo intermitente apresenta um padrão de bolhas alongadas (*slugs*) e golfadas, ocorrendo geralmente para uma vazão do gás relativamente baixa no canal de condução, para uma determinada vazão da fase líquida que mantém o canal preenchido.

O regime de fluxo anular é caracterizado por uma camada de líquido escoando de forma contínua nas paredes do canal de condução (película de líquido escoando nas paredes do canal), possuindo um núcleo contínuo de vazão do gás. Este regime ocorre quando a vazão da fase gasosa é elevada para uma determinada vazão da fase líquida.

O regime de fluxo disperso possui dois padrões de fluxo distintos: o fluxo de bolha padrão e o fluxo de bolhas dispersas. O primeiro ocorre quando o fluxo de gás é laminar, gerando bolhas sem um formato consistente, devido ao comportamento turbulento do líquido no canal. Estas bolhas possuem dimensões menores comparadas às bolhas de formato alongado (*slugs*) gerados no regime de fluxo intermitente. Para um determinado equilíbrio da vazão da fase líquida e da fase gasosa, as bolhas começam a ter formatos mais consistentes e dispersos no meio líquido, esta característica é chamada de padrão de fluxo de bolhas dispersas (COLEMAN; GARIMELLA, 1999).

Os mapas de regime de fluxo representam os padrões de fluxos diferentes, delimitados por regiões de fronteiras entre os padrões por meio de gráfico, a partir das velocidades superficiais da fase líquida (J_L) e gasosa (J_G). Estes mapas determinam as regiões de fronteira dos padrões de fluxo (regimes), fornecendo um panorama abrangente das variações destes padrões, possibilitando a escolha do padrão de fluxo que se deseja trabalhar de acordo com as variáveis controladas. A Figura 9 apresenta um mapa de regime de fluxo para um sistema bifásico ar e água com canal de condução de 2,5 cm de diâmetro, temperatura ambiente de 25°C e pressão de 1 bar, onde as regiões de fronteira entre os padrões de fluxos são definidos para velocidades superficiais de líquido (J_L) e gás (J_G) (TAITEL; DUKLER, 1976).

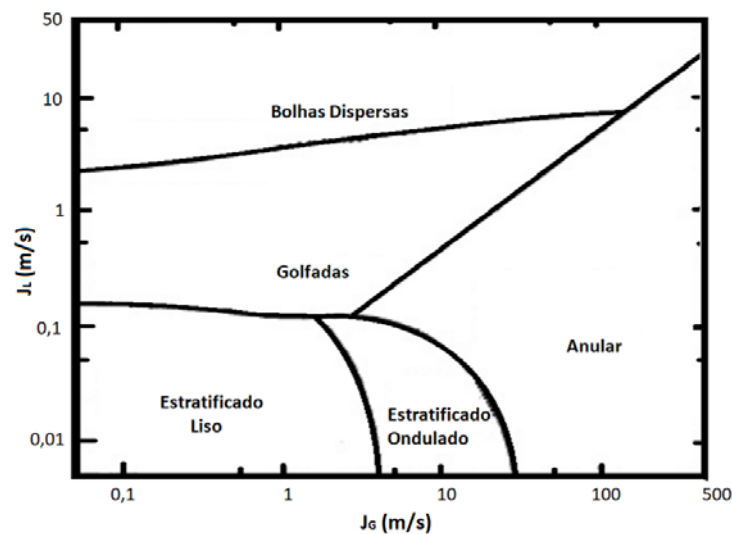


Figura 9 - Mapa de fluxo para escoamento horizontal de uma mistura ar-água em um tubo de 2,5 cm de diâmetro a 25°C e 1 bar.

Fonte: Adaptado de Taitel e Dukler, 1976.

As velocidades superficiais do líquido (J_L) e do gás (J_G) são definidas como a razão entre a vazão volumétrica (Q) da fase correspondente e a área da seção transversal do tubo (A_T), como mostrado na equação (2.8) e equação (2.9).

$$J_L = \frac{Q_L}{A_T} \quad (2.8)$$

$$J_G = \frac{Q_G}{A_T} \quad (2.9)$$

Dessa forma, a velocidade superficial representa a velocidade média que a fase teria caso escoasse sozinha na tubulação. A soma das velocidades superficiais é definida como sendo a velocidade da mistura (J), apresentada na equação (2.10).

$$J = J_L + J_G \quad (2.10)$$

2.5 DISPOSITIVOS DE GERAÇÃO DE MICROBOLHAS

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 de entroncamento (*coflow*, *T-junction* e *flow focusing*) (UNGER et al., 2004; HETTIARACHCHI et al., 2007; PANCHOLI; STRIDE; EDIRISINGHE, 2008; STRIDE, 2009; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2015).

Nos experimentos realizados por Stride e Edirisinghe (2008), a técnica *T-junction* pode gerar microbolhas em uma única etapa e índice de polidispersidade em torno de 1%, (taxa de dispersão) e menores custos operacionais comparadas às técnicas de insonação e CEHDA, uma vez que não necessita de condições críticas de controle ambiental e de limpeza, além da facilidade de fabricação, quando comparado com a microlitografia suave (FIORINI; CHIU, 2005; STRIDE; EDIRISINGHE, 2008). Aliado a isso, 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 (PANCHOLI; STRIDE; EDIRISINGHE, 2008).

2.5.1 Técnica de insonação

A técnica de insonação é a mais utilizada na produção das microbolhas. Esta compreende a preparação das microbolhas por meio da utilização de ultrassom de alta intensidade para produzir microbolhas de gás numa suspensão em meio líquido. A suspensão pode ser composta por polímero ou surfactante adequado que permitirá a adesão sobre as superfícies das microbolhas e formarem um revestimento estável (UNGER et al., 2004; ZHAO et al., 2005).

A produção das microbolhas geradas depende da frequência, da intensidade e do regime de pulso do ultrassom. Os protocolos de fabricação são realizados de forma empírica, devido a não existência de uma teoria simples que relacione estas variáveis (SUSLICK; GRINSTAFF, 1990). A Figura 10 mostra a técnica de insonação.

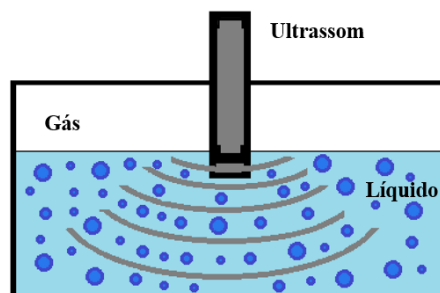


Figura 10 - Técnica de insonação.
Fonte: Autoria própria.

Este método é o mais simples na produção das microbolhas, possui o maior índice de polidispersidade do tamanho das microbolhas geradas (PDI acima de 150%), sendo necessários processos de filtragem, separação, ou da relação destas, para remover quaisquer bolhas de dimensões acima do limiar de utilização por via intravenosa (evitando a embolia gasosa) e excesso de surfactante (STRIDE; EDIRISINGHE, 2008, 2009).

2.5.2 Técnica de atomização coaxial eletrohidrodinâmica (CEHDA)

A atomização coaxial eletrohidrodinâmica (CEHDA) é uma das técnicas utilizadas na geração de microbolhas. Possui a maior complexibilidade nos parâmetros de controle para a produção de microbolhas, comparada a técnica de insonação e os de entroncamento. Esta técnica possibilita a fabricação de bicamadas ou policamadas de revestimento mais simples comparadas ao sistema de entroncamento (AHMAD et al., 2008; PANCHOLI et al., 2008; KIM; KIM, 2011; LEE; BAI; CHEN, 2011). A atomização coaxial eletrohidrodinâmica (CEHDA) é uma técnica que evoluiu da atomização eletrohidrodinâmica (EHDA). A Figura 11 apresenta a técnica de geração CEHDA e a sua antecessora EDHA.

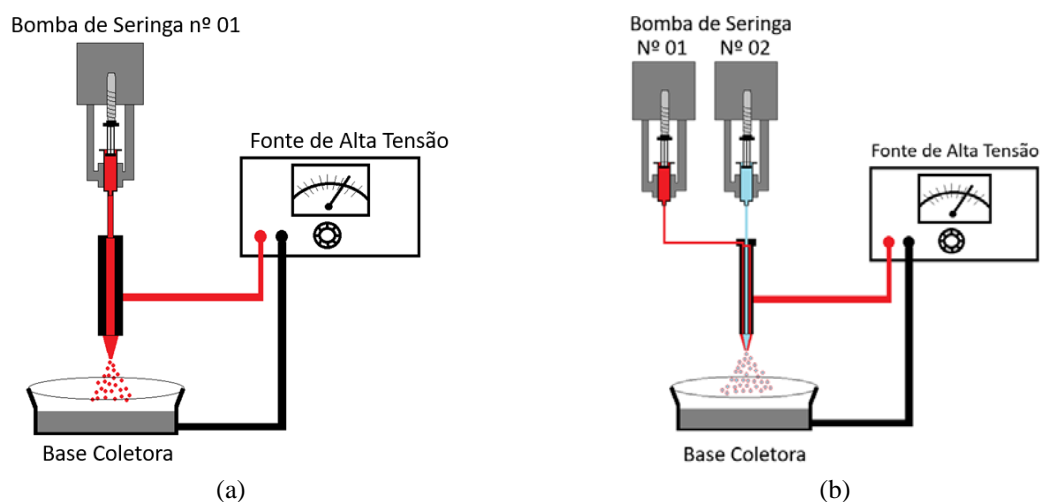


Figura 11 - Representação da produção de microbolhas. Onde: (a) EDHA e (b) CEHDA.
Fonte: Autoria própria.

A CEHDA é um método no qual existem dois canais dispostos, alinhados coaxialmente, sendo que o canal interno é percorrido por gás e o canal externo por líquido. O fluxo do líquido e do gás é fornecido com precisão e de forma distinta (controle individual), e um campo elétrico é aplicado entre o canal externo (tubo metálico) e uma base coletora aterrada. Quando o campo elétrico de intensidade suficiente é aplicado (diferença de potencial entre 6 a 21 kV) e excede o limiar da tensão superficial do líquido, forma-se um cone (cone de Taylor) a partir do bocal do canal, de onde emerge um jato muito fino. Esse jato rompe-se formando gotas com microbolhas (STRIDE; EDIRISINGHE, 2008; PARHIZKAR; STRIDE; EDIRISINGHE, 2014). O controle para gerar as microbolhas de forma contínua e uniforme depende da combinação do ajuste dos parâmetros da taxa de fluxo do gás, da taxa de fluxo do líquido, campo elétrico aplicado, viscosidade e tensão superficial do líquido (FAROOK et al., 2007; PANCHOLI et al., 2008; KIM; KIM, 2011). A Figura 12 mostra a alteração do formato no escoamento do líquido pela aplicação de campo elétrico intenso, onde: (a) escoamento do líquido pelo bocal sem aplicação de campo elétrico; (b) início do afunilamento do jato na saída do bocal pela aplicação de campo elétrico de intensidade média e (c) maior afunilamento do jato na saída do bocal pela aplicação de campo elétrico intenso (cone de Taylor).

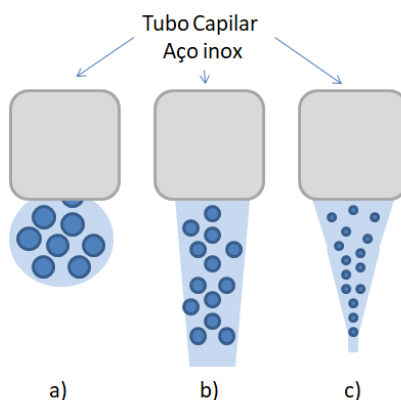


Figura 12 - Formato do escoamento do líquido pela aplicação do campo elétrico na CEDHA. Onde: (a) sem a aplicação de campo elétrico, (b) campo elétrico com intensidade média, (c) campo elétrico com intensidade elevada.

Fonte: Autoria própria

Este método não necessita de filtragem, mas possui um índice de polidispersidade elevado das microbolhas ($PDI > 30\%$) e maior complexidade na produção, devido aos diversos parâmetros de ajustes de campo elétrico, fluxo da fase líquida, fluxo da fase gasosa, distância entre a base coletora e o canal gerador de microbolha, viscosidade e tensão superficial do fluido. Devido à necessidade da utilização de campos elétricos de alta intensidade, necessita certo grau de segurança para a geração das microbolhas (STRIDE; EDIRISINGHE, 2009; PARHIZKAR; STRIDE; EDIRISINGHE, 2014).

2.5.3 Técnica de entroncamento de canal

O procedimento dinâmico para produção de microbolhas nesta técnica é fundamentado na microfluídica. Os dispositivos são comumente produzidos a partir da litografia suave em moldes elastômeros de polidimetilsiloxano (PDMS). Para a fabricação destes dispositivos são necessários equipamentos de alto custo e alta tecnologia para a construção dos microcanais. A construção do dispositivo demanda diferentes etapas de preparação e de adaptações das interfaces dos microcanais para a escala macroscópica. Além disso, necessita de um ambiente limpo e controlado para evitar a contaminação por partículas presentes no ar (BRESLAUER; LEE; LEE, 2006; BECKER; GÄRTNER, 2012).

Os dispositivos de entroncamento utilizados na geração de microbolha são o sistema de entroncamento em forma de cofluxo (*coflow*), fluxo focado (*flow focusing*) axiométrico e planar e os entroncamentos de fluxo cruzados (*cross flow*) *T-junction* e *Y-junction*.

No sistema cofluxo (*coflow*), os canais da fase líquida e gasosa são alinhados paralelamente, onde o fluxo do líquido é conduzido no canal externo e o fluxo de gás conduzido no canal interno. A maior velocidade do fluxo do líquido realiza a constrição do fluxo do gás formando as microbolhas. Sob essas condições, a inércia líquida domina as forças de tensão superficial e viscosa ($Re > 1$) (SMITH, 1949; OGUZ; PROSPERETTI, 1993). A Figura 13 mostra a representação do sistema cofluxo.

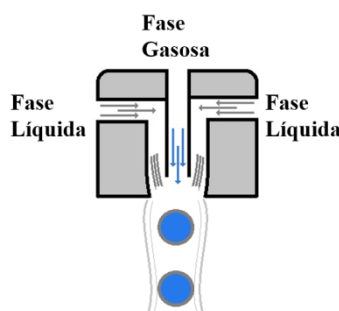


Figura 13 - Representação dos dispositivos de cofluxo.
Fonte: Autoria própria

Nos dispositivos de fluxo focado (*flow focusing*) axiométrico e planar, mostrado pela Figura 14, os canais da fase líquida são dispostos perpendicularmente à saída da fase gasosa, ambas as correntes de líquido e gás são forçadas a fluir através de uma estreita constrição de canal, localizado a jusante do canal de gás.

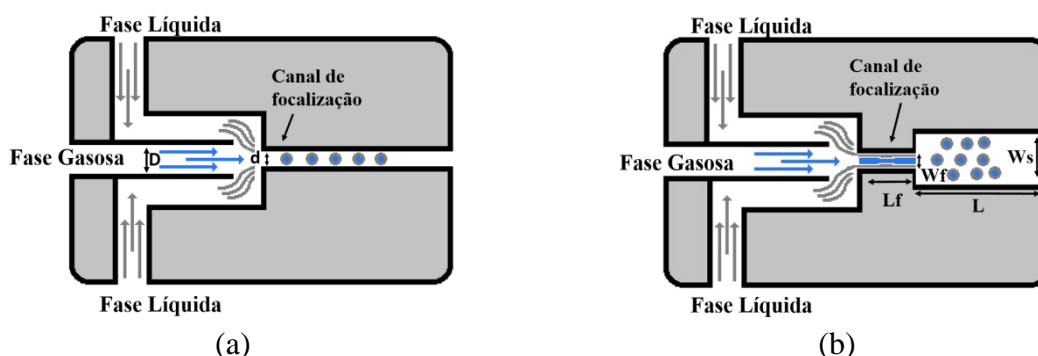


Figura 14 - Representação dos dispositivos de fluxo focado. Onde: (a) representa ao fluxo focado aximétrico e (b) o fluxo focado planar.

Fonte: Autoria própria

A presença da constrição, conhecida como canal de focalização, propicia à formação e conseqüentemente a redução do diâmetro da bolha pelo aumento do gradiente de pressão axial Gañán-Calvo & Gordillo (2001). Em sua implementação, um tubo cilíndrico de injeção de gás de diâmetro D é colocado a montante do canal de constrição de diâmetro d (formato retangular), onde $D > d$, e as bolhas monodispersas são produzidas simplesmente controlando a taxa de vazão gás-líquido para um determinado diâmetro de constrição d (GAÑÁN-CALVO; GORDILLO, 2001).

No entanto, o alinhamento do tubo cilíndrico e do canal retangular de saída não é simples. Esta limitação foi contornada por Anna et al. (2003) e Garstecki et al. (2004), que implementaram o mesmo tipo de geometria, mas em dispositivos planares. Possivelmente, a versão mais difundida de dispositivos de focalização de fluxo planar é aquela usada pela primeira vez por Anna et al. (2003) para gerar microemulsões, que posteriormente foi adaptada por Garstecki et al. (2004) para a geração de microbolhas (ANNA; BONTOUX; STONE, 2003; GARSTECKI et al., 2004). Neste arranjo geométrico retangular, o canal de focalização tem comprimento L_f maior que a largura do canal de constrição W_f , e menor que o comprimento L do canal de saída, a largura do canal de saída W_s é maior que a largura do canal de constrição W_f e a altura do canal de constrição e do canal de saída são iguais. Devido a esses parâmetros, as microbolhas são geradas e quase bloqueiam toda a seção transversal do canal de focalização. O aumento do gradiente de pressão axial no canal de focalização associada ao fluxo do líquido, forma películas extremamente finas de líquido entre a interface da bolha e as paredes do canal, aumentando a compressão do gás de forma a produzir um jato na saída do canal de focalização, de forma semelhante ao produzido pela técnica CEHDA (ANNA; BONTOUX; STONE, 2003; GARSTECKI et al., 2004).

Os entroncamentos de fluxo cruzados (*cross flow*) possuem uma das geometrias mais populares para gerar microbolhas usando um fluxo cruzado em *T-junction* (THORSEN et al., 2001). Nesta configuração, o gás é injetado perpendicularmente ao canal que transporta o líquido. A Figura 15 mostra os entroncamentos de fluxo cruzados.

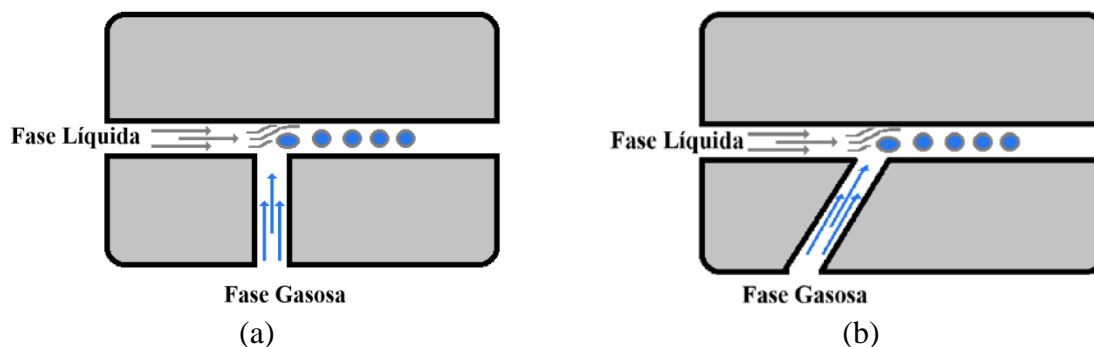


Figura 15 - Representação dos dispositivos de fluxo cruzado. Onde: (a) representa o sistema *T-junction* e (b) o sistema *Y-junction*.

Fonte: Autoria própria

O sistema *T-junction*, apresentado na Figura 15(a), é o sistema de entroncamento mais utilizado na produção das microbolhas; ele consiste numa junção em forma de T, onde a fase líquida é submetida em um canal perpendicular ao canal da fase gasosa, formando um ângulo de 90°. As microbolhas são geradas neste entroncamento e conduzidas para o canal de saída do dispositivo.

O sistema *Y-junction* é outro sistema, derivado do *T-junction*, apresentado na Figura 15 (b). No sistema *Y-junction*, a alimentação da fase líquida é feita a partir do canal superior e a alimentação da fase gasosa pelo canal inferior. Assim como no sistema *T-junction*, nesse sistema, o tamanho das microbolhas é determinado pelas variáveis da fase líquida e da fase gasosa.

Para uma determinada dinâmica (controle dos fluxos) são produzidas microbolhas monodispersas de tamanho uniforme (baixo índice de polidispersidade). O processo de estrangulamento para gerar as microbolhas depende diretamente da composição da fase líquida (responsável pela formação do revestimento da microbolha), da composição do gás, pressão, viscosidade da fase líquida e largura do canal de entrada da fase gasosa (FU et al., 2009). Nos entroncamentos de fluxo cruzados, as microbolhas podem ser produzidas em diversos tamanhos, dependendo da dinâmica do estrangulamento, processo pelo qual pode ser realizado alterando-se a velocidade do fluxo da fase líquida e do fluxo da fase gasosa (PANCHOLI et al., 2008; PANCHOLI; STRIDE; EDIRISINGHE, 2008).

A técnica de entroncamento de canal possui a menor variância de dispersão do tamanho das microbolhas geradas. Comparada às técnicas de Insonação e CEHDA, apresenta o processo de fabricação mais simples em comparação a CEHDA e não requer processo de filtragem, necessário para a técnica de insonação (STRIDE; EDIRISINGHE, 2008).

De acordo com Stride e Edirisinghe (2008, 2009), a técnica *T-junction* pode gerar microbolhas em uma única etapa, com índice de polidispersidade em torno de 1%, e menores custos operacionais. A Figura 16 apresenta as curvas de distribuição do diâmetro das microbolhas em relação à frequência para as três técnicas de geração mencionadas (insonação, CEHDA e entroncamento de canal do tipo *T-junction*). Pode ser observado que o menor índice de polidispersidade ocorre para a técnica de entroncamento de canal *T-junction* (STRIDE; EDIRISINGHE, 2008; STRIDE, 2009).

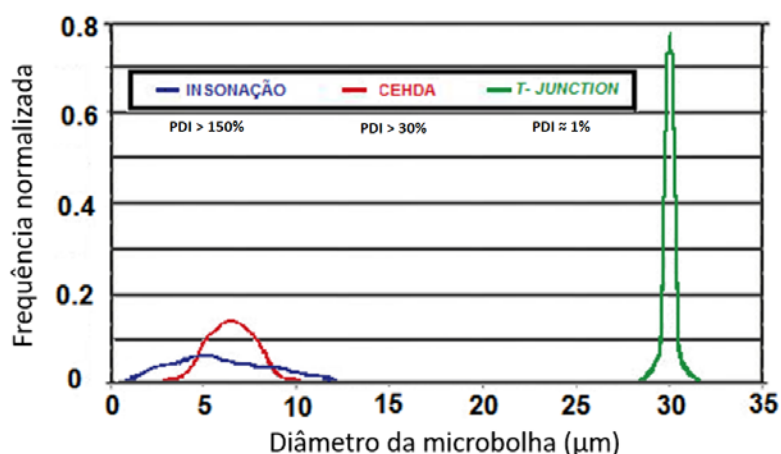
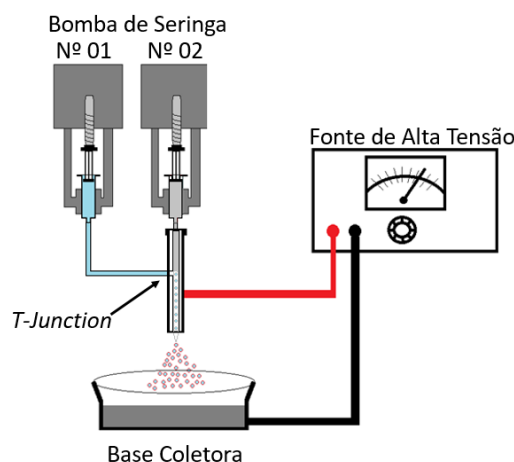


Figura 16 - Curvas de distribuição do diâmetro das microbolhas em relação à frequência para as técnicas de geração (insonação, CEHDA e *T-junction*).

Fonte: Adaptado de Stride e Edirisingher, 2009.

2.5.4 Técnicas de geração combinada

Em 2014 Parhizkar et al. desenvolveram um sistema de geração de microbolhas utilizando a combinação da técnica de entroncamento de canal *T-junction* e a técnica de atomização coaxial eletrohidrodinâmica (CEHDA), mostrada na Figura 17 (PARHIZKAR; STRIDE; EDIRISINGHE, 2014).



**Figura 17 – Técnica de geração combinada, *T-junction* associado à CEHDA.
Fonte: Autoria própria**

Este método apresenta inicialmente a geração das microbolhas pela técnica de entroncamento de canal *T-Junction*, onde são geradas as microbolhas monodispersas e conduzidas por um canal de escoamento até a saída. O canal de escoamento é envolvido por um cilindro metálico, alinhado coaxialmente de forma concêntrica, de forma análoga à técnica CEHDA. Na saída do canal é aplicado um campo elétrico entre o tubo externo (cilindro metálico) e uma base coletora aterrada. Quando o campo elétrico de intensidade suficiente é aplicado (diferença de potencial entre 6 a 21 kV) e exceder o limiar da tensão superficial do líquido, forma-se um cone (cone de Taylor) a partir do bocal do canal, de onde emerge um jato muito fino. Esse jato rompe-se formando microbolhas com dimensões menores que as geradas apenas pela técnica *T-junction*. O controle para gerar as microbolhas de forma contínua e uniforme depende da combinação do ajuste dos parâmetros da taxa de fluxo do gás, da taxa de fluxo do líquido, campo elétrico aplicado, viscosidade e tensão superficial do líquido (PARHIZKAR; STRIDE; EDIRISINGHE, 2014).

Nessa técnica combinada, a diferença de potencial elétrico aplicado foi entre 0 a 12 kV. A dimensão das microbolhas geradas sem a aplicação de potencial elétrico foi de 170 μm , geradas apenas pela técnica *T-junction*, e para a aplicação de diferença de potencial de 12 kV as dimensões das microbolhas foram reduzidas para 30 μm com índice de polidispersidade de 3,2% e taxa de produção de 1000 bolhas por segundo.

Jiang et al. (2016) desenvolveram um sistema de geração de microbolhas utilizando a combinação da técnica de entroncamento de canal *T-junction* associada a outro entroncamento de canal *T-junction*, alinhados em série e diâmetro do canal de 200 μm . A Figura 18 mostra a representação da técnica combinada (JIANG et al., 2016).

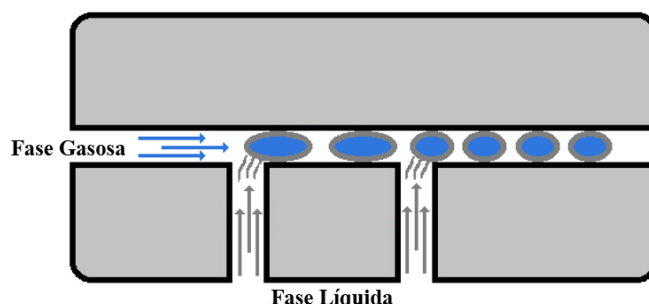


Figura 18 - Técnica de geração combinada duplo *T-Junction*.
Fonte: Autoria própria

Nesse método com dois *T-junction* associados em série, as microbolhas são geradas no primeiro entroncamento de canal *T-junction* e no segundo canal *T-junction*, as microbolhas sofrem uma alteração em suas dimensões de acordo com o fluxo de líquido constante, reduzindo a dimensão das microbolhas geradas pelo primeiro canal, além de proporcionar um aumento na taxa de geração das microbolhas. A taxa de produção das microbolhas geradas para um único *T-junction* foram de 282 microbolhas por segundo e com duplo *T-junction* foram de 464 microbolhas por segundo, para um fluxo constante de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ do líquido e fluxo de gás de 140 $\mu\text{l}/\text{min}$. Para um fluxo constante de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ do líquido e fluxo de gás de 200 $\mu\text{l}/\text{min}$, a taxa de produção para um único *T-junction* foi de 373 microbolhas por segundo e com duplo *T-junction* foi de 625 microbolhas por segundo. O aumento da taxa de produção utilizando o dispositivo de duplo *T-junction* foi de 64% e 40% respectivamente. Conforme o modelo proposto por Jiang et al. (2016), a inclusão de novos entroncamentos de canal *T-junction* dispostos em série, possibilita a redução das microbolhas geradas para dimensões de uso clínico, por exemplo, microbolhas com dimensões de 480 μm podem ser reduzidas para dimensões menores que 10 μm , utilizando 8 canais de entroncamento *T-junction* (JIANG et al., 2016).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo apresentam-se na Seção 3.1 a infraestrutura e instrumentação utilizada, que são: o dispositivo microfluídico de entroncamento, as micropipetas e o aparato experimental utilizado na geração das microbolhas. Na Seção 3.2 é mostrado o procedimento realizado para a obtenção da emulsão, a determinação do tamanho da microbolha e o estudo da estabilidade da microbolha na formação de microbolhas monodispersas.

3.1 INFRAESTRUTURA E INSTRUMENTAÇÃO

Para a realização desse trabalho foram utilizadas a Infraestrutura da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Campus Curitiba e a Infraestrutura do Instituto Federal de Santa Catarina – IFSC Campus Joinville.

No Campus Curitiba, Sede Centro, o Laboratório de Sensores Biomédicos e Dispositivos Semicondutores (LSBDS - UTFPR) foi o local utilizado inicialmente para a realização dos experimentos. Os equipamentos utilizados desse laboratório foram a câmera digital Hispec 5 (Fastec Imaging, San Diego, CA, EUA), a bomba de infusão para seringa modelo Mindray SK-500I (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics, Shenzhen, China), o cilindro de gás com capacidade de 3,6 L e os registros de pressão e vazão de precisão da Festo (Festo, Esslingen, Alemanha).

No Campus Curitiba, Sede Ecoville, o laboratório do Núcleo de Escoamento Multifásico (NUEM – UTFPR) foi utilizado para realização dos ensaios de viscosidade das emulsões com o equipamento viscosímetro rotativo Brookfield DV-E, e o laboratório do Núcleo de Manufatura Aditiva e Ferramental (NUFER – UTFPR) para o desenvolvimento do projeto dos protótipos microfluídicos em *software* SolidWorks (Dassault Systèmes, Vélizy, França) e impressão do dispositivo microfluídico na máquina de prototipagem rápida *Objet Eden 250* (Stratasys, Eden Prairie, MN, EUA).

No IFSC, Campus Joinville, o laboratório multidisciplinar foi utilizado para a continuidade da realização dos experimentos. Nesse laboratório, foi desenvolvido um sistema de iluminação a LED para a realização dos experimentos em alta taxa de produção e a utilização do microscópio modelo XJS-900T-PH (Nanjing Kozo Optical and Eletronical Instruments, Nanjing, China).

3.1.1 Dispositivo microfluídico de entroncamento de canal *T-junction*

Como método alternativo para reduzir a complexidade nos processos da microlitografia (litografia suave), neste trabalho utilizou-se a técnica de impressão 3D na fabricação dos dispositivos de microfluídica. A impressão 3D proporciona fabricar dispositivos microfluídicos em uma única etapa, reduzindo as etapas de construção realizadas na microlitografia; possibilita a construção de canais de seções circulares e não necessita de adaptações das interfaces dos microcanais para escala macroscópica, que são necessários na microlitografia. Devido a isto, reduz o custo operacional e a necessidade de diversos equipamentos.

Os dispositivos de entroncamento de canal *T-junction* desenvolvidos foram fabricados em uma máquina de prototipagem rápida *Objet Eden 250* (Stratasys, Eden Prairie, MN, EUA), usando a resina *Fullcure 720*, (Stratasys, Eden Prairie, MN, EUA). Esta resina é utilizada em especial para a fabricação de uma ampla variedade de protótipos rígidos, onde é necessária a visualização interna no protótipo. A Figura 19 (a) apresenta o projeto do dispositivo microfluídico desenvolvido com as especificações técnicas das dimensões externas do dispositivo, diâmetro interno (ID) e externo dos canais de entrada do gás, do líquido e do canal de saída. A Figura 19 (b) mostra em detalhe a representação do entroncamento do canal com a ponta da micropipeta inserida no dispositivo. E a Figura 19 (c) mostra o protótipo final do dispositivo microfluídico desenvolvido com a micropipeta incorporada (dispositivo híbrido).

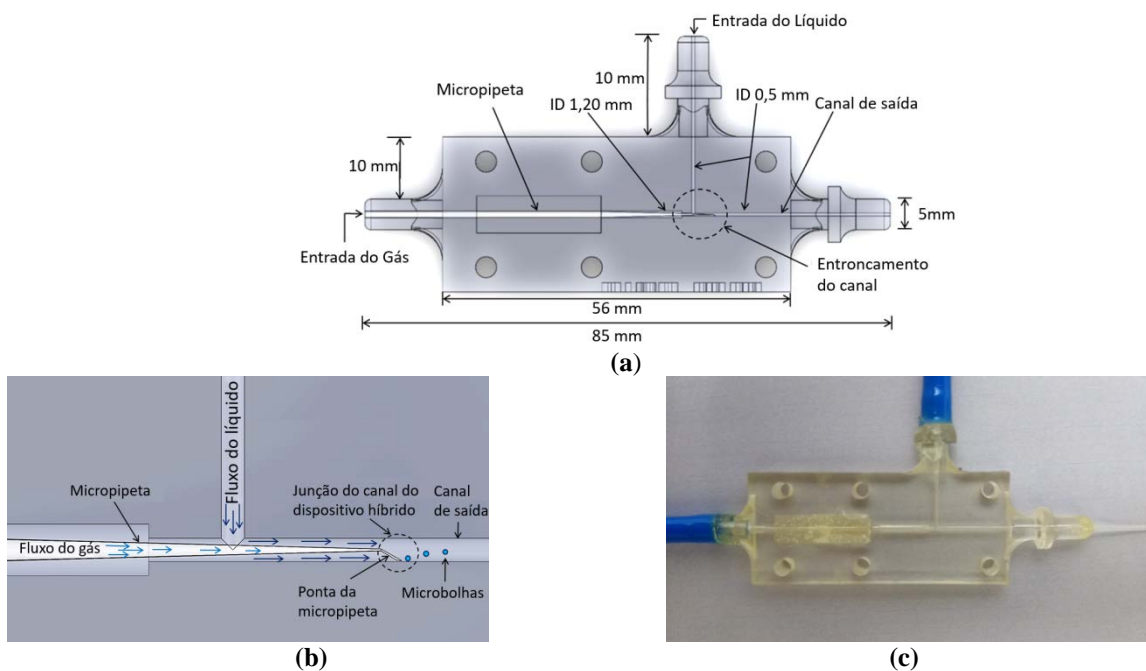


Figura 19 - Representação do dispositivo de microfluídica (a) projeto do dispositivo de entroncamento desenvolvido em impressora 3D, (b) representação do entroncamento do canal do dispositivo e (c) o protótipo do dispositivo microfluídico desenvolvido.

Fonte: Autoria própria.

O dispositivo híbrido de microfluídica (dispositivo com a micropipeta inserida) apresenta um diâmetro hidráulico de 0,5 mm (ID) para o canal de condução de saída (canal a direita do entroncamento T invertido), sendo esta a mesma medida para o canal de alimentação da fase líquida (canal superior). Na extremidade à esquerda, observa-se o canal de alimentação da fase gasosa, com diâmetro hidráulico inicial de 1,2 mm (ID) e aproximando do entroncamento T, seu diâmetro é reduzido para 0,5 mm. Os diâmetros externos dos canais de condução da fase líquida, gasosa e saída do dispositivo de 5,0 mm foram especificados para o acoplamento de mangueiras hidráulicas com diâmetro interno equivalente.

A micropipeta é inserida neste dispositivo e fixada inicialmente com adesivo à base de éster de cianoacrilato flexível e posteriormente selado com adesivo bicomponente à base de resina de epóxi. As mangueiras de poliuretano também são fixadas com este mesmo adesivo.

Este protótipo foi o modelo que apresentou os melhores resultados em relação à robustez e adaptação aos diversos modelos de micropipetas, utilizadas para a geração das microbolhas. A Figura 20 apresenta outros protótipos desenvolvidos e testados, onde: (a) apresenta o protótipo do dispositivo microfluídico modular com micropipeta inserida em ponteira para pipeta, (b) mostra o protótipo do dispositivo microfluídico em formato *Y-junction* e (c) mostra o dispositivo microfluídico em formato *T-junction* de dimensões reduzidas.

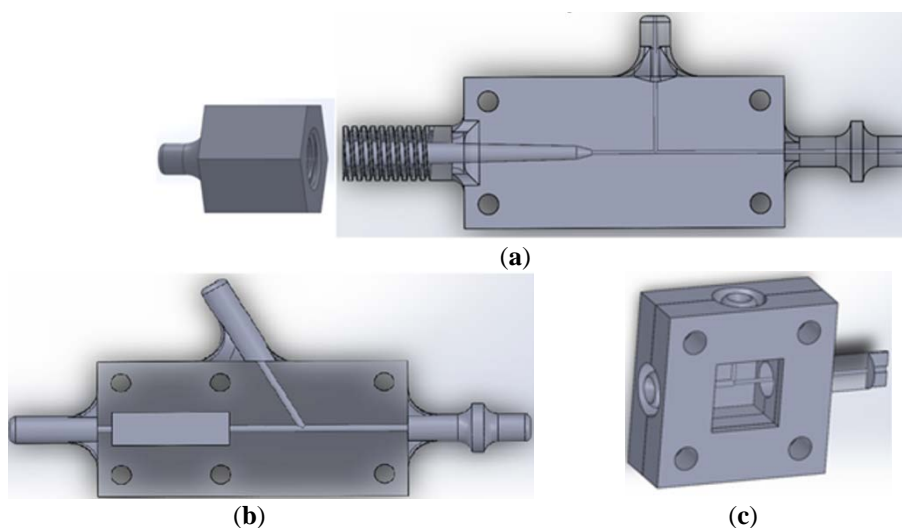


Figura 20 - Modelos de dispositivos desenvolvidos e testados: (a) dispositivo móvel com micropipeta inserida em ponteira de pipeta, (b) dispositivo em *Y-junction* e (c) dispositivo em *T-junction* de dimensões reduzidas.

Fonte: Autoria própria.

3.1.2 Micropipetas

O projeto e a fabricação dos dispositivos microfluídicos de entroncamento foram definidos conforme o formato e as dimensões de cada micropipeta. A Figura 21 (a) mostra uma representação de uma micropipeta de uso clínico com comprimento, diâmetro externo da base e diâmetro interno da ponta da micropipeta. A Figura 21 (b) mostra em detalhe o ângulo de inclinação da ponta da micropipeta em relação ao eixo longitudinal, o comprimento da ponta e o diâmetro interno da micropipeta em detalhe.

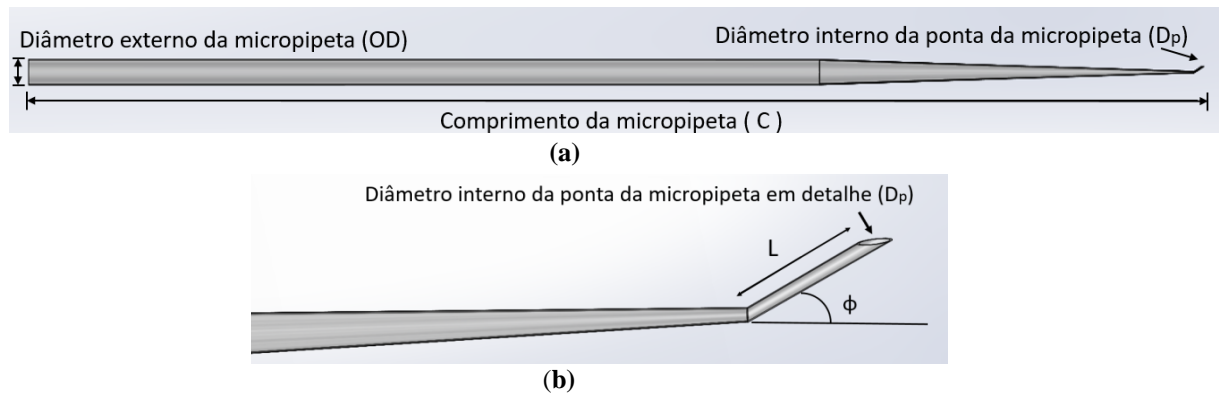


Figura 21 - Representação de uma micropipeta de uso clínico, onde: (a) mostra a micropipeta com o comprimento, diâmetro externo da base e diâmetro interno da ponta e (b) mostra o ângulo de inclinação, comprimento da ponta e diâmetro interno da micropipeta em detalhe.

Fonte: Autoria própria.

Onde, OD é o diâmetro externo da base da micropipeta, D_p é o diâmetro interno da ponta, Φ é o ângulo formado pela ponta e o eixo longitudinal, L é o comprimento da ponta e C o comprimento total da micropipeta.

A Tabela 1 mostra os modelos de micropipetas utilizados nos testes de geração das microbolhas, suas dimensões e fabricante.

Tabela 1 - Micropipetas utilizadas na geração de microbolhas.

Modelo	C(mm)	L (mm)	OD (mm)	D_p (μ m)	Φ ($^\circ$)	Fabricante
MIC-SLM-30 *	55	0,5	1,0	11 e 4,6	30	Origio
MIC-50-30 *	55	0,5	1,0	9 e 5,6	30	Origio
MSC-20-30	57	0,5	1,0	20	30	Origio
MAH-SM-30	57	0,5	1,0	9	30	Origio
MBB-BP-L-30	57	0,5	1,0	40	30	Origio

*Ponta com formato bisel

Os modelos das micropipetas do fabricante Origio apresentam ponta em formato cilíndrico e ângulo de inclinação de 30°, sendo que nos modelos MIC-SLM-30 e MIC-50-30 apresentam a ponta em formato tipo bisel, como mostra a Figura 22.

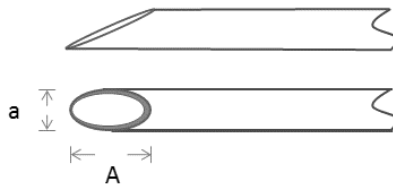


Figura 22 - Micropipeta com ponta no formato bisel.

Fonte: Autoria própria.

Onde a é o diâmetro interno menor e A é o diâmetro interno maior da micropipeta.

3.1.3 Composição da emulsão

As emulsões são dispersões de duas fases líquidas imiscíveis entre si, neste caso, óleo e água (O/A), sendo estabilizadas pela presença de agentes emulsivos, localizados na interface óleo-água. A fase dispersa da emulsão é composta pelo óleo de girassol e emulsificante e a fase contínua pela água deionizada. Os emulsificantes (tensoativo) biocompatíveis utilizados na emulsão foram o polissorbato 80, lecitina de soja e o mono e diglicerídeos.

O óleo de girassol (*Helianthus annuus L. Asteraceae*) foi escolhido como uma alternativa viável para revestir as microbolhas visando futuras aplicações clínicas, utilizado como matriz lipídica, 100% pura e natural, extraído mediante a prensagem a frio das sementes, filtrada e refinada. Formado por ácidos graxos insaturados (oleico e principalmente o linolênico) possui a característica de dissolver e eliminar excesso de colesterol do organismo, assegurando as características das propriedades reguladoras nas doenças cardiovasculares, além de auxiliar na cicatrização de ferimentos (NIKOLAEVSKII; FILIPPENKO; SERGOVSKAYA, 1980). Possui uma coloração amarela clara e quase inodora. Apresenta uma densidade (ρ) de 0,945 g/cm³, viscosidade dinâmica (η) de 0,314 mPa.s, e ponto de congelamento de -17 °C. O uso de matrizes lipídicas para o revestimento das microbolhas foi atestado pelos estudos de (BORDEN; LONGO, 2002; UNGER et al., 2004).

O polissorbato 80 é um agente tensoativo derivado do sorbitol, não iônico, emulsificante, estabilizante, solubilizante e umectante (LIANG et al., 2010). De forma líquida oleosa e coloração âmbar, suas moléculas possuem um carácter anfifílico, que alteram as propriedades

interfaciais e superficiais de um líquido diminuindo a tensão superficial entre eles, desempenhando a capacidade de se acumularem na interface entre dois líquidos ou na superfície de um líquido. Possuem uma estrutura composta por uma parte polar (hidrofílica) e uma parte apolar (hidrofóbica) e interage com as moléculas da 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, mostrado na Figura 23.

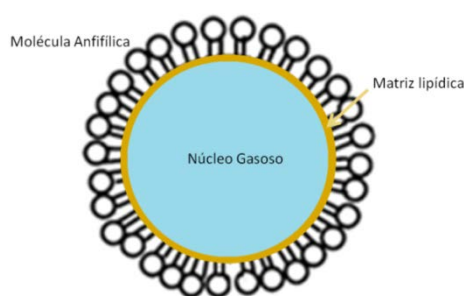


Figura 23 - Estrutura de duas camadas da Microbolha (matriz lipídica + tensoativo)
Fonte: Autoria própria.

A lecitina é um emulsificante composto por um grupo de fosfatídeos, extraídos da gema de ovo, da soja e do gérmen de trigo. Apresenta-se, em geral, sob o estado pastoso e de cor castanha clara ou escura. Possui características que auxiliam no tratamento para distúrbios de memória e doença de Alzheimer. A lecitina também possui ação redutora do colesterol e triglicérides, diminuindo o risco de doenças cardiovasculares (SHEN; POWELL; LONGO, 2008; EH SUK; MISRAN, 2017).

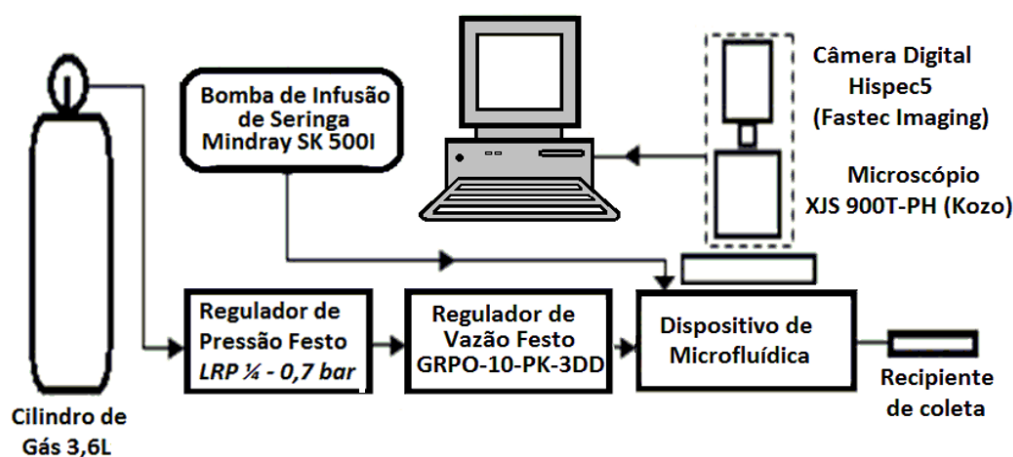
Mono e diglicerídeos são produtos resultantes da esterificação de ácidos graxos destilados, composto por éster de glicerol e ácidos graxos. Também possuem as propriedades de emulsão, suspensão, homogeneização e estabilidade. No Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares encontra-se inserido com o código INS 471. Apresenta-se como pó de cor clara, não incorpora odores desfavoráveis em emulsões alimentícias (ZONG; RAMANATHAN; CHEN, 2010; AMARA et al., 2014; VALLDEPERAS et al., 2016).

A utilização de um agente tensoativo (emulsificante) propicia o aumento da estabilidade das microbolha pela diminuição da perfusão do gás com o ambiente externo. Moléculas fosfolipídicas e de ácidos graxos podem ser usadas para realizar a mesma função do polissorbato 80, uma vez que possuem características anfifílicas semelhantes. Emulsões com baixas concentrações (menor que 15%) da fase dispersa (óleo associado a emulsificantes dispersos em água) podem ser consideradas como fluidos newtonianos (URDAHL; FREDHEIM; LOKEN, 1997).

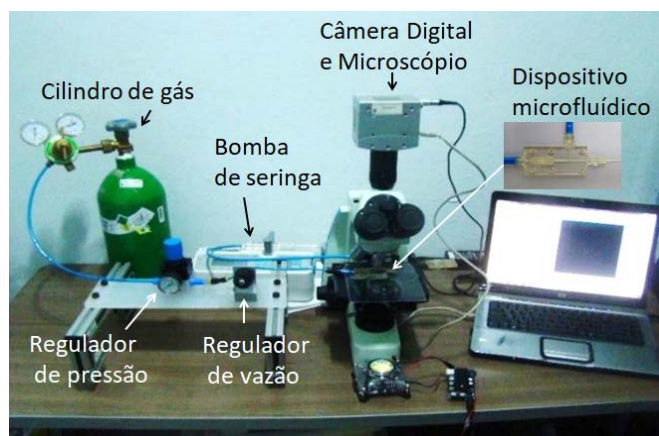
3.1.4 Aparato experimental

O diagrama do aparato experimental utilizado, na geração de microbolhas para os experimentos para avaliar a eficácia de cada modelo de micropipeta na geração das microbolhas e menor índice de polidispersidade é mostrado na Figura 24 (a) e a imagem real do aparato experimental na Figura 24 (b). A fase gasosa foi fornecida por um cilindro de gás com capacidade de 3,6 L com manômetro mecânico acoplado em sua saída, pressão máxima de 15 bar. O cilindro foi preenchido com um gás em uma composição aproximada de 30% de oxigênio e 70 % de nitrogênio. O controle da fase gasosa é por meio da válvula reguladora de pressão de precisão modelo LRP ¼ - 0,7 da Festo (Festo, Esslingen, Alemanha), com pressão de entrada máxima de 12 bar e pressão máxima de saída de 0,7 bar acoplado a um manômetro mecânico, possibilitando assim realizar uma leitura simplificada, durante os ajustes necessários de correção do fluxo gasoso e de uma válvula reguladora de fluxo de precisão modelo GRPO-10-PK-3DD Festo, sendo os dois reguladores de ajuste manual por manopla giratória com escala. Por fim, estes reguladores são conectados ao dispositivo de entroncamento microfluídico.

O controle da vazão da fase líquida (conectado também ao dispositivo) foi realizado por meio de uma bomba de infusão para seringa modelo Mindray SK-500I (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics, Shenzhen, China). O fluxo é ajustado digitalmente de 0,1 mL/h até 500 mL/h, utilizando seringas de 10 mL, 20 mL e 50 mL.



(a)



(b)

Figura 24 – Aparato experimental utilizado na geração de microbolhas, onde: (a) Diagrama do aparato experimental e (b) Imagem real do aparato experimental.

Fonte: Autoria própria.

As imagens das microbolhas geradas no dispositivo híbrido de microfluídica são capturadas utilizando um microscópio modelo XJS-900T-PH (Nanjing Kozo Optical and Eletronical Instruments, Nanjing, China), acoplado a uma câmera digital Hispec 5 (Fastec Imaging, San Diego, CA, EUA) com resolução máxima de 1696x1710 pixels em 523 *frames* por segundos. As imagens são armazenadas inicialmente na câmera e posteriormente enviadas a um computador para o processamento.

A realização dos experimentos para determinar a geração das microbolhas em alta taxa de produção, foi utilizada o aparato experimental da Figura 24, com a inclusão do manômetro digital de pressão modelo BX-DPG606 (Shangai Benxu Eletronics Technology, Shangai, China) de faixa de medição de 0 a 16 bar e precisão de 0,25% FE (fundo de escala) entre o regulador de vazão e o dispositivo microfluídico e a substituição da válvula reguladora de pressão para o modelo LRP ¼ - 4 da Festo, com entrada máxima de 12 bar e pressão máxima de saída de 4 bar.

Para a interligação dos equipamentos foram utilizadas conexões e mangueiras de poliuretano (mangueira pneumática). Após a geração, as microbolhas foram coletadas em um recipiente contendo água deionizada.

3.1.5 Determinação do tamanho das microbolhas

Para avaliar o diâmetro das microbolhas geradas pelo dispositivo microfluídico híbrido, foram realizados dois processos de análise. O primeiro compreende os experimentos para avaliar a eficácia de cada modelo de micropipeta na geração e menor índice de polidispersidade

das microbolhas geradas e, o segundo processo, para a análise da geração em elevada taxa de fluxos de líquidos e gás.

Nos experimentos para avaliar a eficácia de geração e menor índice de polidispersidade das microbolhas, para cada modelo de micropipeta, foi desenvolvida no Núcleo de Escoamento Multifásico (NUEM – UTFPR) uma ferramenta de processamento de imagem para automatizar medições do diâmetro das microbolhas a partir de um vídeo de alta velocidade, utilizando o programa computacional Matlab. O *software* desenvolvido analisa as imagens capturadas pela câmera digital, e a determinação do diâmetro das microbolhas é realizada através da segmentação das imagens com o uso de técnicas subtrativas (uma imagem de referência sem microbolha é subtraída de uma imagem em análise). A imagem segmentada apresenta a região da microbolha com pixels brancos em fundo escuro. O número de pixels é contado automaticamente para cada região fechada de modo a definir a área por meio da contagem de pixels, e consequentemente, o diâmetro da microbolha em pixel pela área definida. Após determinado o diâmetro da microbolha em pixel, é realizada a conversão do diâmetro da microbolha para micrometro, através da utilização da régua micrométrica. A Figura 25 mostra a régua com escala micrométrica utilizada para determinar o diâmetro da microbolha.

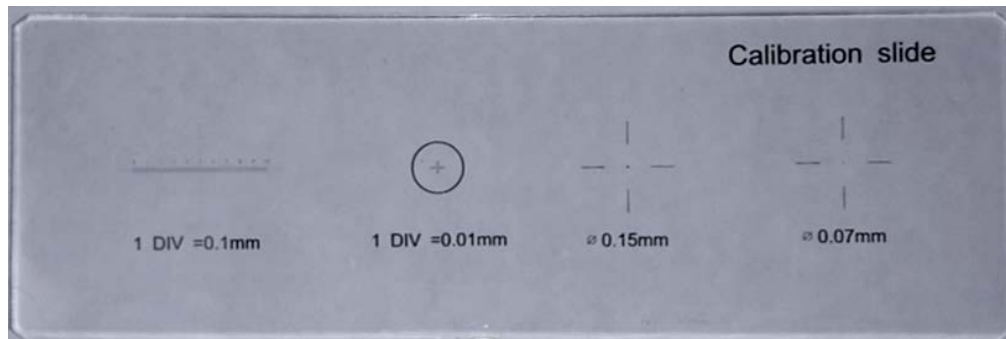


Figura 25 – Imagem da régua com escala micrométrica.
Fonte: Autoria própria.

A definição dos parâmetros de pixel por unidade de micrometro foi necessária para determinar o diâmetro da microbolha a partir da relação micrometro/pixel. A Tabela 2 mostra a relação pixel por micrometro para as objetivas de 4,3X e 10X, utilizadas para a análise da estabilidade das microbolhas, e a objetiva de 20X, para a determinação do diâmetro na geração das microbolhas.

Tabela 2 - Parametrização do diâmetro das microbolhas pelo número pixel correspondente para cada micrometro.

Objetiva	Nº de pixel	Total de μm	Relação $\mu\text{m}/\text{pixel}$
4,3X	1696	3500	2,08
10X	1696	1372	0,81
20X	1696	670	0,40

Após o processamento das imagens, o *software* gera um gráfico da distribuição do diâmetro em relação ao número de eventos (microbolhas isoladas) e a estatística dos resultados do tamanho médio da microbolha, desvio padrão, PDI e número total de bolhas geradas.

Além do processamento da imagem no programa desenvolvido, o diâmetro da microbolha monodispersa gerada pode ser observado a partir do uso da câmera digital acoplada ao microscópio e da régua micrométrica na escala de 1 DIV/10 μm . Foi desenvolvido um aparato de silicone para conduzir a microbolha do dispositivo de microfluídica até a régua micrométrica. A Figura 26 mostra o aparato desenvolvido para visualizar o diâmetro da microbolha utilizando a régua micrométrica. O microscópio com a câmera digital acoplada está posicionado acima da placa de petri contendo a régua micrométrica.

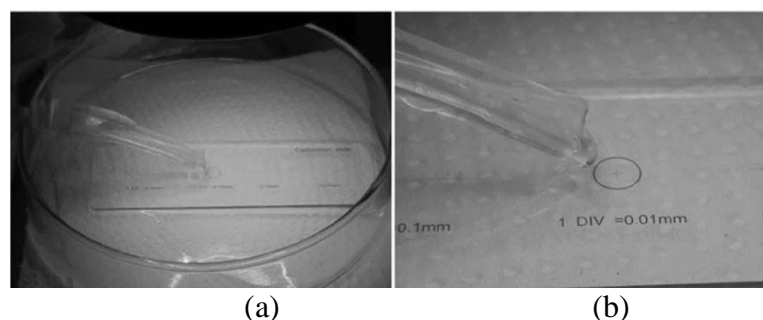


Figura 26 - Aparato desenvolvido para visualizar o diâmetro da microbolha. Onde (a) é a imagem do aparato sobre a placa de petri contendo a régua micrométrica e (b) a imagem ampliada do aparato e escala de 1 DIV/10 μm da régua micrométrica.

Para os experimentos de geração das microbolhas no dispositivo microfluídico híbrido em elevada taxa de fluxos de líquidos e gás, foi desenvolvida no Laboratório de Sensores Biomédicos e Dispositivos Semicondutores (LSBDS - UTFPR) uma ferramenta de processamento de imagem para automatizar medições do diâmetro das microbolhas a partir de vídeo de alta velocidade, utilizando o programa computacional Matlab. O software desenvolvido analisa as imagens capturadas pela câmera digital durante a coleta das microbolhas geradas e a determinação do diâmetro das microbolhas é realizada por meio de um sistema de detecção de objetos

circulares por meio da transformada de Hough. A Figura 27, mostra o procedimento de aquisição das microbolhas durante a coleta em placa de petri, onde a área em destaque (quadrado vermelho) é a região de análise utilizada na detecção dos objetos circulares.

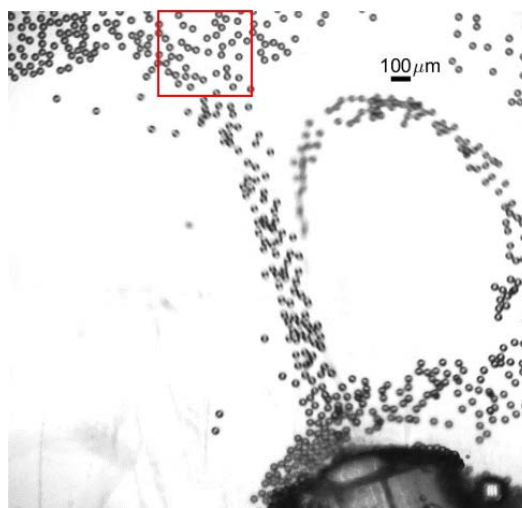


Figura 27 - Aquisição das microbolhas durante a coleta das microbolhas geradas pelo dispositivo microfluídico em alta taxa de produção.

Fonte: Autoria própria.

O *software* desenvolvido verifica a imagem capturada e realiza a detecção de objetos circulares, contornando as microbolhas conforme o ajuste dos parâmetros adotados. O ajuste é realizado para capturar a maior quantidade de microbolhas na região de análise, sendo limitadas pela não ocorrência de sobreposição de imagens circulares e a sensibilidade da detecção da borda devido ao foco da imagem. A Figura 28 mostra uma imagem após o processamento pelo *software* de detecção de objetos circulares através da transformada de Hough.

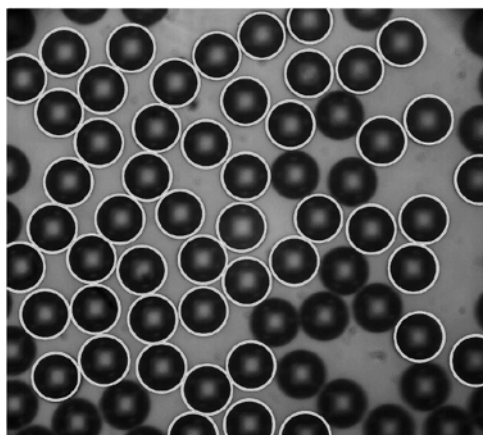


Figura 28 – Imagem da região de análise após o processamento do sistema de detecção de objetos circulares através da transformada de Hough.

Fonte: Autoria própria.

Após o processamento das imagens, o *software* gera um gráfico da distribuição do diâmetro em relação ao número de eventos (microbolhas isoladas) e a estatística dos resultados do

tamanho médio das microbolhas, desvio padrão, PDI e número total de bolhas de cada imagem. A definição dos parâmetros de pixel por unidade de micrometro para este experimento foi utilizando a objetiva de 20X.

3.1.6 Estudo da estabilidade da microbolha

Para a análise da estabilidade das microbolhas foi utilizado o dispositivo de microfluídica híbrido com a micropipeta MIC-SLM-30. Os experimentos foram divididos em três seções, sendo a primeira com a emulsão composta pela fase dispersa de óleo de girassol (O_{LG}) e emulsificante polissorbato 80 (T_{T80}), a segunda composta por óleo de girassol e emulsificante polissorbato 80 associado ao emulsificante lecitina de soja (T_{LS}) e a terceira com a fase dispersa composta por óleo de girassol e emulsificante polissorbato 80 associado ao emulsificante mono e diglicerídeos (T_{MD}). Para todas as emulsões, a fase contínua utilizada foi a água deionizada (H_2O_{DEI}) e proporção de massa (P_{PM}) de 97:3, ou seja, 3 g de fase dispersa (óleo e emulsificante) para 97 g de fase contínua (água deionizada), totalizando 100 g de emulsão, mantendo a concentração mássica para todos os experimentos. Os experimentos de estabilidade foram orientados para que a fase dispersa mantivesse a relação de proporção de massa constante em referência a fase contínua, mantendo assim, a relação proporcional para uma análise de revestimento sem a alteração do percentual de fase dispersa em relação à fase contínua.

Os ajustes da vazão da fase líquida (Q_L) e vazão da fase gasosa (Q_G), para os experimentos realizados nestas três seções, foram ajustados conforme a necessidade de se manter um determinado tamanho de microbolha (diâmetro equivalente) próximo de 25 μm , para que a posterior fosse possível realizar um comparativo da estabilidade devido à alteração da composição do revestimento da microbolha.

As amostras das microbolhas geradas foram recolhidas num aparato de acrílico com formato de paralelepípedo de 25 mm de comprimento, 5 mm de largura e 3 mm de altura contendo uma cavidade cilíndrica de diâmetro de 1,2 mm, dentro de uma placa de vidro plano (placa de petri) com diâmetro de 55 mm e altura de 10 mm contendo água deionizada. Foram obtidas imagens das amostras no intervalo de tempo de 1 segundo (1 *frame* por segundo) utilizando a câmera digital Hispec 5 acoplada a um microscópio modelo XJS-900T-PH com lentes objetivas de 4,3X e 10X de ampliação. As imagens são armazenadas na câmera e posteriormente enviadas para um computador para o processamento. A Figura 29 mostra uma sequência

das imagens do procedimento realizado para determinar a curva de estabilidade da população das microbolhas.

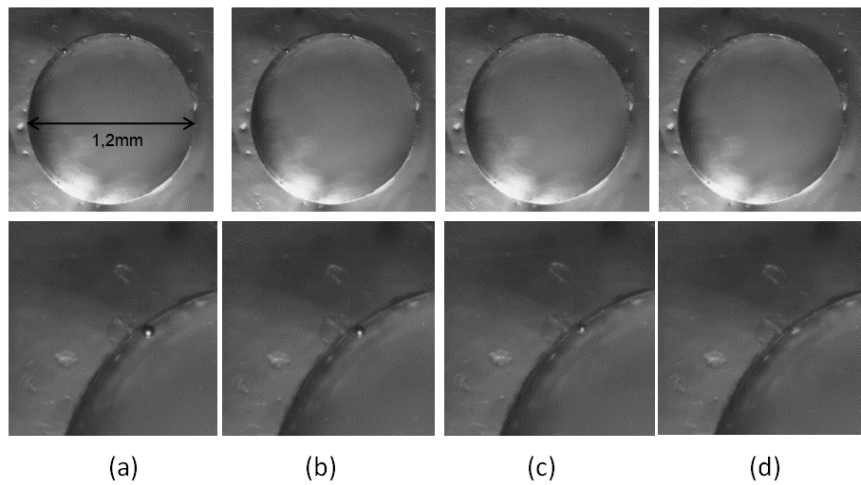


Figura 29 – Sequência de imagens para determinar a curva de estabilidade da população de microbolhas.

Fonte: Autoria própria.

Nesta seqüência de imagens temos a imagem real captada (parte superior) e a imagem da microbolha ampliada para visualização (parte inferior), sendo: (a) a microbolha monodispersa captada pelo aparato desenvolvido em seu tamanho inicial, (b) o tamanho da microbolha depois de 5 segundos, (c) o tamanho da microbolha após 10 s e em (d) o aparato após a dissolução da microbolha.

As microbolhas são analisadas individualmente através de uma ferramenta de processamento de imagem utilizando o programa computacional Matlab. A Figura 30 mostra o procedimento de mensurar o diâmetro da microbolha monodispersa para levantamento da curva de estabilidade.

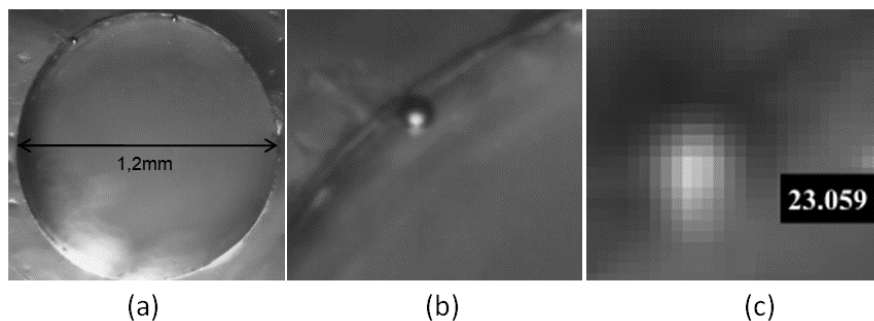


Figura 30 - Captação e processamento do diâmetro da microbolha monodispersa para a curva de Estabilidade.

Fonte: Autoria própria.

Neste procedimento, a curva de estabilidade das microbolhas monodispersas é mensurada individualmente, onde: (a) imagem da cavidade de captura da microbolha monodispersa mostrando seu diâmetro, (b) imagem ampliada da microbolha para visualização e (c) imagem da microbolha com o diâmetro em pixel. O processamento é realizado e cada diâmetro mensurado de acordo com a relação de micrometro por pixel, definido pela utilização da régua micrométrica, conforme a Tabela 2.

Depois de realizados a captura das microbolhas para cada etapa de emulsão, as imagens são processadas para a elaboração das curvas de estabilidade das microbolhas.

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O procedimento experimental foi dividido em subseções, onde apresentamos a composição e preparo da emulsão utilizada; a geração de microbolhas em baixo fluxo, a geração de microbolhas em elevada taxa de produção e os testes de estabilidade das microbolhas.

3.2.1 Emulsão de matriz lipídica

A composição da emulsão para os experimentos de geração foi de 98 g de água deionizada, 1 g de óleo de girassol e 1 g de emulsificante Polissorbato 80, estabelecendo uma proporção de massa de 98: 1: 1, densidade (ρ) de 1 g/cm³, viscosidade (η) igual a 1,17 mPa.s, valor obtido utilizando um viscosímetro rotativo Brookfield DV-E a 21°C e pressão atmosférica local aproximada de 91 kPa. A tensão superficial do fluido (γ) foi de 0,063 N/m, mensurada através da lei de Tate. Para determinar a tensão superficial pela lei de Tate, foram realizados 10 experimentos com 50 gotas em cada experimento, utilizando agulha 30G 1/2 acoplada à seringa de vidro.

O processo de preparo da emulsão consistiu na pesagem de cada material e inseridos em tubo erlenmeyer de 100 ml, para a realização da mistura, onde a emulsão foi aquecida até atingir a temperatura de 40 °C e agitada com um homogeneizador comum com rotação de aproximadamente 5.000 RPM. Após atingir a temperatura de 40°C, a homogeneização permaneceu por mais 5 minutos e deixada em repouso por 24 horas para a redução da espuma formada. Os testes experimentais com a emulsão foram realizados em um intervalo de 24 a 72 horas após o preparo da emulsão.

3.2.2 Experimentos de geração de microbolhas com baixo índice de polidispersidade e diâmetro das microbolhas com dispositivo microfluídico híbrido

Foram realizados testes de geração com as micropipetas da Tabela 1, considerando a geração contínua das microbolhas e índice de polidispersidade (PDI) em diferentes fluxos de líquido e gás. O controle dos fluxos da fase líquida e da fase gasosa foi ajustado de modo a obter microbolhas de menor diâmetro e menor taxa de dispersão para cada modelo de micropipeta utilizada.

Alguns modelos de micropipetas da Origio apresentaram instabilidade na geração, como por exemplo, a descontinuidade na produção das microbolhas em fluxo contínuo e alto índice de polidispersidade (valores acima de 10%). As micropipetas que apresentaram melhores resultados na geração de microbolhas com baixo índice de polidispersidade (PDI) são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 - Tabela das micropipetas com melhores resultados.

Modelo	D_p (μm)	Fabricante
MIC-SLM-30 *	11 e 4,6	Origio
MSC-20-30	20	Origio
MBB-BP-L-30	40	Origio

Os experimentos de geração foram realizados utilizando as micropipetas MIC SLM-30, MSC-20-30 e MBB-BP-L-30. A Figura 31 mostra a geração de microbolhas monodispersas utilizando micropipeta inserida em dispositivo microfluídico (dispositivo híbrido).



Figura 31 – Imagem da geração de microbolhas monodispersas utilizando uma micropipeta inserida em dispositivo microfluídico (dispositivo híbrido).

Fonte: Autoria própria.

O controle do fluxo da fase líquida e do fluxo da fase gasosa foi ajustado de modo a obter microbolhas de menor diâmetro e menor taxa de dispersão para cada modelo de micropipeta utilizada.

Nos experimentos de geração com a micropipeta MBB-BP-L-30, foi ajustada uma vazão da fase líquida (Q_L) de 0,13 ml/min e um fluxo da fase gasosa (Q_G) de 10,88 nl/min. O número de Reynolds (Re) encontrado foi de 0,047, o número capilar (Ca) de 0,002 e velocidade do líquido (U_l) de 1,103 cm/s. As imagens foram capturadas ao longo de um período de 59 s, a uma taxa de 150 *frames* por segundo (fps), obtendo um total de 107 microbolhas geradas com tamanho médio de 57,70 μm .

Para os experimentos com a micropipeta MSC-20-30, o ajuste da vazão da fase líquida (Q_L) foi de 0,16 ml/min e para a vazão da fase gasosa (Q_G) de 3,28 nl/min. O número de Reynolds (Re) encontrado foi de 0,058, o número capilar (Ca) de 0,002 e velocidade do líquido (U_l) de 1,358 cm/s. As imagens foram capturadas ao longo de um período de 66 s, a uma taxa de 100 fps, para um total de 104 microbolhas geradas com tamanho médio de 57,70 μm .

Por fim, para a micropipeta MIC SLM-30, com ajuste da vazão da fase líquida (Q_L) de 0,130 ml/min e uma vazão da fase gasosa (Q_G) de 0,165 nl/min. O número de Reynolds (Re) encontrado foi de 0,047, o número capilar (Ca) de 0,002 e velocidade do líquido (U_l) de 1,103 cm/s. As imagens foram capturadas ao longo de um período de tempo de 100 s, a uma taxa de 150 fps, e um total de 117 microbolhas geradas com tamanho médio de 16,55 μm .

O desvio da técnica para mensurar o diâmetro médio das microbolhas, realizada através da segmentação das imagens com o uso de imagens subtrativas, foi realizado através da medição do tamanho médio por processo visual, utilizando a régua micrométrica em comparação com o tamanho médio medido pelo software desenvolvido, o valor encontrado foi de 0,82% para 20 microbolhas medidas.

As imagens das microbolhas geradas nestes experimentos foram capturadas utilizando a câmera digital Hispec 5 acoplada ao microscópio XJS-900T-PH com lentes objetivas de 20X de ampliação. As imagens capturadas são armazenadas na memória interna da câmera e posteriormente enviadas ao computador para o processamento.

3.2.3 Experimentos de geração de microbolhas em elevada taxa de fluxo de líquidos e fluxo de gás com dispositivo microfluídico híbrido

Para realizar os experimentos de produção das microbolhas com o dispositivo microfluídico híbrido em elevada taxa de fluxo de líquido e gás, foram realizados dois experimentos utilizando a micropipeta MIC-SLM-30. A vazão do líquido foi ajustada para $Q_L = 1,55$ ml/min

e a pressão do gás em $P_G = 1,04$ bar. A Figura 32 mostra o canal de saída do dispositivo microfluídico híbrido em alta taxa de produção de microbolhas monodispersas. Neste processo, foi capturado um total de 5774 imagens a uma taxa de 2000 fps. A estimativa da produção de microbolhas foi realizada através da média de 10 amostras com 100 *frames*, o número de microbolhas foi mensurado frame a frame em determinado percurso do canal de saída, ou seja, a cada 100 frames um total aproximado de 90 bolhas mensuradas em cada amostragem. A produção total estimada foi de 1800 bolhas por segundo. O número de Reynolds (Re) encontrado foi de 0,562, o número capilar (Ca) de 0,021 e velocidade do líquido (U_l) de 1,316 cm/s.

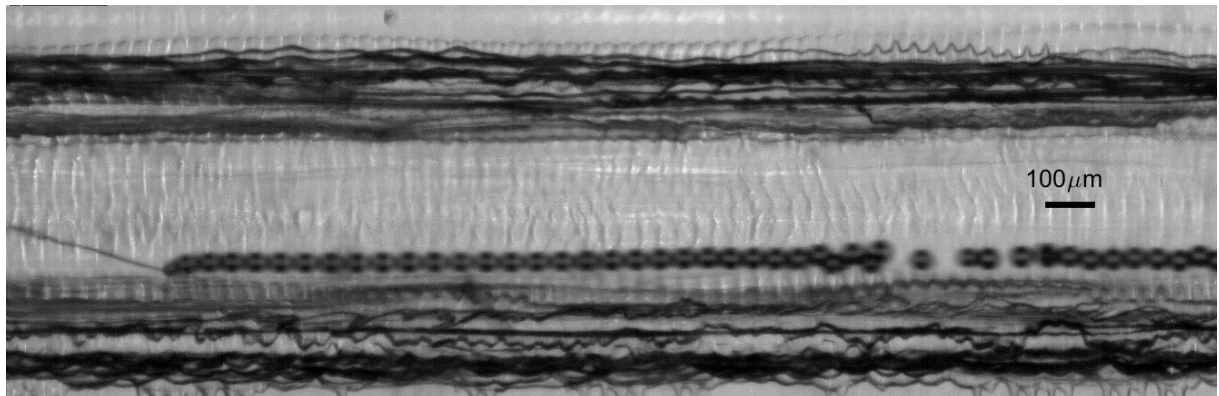


Figura 32 – Geração das microbolhas com dispositivo microfluídico híbrido, produzindo aproximadamente 1800 bolhas por segundo, com pressão do gás em 1,04 bar e vazão do líquido em 1,55 ml/min. Fonte: Autoria própria.

Após a geração, as microbolhas foram coletadas em uma placa de petri, como mostrado na Figura 27, onde cada experimento foi realizado durante 4 segundos a uma taxa de 400 fps, com produção aproximada de 7200 microbolhas. A Figura 33 mostra uma parte das imagens das microbolhas para cada experimento realizado.

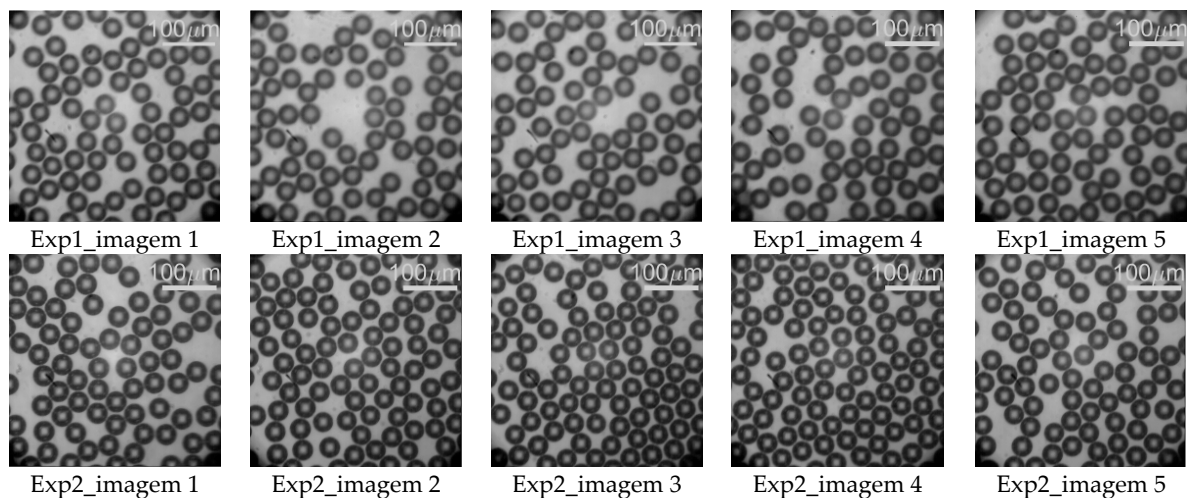


Figura 33 – Imagens das microbolhas para cada experimento realizado. Fonte: Autoria própria.

Nos experimentos, foi capturado um total de 2941 microbolhas para realizar a análise estatística do diâmetro médio e índice de polidispersidade pelo *software* de detecção de objetos circulares. O desvio da técnica para mensurar o diâmetro médio das microbolhas foi realizado através da medição do tamanho médio por processo manual utilizando a régua micrométrica em comparação com o tamanho médio medido pelo *software* desenvolvido. O valor encontrado foi de 1,45% para 20 microbolhas medidas.

As imagens das microbolhas geradas nestes experimentos foram capturadas utilizando a câmera digital Hispec 5 acoplada ao microscópio XJS-900T-PH com lentes objetivas de 20X de ampliação. As imagens capturadas são armazenadas na memória interna da câmera e posteriormente enviadas ao computador para o processamento.

3.2.4 Testes de estabilidade com alteração na concentração de fase dispersa

Neste estudo, foram realizadas três etapas de experimentos alterando a composição da concentração da fase dispersa (óleo de girassol e tensoativo), para verificar a estabilidade das microbolhas geradas em diferentes concentrações de óleo de girassol e emulsificante. Na primeira etapa, os testes foram realizados usando a composição do óleo de girassol e apenas o tensoativo polissorbato 80 (T_{T80}), em etapa seguinte, os testes realizados, utilizaram a mistura dos emulsificantes polissorbato 80 (T_{T80}) e lecitina de soja (T_{LS}) e por fim, a terceira etapa de testes utilizando a composição dos emulsificantes polissorbato 80 (T_{T80}) e mono e diglicerídeos (T_{MD}). Todas as emulsões testadas foram elaboradas com proporção em massa de 100 g de solução com concentrações em 3%, soluções consideradas muito diluídas e classificadas como fluído newtoniano.

A viscosidade da emulsão foi obtida utilizando um viscosímetro rotativo Brookfield DV-E a 21 °C e pressão atmosférica local aproximada de 91 kPa.

Nos experimentos da primeira etapa, a fase líquida da emulsão foi composta de água deionizada (H_2O_{DEI}), óleo de girassol (O_{LG}) e emulsificante polissorbato 80 (T_{T80}), na proporção de massa e viscosidade (η) apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 - Tabela de proporção de massa da fase líquida e viscosidade para a primeira etapa de testes.

H ₂ O _{DEI} (g)	O _{LG} (g)	T _{T80} (g)	P _{PM}	η (Pa.s)
97	2	1	97: 2: 1	1,16
97	1,5	1,5	97: 1,5: 1,5	1,20
97	1	2	97: 1: 2	1,17

Para os testes da segunda e terceira etapa, a fase líquida da emulsão foi composta de água deionizada (H₂O_{DEI}), óleo de girassol (O_{LG}), emulsificante polissorbato 80 (T_{T80}) agregado a outro emulsificante, sendo a lecitina de soja (T_{LS}) e o mono diglicerídeos (T_{MD}) respectivamente, na proporção de massa e viscosidade (η) apresentada na Tabela 5 e Tabela 6.

Tabela 5 - Tabela de proporção de massa da fase líquida e viscosidade para a segunda etapa de testes.

H ₂ O _{DEI} (g)	O _{LG} (g)	T _{T80} (g)	T _{LS} (g)	P _{PM}	η (Pa.s)
97	1	1,5	0,5	97: 1: 1,5: 0,5	1,36
97	1	1	1	97: 1: 1: 1	1,66
97	1	0,5	1,5	97: 1: 0,5: 1,5	1,89

Tabela 6 - Tabela de proporção de massa da fase líquida e viscosidade para a terceira etapa de testes.

H ₂ O _{DEI}	O _{LG} (g)	T _{T80} (g)	T _{MD} (g)	P _{PM}	η (Pa.s)
97	1	1,5	0,5	97: 1: 1,5: 0,5	1,41
97	1	1	1	97: 1: 1: 1	1,69
97	1	0,5	1,5	97: 1: 0,5: 1,5	1,60

Todas as três etapas foram realizadas com o dispositivo de entroncamento microfluídico *T-junction* e micropipeta MIC-SLM-30.

Os ajustes da vazão da fase líquida (Q_L) e vazão da fase gasosa (Q_G), para os experimentos realizados nestas três etapas, foram ajustados conforme a necessidade de manter um determinado tamanho de microbolha (diâmetro equivalente entre as etapas), para que a posterior fosse possível realizar um comparativo da estabilidade, devido à alteração da composição do revestimento da microbolha e da associação de emulsificantes.

As imagens foram capturadas de acordo com os experimentos de estabilidade para cada emulsão, a uma taxa de 1 frame por segundo (fps) utilizando a câmera digital Hispec 5 acoplada ao microscópio XJS- 900T- PH com lentes objetivas de 4,3X e 10X de ampliação. As imagens capturadas são armazenadas na memória interna da câmera e posteriormente enviadas ao computador para o processamento.

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 com os dispositivos microfluídicos utilizando as micropipetas MIC SLM-30, MSC-20-30 e MBB-BP-L-30, 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, são apresentados os testes de produção das microbolhas com o dispositivo microfluídico híbrido utilizando as micropipetas MIC SLM-30 em elevada taxa de fluxo de líquido e gás. Na seção 4.3 serão apresentados os testes de estabilidade das microbolhas, conforme a composição da concentração da fase dispersa (óleo de girassol e tensoativo).

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROBOLHAS GERADAS POR MODELO DE MICROPIPETA

Para os experimentos de geração das microbolhas com as micropipetas MBB-BP-L-30, MSC-20-30 e MIC-SLM-30, a emulsão utilizada foi composta por 98 g de água deionizada, 1 g de óleo de girassol e 1 g de emulsificante polissorbato 80 (proporção de massa de 98: 1: 1).

4.1.1 Microbolhas geradas com micropipeta MBB-BP-L-30

Usando a micropipeta MBB-BP-L-30 (Origio), com o diâmetro interno de 40 μm e ajustando uma vazão da fase líquida $Q_L = 0,13\text{ml/min}$ e vazão da fase gasosa $Q_G = 10,88\text{ nl/min}$, foram capturadas no processo 8900 imagens a uma taxa de 150 fps, sendo detectado um total de 107 microbolhas isoladas. O número de Reynolds (Re) encontrado foi de 0,047, o número capilar (Ca) de 0,002 e velocidade do líquido (U_l) de 1,103 cm/s. A Figura 34 apresenta a curva de distribuição do diâmetro das microbolhas em relação ao número de eventos ocorridos (microbolha isolada), com diâmetro médio da microbolha (D_b) de 57,70 μm , desvio padrão (σ) de 0,61 μm e índice de polidispersidade (PDI) de 1,06%.

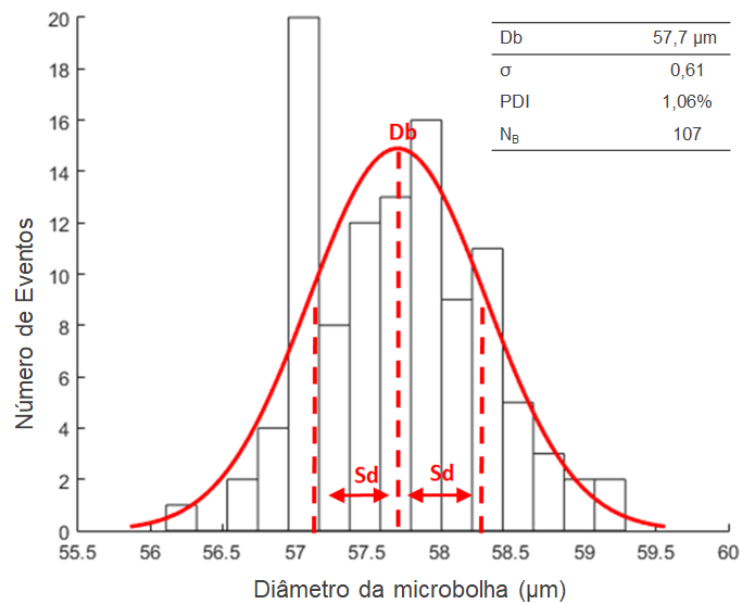


Figura 34 - Curva de distribuição do diâmetro das microbolhas, utilizando a micropipeta MBB-BP-L-30.

Fonte: Autoria própria.

Utilizando a câmera digital acoplada ao microscópio e a régua micrométrica na escala de 1 DIV/10 μm , foi possível visualizar uma das microbolhas geradas pela micropipeta MBB-BP-L-30 com diâmetro aproximado de 60 μm , mostrada pela Figura 35.

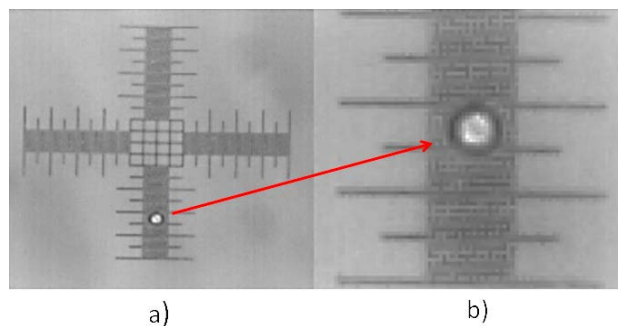


Figura 35 - Imagem da microbolha gerada com micropipeta MBB-BP-L-30, (a) microbolha sobre a régua micrométrica e (b) imagem ampliada da microbolha com diâmetro aproximado de 60 μm .

Fonte: Autoria própria.

4.1.2 Microbolhas geradas com micropipeta MSC-20-30

Nos experimentos usando a micropipeta MSC-20-30 (Origio), com o diâmetro interno de 20 μm , foi ajustada a vazão da fase líquida para $Q_L = 0,16 \text{ ml/min}$ e vazão da fase gasosa $Q_G = 3,28 \text{ nl/min}$, foram capturadas no processo 6652 imagens a uma taxa de 100 fps, sendo detectado um total de 104 microbolhas isoladas. O número de Reynolds (Re) encontrado foi de 0,058, o número capilar (Ca) de 0,002 e velocidade do líquido (U_i) de 1,358 cm/s. A Figura 36

apresenta a curva de distribuição do diâmetro das microbolhas em relação ao número de eventos ocorridos (microbolha isolada) com diâmetro médio da microbolha (D_b) de 40,60 μm , desvio padrão (σ) de 0,19 μm e índice de polidispersidade (PDI) de 0,47%.

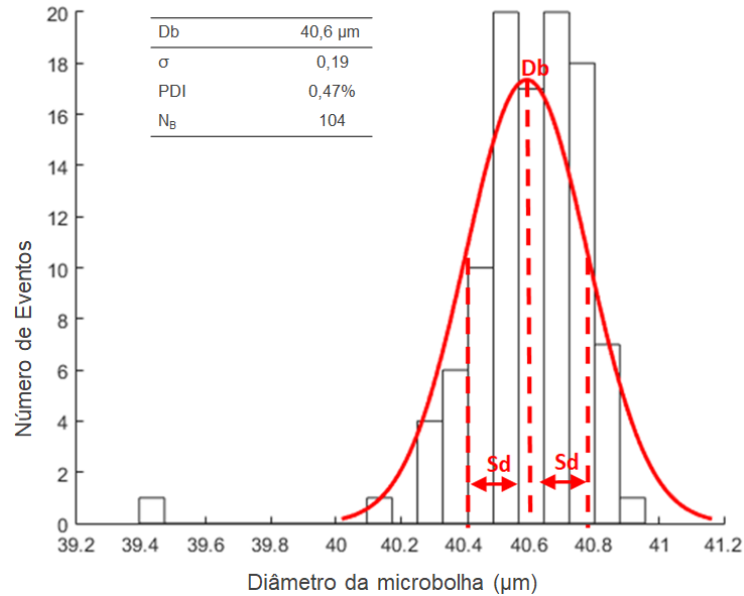


Figura 36 - Curva de distribuição do diâmetro das microbolhas, utilizando a micropipeta MSC-20-30.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 37 mostra a imagem da microbolha obtida usando a micropipeta MSC-20-30, com diâmetro aproximado de 40 μm , utilizando a câmera digital acoplada ao microscópio e a régua micrométrica na escala de 1 DIV/10 μm .

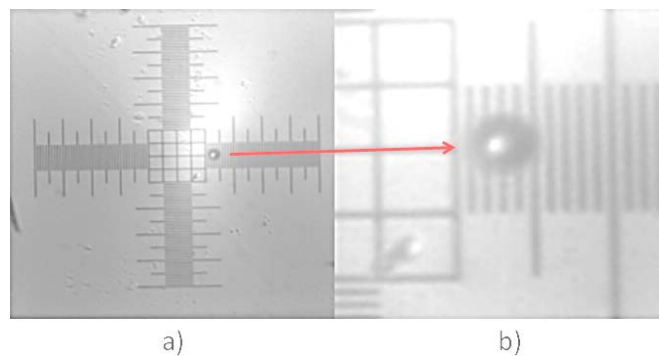


Figura 37 - Imagem da microbolha gerada com micropipeta MSC-20-30, (a) microbolha sobre a régua micrométrica e (b) imagem ampliada da microbolha com diâmetro aproximado de 40 μm .

Fonte: Autoria própria.

4.1.3 Microbolhas geradas com micropipeta MIC-SLM-30

Para a micropipeta MIC-SLM-30 (Origio), com o diâmetro interno do canal em formato bisel de 11 μm e 4,6 μm , o ajuste da vazão da fase líquida foi de $Q_L = 0,13 \text{ ml/min}$ e da vazão

da fase gasosa de $Q_G = 0,165$ nl/min, foram capturadas no processo 15120 imagens a uma taxa de 150 fps, sendo detectado um total de 117 microbolhas isoladas. O número de Reynolds (Re) encontrado foi de 0,047, o número capilar (Ca) de 0,002 e velocidade do líquido (U_l) de 1,103 cm/s. A Figura 38 apresenta a curva de distribuição do diâmetro das microbolhas no experimento em relação ao número de eventos ocorridos (microbolha isolada) com diâmetro médio da microbolha (D_b) de 16,55 μm , desvio padrão (σ) de 0,15 μm e índice de polidispersidade (PDI) de 0,90%.

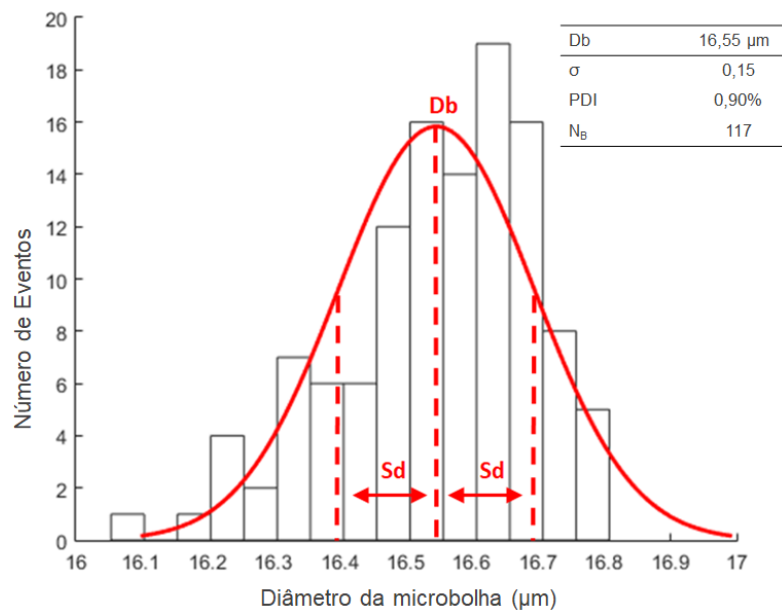


Figura 38 - Curva de distribuição do diâmetro das microbolhas no experimento, utilizando a micropipeta MIC-SLM-30.

Fonte: Autoria própria.

Utilizando novamente a câmera digital acoplada ao microscópio e a régua micrométrica na escala de 1 DIV/10 μm , foi obtida a imagem da microbolha gerada pela micropipeta MIC-SLM-30, com diâmetro aproximado de 15 μm . A Figura 39, apresenta esta imagem.

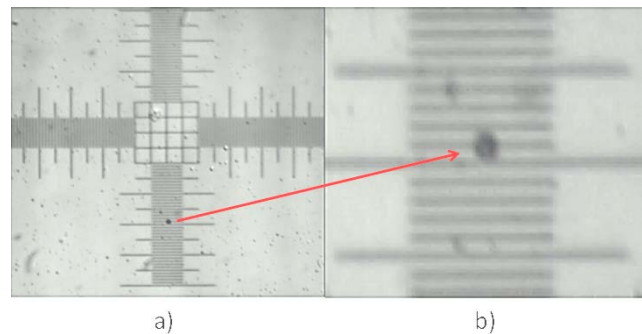


Figura 39 - Imagem da microbolha gerada com micropipeta MIC-SLM-30, (a) microbolha sob a régua micrométrica e (b) imagem ampliada da microbolha com diâmetro aproximado de 15 μm .

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos nos experimentos utilizando as micropipetas MBB-BP-L-30, MSC-20-30 e MIC-SLM-30, com referência ao diâmetro médio da microbolha (D_b), desvio padrão (σ) e índice de polidispersidade (PDI) de cada experimento.

Tabela 7 - Resultados obtidos utilizando as micropipetas MBB-BP-L-30, MSC-20-30 e MIC-SLM-30.

Micropipeta	MBB-BP-L-30	MSC-20-30	MIC-SLM-30
D_b (μm)	57,70	40,60	16,55
σ (μm)	0,61	0,19	0,15
PDI (%)	1,06	0,47	0,90

4.1.4 Linearidade da produção de microbolhas com o dispositivo microfluídico

Para investigar a linearidade da produção das microbolhas com o dispositivo microfluídico híbrido, foram realizados experimentos utilizando a micropipeta MIC-SLM-30, onde o diâmetro médio das microbolhas geradas é alterado conforme o ajuste realizado das vazões da fase gasosa e da fase líquida.

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos nos experimentos da linearidade da produção, com referência ao diâmetro médio da microbolha (D_b), desvio padrão (σ), índice de polidispersidade (PDI), número de microbolhas geradas (N_B), vazão da fase gasosa (Q_L) e vazão da fase líquida (Q_G).

Tabela 8 - Alteração do diâmetro da microbolha para diferentes ajustes da vazão da fase gasosa e da fase líquida para a micropipeta MIC-SLM-30.

Experimento n°	D_b (μm)	σ (μm)	PDI (%)	N_B	Q_L (ml/min)	Q_G (nl/min)
Exp. 01	16,55	0,15	0,71	117	0,13	0,16
Exp. 02	18,48	0,23	1,09	169	0,07	0,11
Exp. 03	20,91	0,30	1,17	208	0,25	0,43
Exp. 04	23,08	0,37	1,28	163	0,22	0,49

A Figura 40 apresenta a curva de distribuição gaussiana do diâmetro das microbolhas em função do número de eventos para os experimentos realizados da Tabela 8.

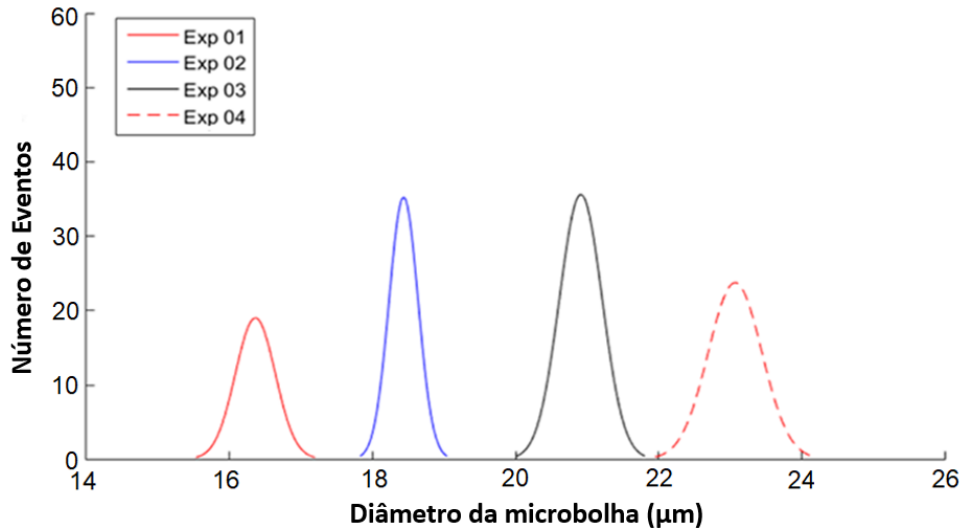


Figura 40 - Curva de distribuição gaussiana para microbolhas de diâmetros diferentes devido à alteração da vazão da fase líquida e fase gasosa.

Fonte: Autoria própria.

Os diâmetros das microbolhas geradas apresentam uma linearidade correspondente à medida que as vazões são alteradas. A Figura 41 mostra o gráfico da relação linear na geração das microbolhas (D_b/D_p em função de Q_G/Q_L), com coeficiente de correlação de Pearson (R) de 0,9743 para a micropipeta MIC-SLM-30.

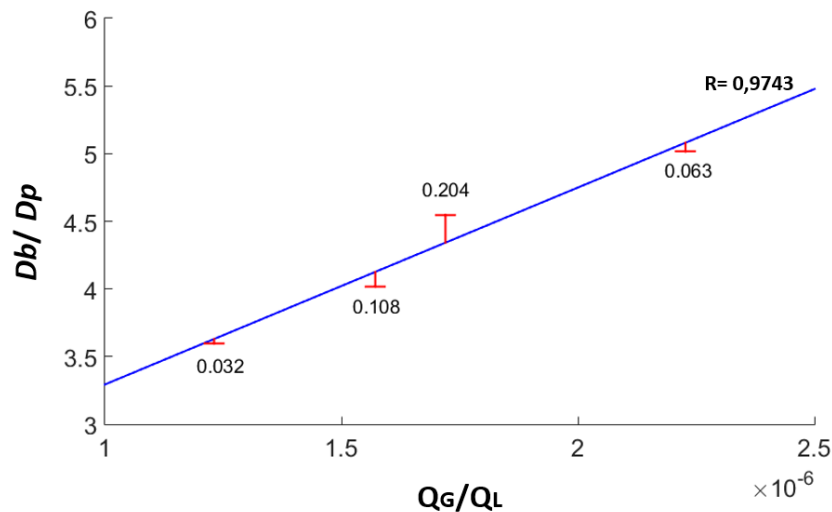


Figura 41 – Gráfico da relação linear da produção de microbolhas referente à vazão da fase gasosa e vazão da fase líquida, com coeficiente de correlação de Pearson (R) de 0,9743. Onde, D_b é o diâmetro médio da microbolha, D_p é o diâmetro da micropipeta, Q_G é a vazão da fase gasosa e Q_L é a vazão da fase líquida.

Fonte: Autoria própria.

Conforme a Figura 41, o valor do coeficiente de correlação de Pearson encontrado foi de 0,9743, mostrando elevado grau de correlação linear na produção e capacidade do dispositivo em gerar microbolhas de diferentes tamanhos com baixo índice de polidispersidade conforme o ajuste realizado das vazões da fase gasosa e da fase líquida.

4.1.5 Curva de estimativa do diâmetro interno da micropipeta em função ao diâmetro da microbolha

Analisando os resultados obtidos com as micropipetas MIC-SLM-30, MSC-20-30 e MBB-BP-L-30, pode-se verificar que o diâmetro médio das microbolhas (D_b) geradas pelos dispositivos de entroncamentos híbridos para cada modelo de micropipeta, resultam na formação de microbolhas com uma determinada relação de proporção ao diâmetro interno da micropipeta (D_p) utilizada, conforme a Tabela 9.

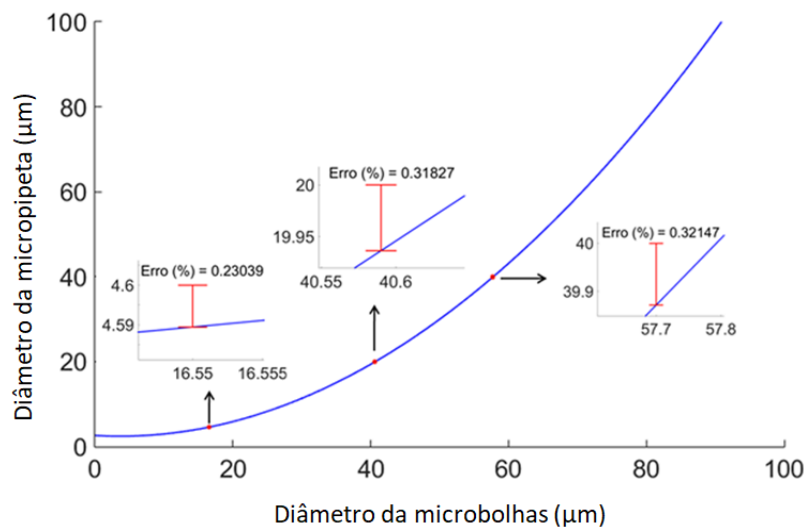
Tabela 9 - Diâmetro das microbolhas geradas em relação ao diâmetro interno das micropipetas.

Modelo	D_p (μm)	D_b (μm)
MIC-SLM-30	11 e 4,6	16,55
MSC-20-30	20	40,59
MBB-BP-L-30	40	57,70

Com estes resultados e utilizando a ferramenta de simulação computacional Matlab, foi possível gerar o polinômio característico conforme a equação (4.1), possibilitando estimar o valor do diâmetro da micropipeta capaz de gerar as microbolhas, inclusive para uso clínico ($< 10 \mu\text{m}$).

$$D_p = 0,0128 \cdot D_b^2 - 0,0930 \cdot D_b + 2,6226 \quad (4.1)$$

Utilizando este polinômio, foi gerada uma curva de estimativa do diâmetro interno da micropipeta em função ao diâmetro da microbolha a ser gerada, usando o ar como fase gasosa e fase líquida composta pela emulsão de 98 g água deionizada, 1g de óleo de girassol e 1g de emulsificante polissorbato 80 (98: 1: 1), conforme o gráfico apresentado na Figura 42.



**Figura 42 - Gráfico da curva de estimativa do diâmetro da micropipeta em função do diâmetro da microbolha, apresentando o erro percentual (%) entre o ponto real e o ponto interpolado pela equação (1).
Fonte: Autoria própria.**

De acordo com a curva de estimativa apresentada pela Figura 42, para se obter microbolhas menores que 10 µm de tamanho, a micropipeta deve possuir um diâmetro interno inferior a 3,0 µm.

Recentemente, a fabricante Word Precision Instruments (WPI) começou a produzir e comercializar micropipetas com diâmetros de ponta interna de até 0,1 µm. O uso dessas micropipetas nos dispositivos híbridos, certamente permitirá a produção de microbolhas menores que 10 µm. Além disso, segundo Jiang et al. (2016), o diâmetro das microbolhas pode ser reduzido utilizando múltiplos *T-junctions*, além de aumentar a produção de microbolhas geradas (JIANG et al., 2016).

No experimento realizado por Araújo Filho et al. (2012) com microbolhas geradas com ar encapsuladas por matriz lipídica e emulsionante polissorbato 80, o diâmetro médio das microbolhas obtidas foi de 73,74 µm para uma micropipeta com diâmetro interno de 70 µm. Utilizando a equação (4.1), o valor do diâmetro da micropipeta seria de 65,36 µm, um erro absoluto de 4,64 µm e erro percentual de 6,62% (ARAÚJO, 2013).

Em outro experimento realizado por Duncan e Needham (2004), a microbolha com diâmetro inicial de 15 µm foi produzida e mantida na ponta de uma micropipeta de 4 µm, dentro de uma microcâmara utilizando revestimento por lipídeo e ar como fase gasosa da microbolha. Para este caso, utilizando a mesma equação (4.1), o valor do diâmetro da micropipeta seria de 4,11 µm, um erro absoluto de 0,11 µm e erro percentual de 2,75% (DUNCAN; NEEDHAM, 2004).

Analisando os experimentos pode-se concluir que a curva de estimativa obtida pela equação (4.1), possibilita uma boa aproximação para determinar o diâmetro interno necessário

da micropipeta para gerar um respectivo tamanho de microbolha (ou vice-versa), dentro destes limites, utilizando o ar como componente gasoso e a matriz lipídica como revestimento. Obviamente o ponto (0; 2,6226) matematicamente permitido na equação (4.1) não tem qualquer significado real, uma vez que não se pode reproduzir microbolhas com 0 μm , tratando-se, portanto, de um ponto proibido, assim como valores negativos para D_b também o são. Como a equação (4.1) é uma função contínua para qualquer valor de D_b , e estamos interessados em valores não apenas matematicamente viáveis, e sim reais do ponto de vista físico, logo a solução geral do polinômio característico da equação (4.1) tem a seguinte forma: $S = \{para\ todo\ D_b \in \mathfrak{R}/D_b > 0\}$.

A curva de distribuição do diâmetro das microbolhas nos experimentos utilizando as micropipetas MIC SLM-30, MSC-20-30 e MBB-BP-L-30 em relação ao número de eventos ocorridos (microbolha isolada) apresentam a capacidade do dispositivo híbrido em gerar microbolhas monodispersas, tendo o óleo de girassol e emulsificante polissorbatato 80 como revestimento das microbolhas. Os resultados obtidos nos experimentos comprovam o elevado grau de uniformidade das microbolhas geradas.

4.2 TESTES DE GERAÇÃO DE MICROBOLHAS EM ELEVADA TAXA DE FLUXO DE LÍQUIDO E GÁS

Para os testes de produção das microbolhas com o dispositivo microfluídico híbrido em elevada taxa de fluxo de líquido e gás foram realizados dois experimentos utilizando a micropipeta MIC-SLM-30. As condições experimentais de ambos os testes são descritas a seguir: a vazão do líquido foi ajustada para $Q_L = 1,55\text{ ml/min}$ e a pressão do gás em $P_G = 1,04\text{ bar}$. O número de Reynolds (Re) encontrado foi de 0,56; o número capilar (Ca) de 0,02 e velocidade do líquido (U_l) de 13,16 cm/s. Os experimentos foram realizados durante 4 segundos, a uma taxa de 400 fps e produção total estimada em 7200 microbolhas, ou seja, uma produção de 1800 microbolhas por segundo.

No primeiro experimento foi mensurado um total de 1260 microbolhas isoladas. A Figura 43 apresenta a curva de distribuição do diâmetro das microbolhas em relação ao número de eventos ocorridos (microbolha isolada), com diâmetro médio da microbolha (D_b) de 42,70 μm , desvio padrão (σ) de 1,42 μm , índice de polidispersidade (PDI) de 3,32% e número de microbolhas geradas (N_B).

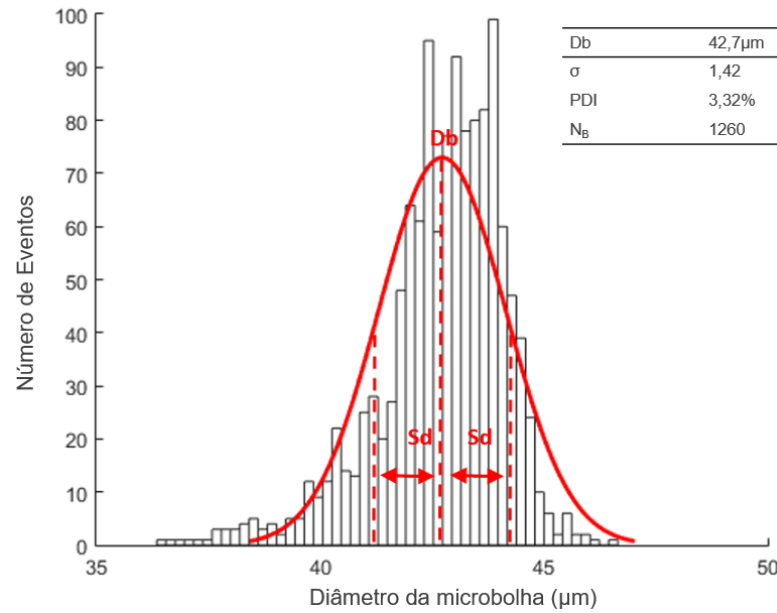


Figura 43 - Curva de distribuição do primeiro experimento de microbolhas geradas em alta taxa de produção.

Fonte: Autoria própria.

No segundo experimento foi mensurado um total de 1681 microbolhas isoladas. A Figura 44 apresenta a curva de distribuição do diâmetro das microbolhas em relação ao número de eventos ocorridos (microbolha isolada), com diâmetro médio da microbolha (D_b) de 42,80 µm, desvio padrão (σ) de 1,29 µm e índice de polidispersidade (PDI) de 3,03%.

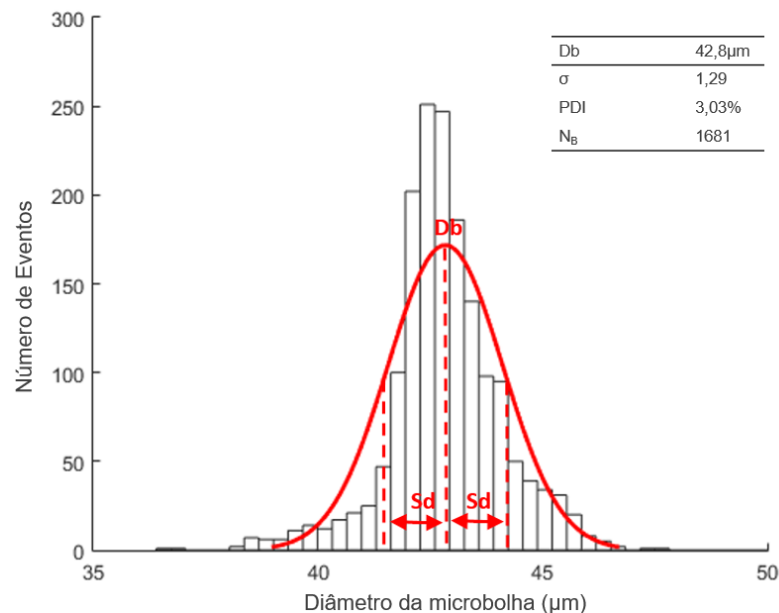


Figura 44 - Curva de distribuição do segundo experimento de microbolhas geradas em elevada taxa de produção.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 45 mostra a curva de distribuição do somatório dos experimentos em elevada taxa de produção, com um total de 2941 microbolhas isoladas, diâmetro médio (D_b) de 42,80 μm , desvio padrão (σ) de 1,34 μm e índice de polidispersidade (PDI) de 3,13%.

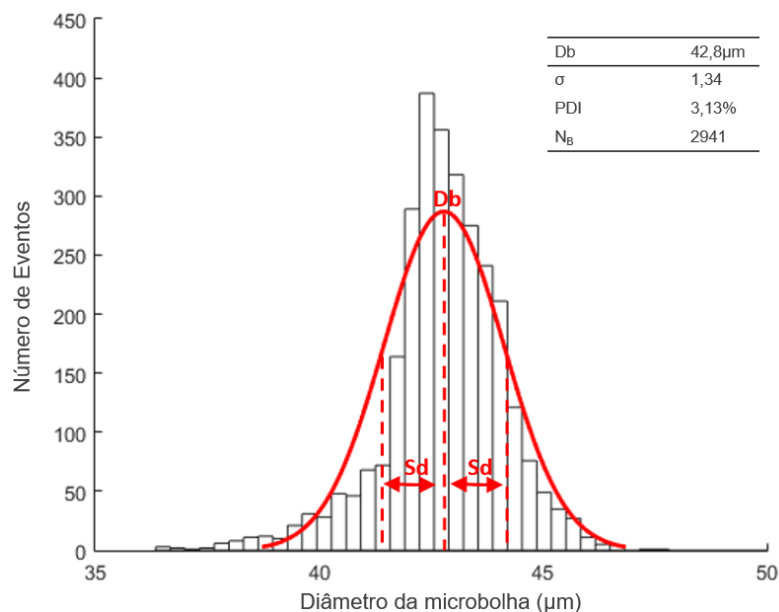


Figura 45 – Curva de distribuição do somatório dos experimentos em elevada taxa de produção.
Fonte: Autoria própria.

Considerando os resultados encontrados nos experimentos em elevada taxa de produção de microbolhas, o diâmetro médio encontrado foi de 42,8 μm para um total de 2941 microbolhas geradas, onde pode ser constatado o aumento do PDI para 3,13%. Esse aumento de PDI para vazão de líquidos e gás mais elevados nos instiga a considerar que devido à proximidade da ponta da micropipeta com a parede do canal de condução de saída, o fluxo de líquido se torna mais instável com o aumento da vazão.

De acordo com os resultados obtidos em taxa de produção elevada, comparando os resultados obtidos por Araújo Filho et al. (2012), onde a taxa de produção foi de 13 microbolhas por segundo, o dispositivo desenvolvido neste trabalho apresentou uma produção próxima de 138 vezes maior (ARAÚJO; SCHNEIDER; MORALES, 2012). Em Jiang et al. (2016), a taxa de produção de microbolhas para um único *T-junction*, foi entre 282 a 373 microbolhas por segundo, comparando a esse resultado, o dispositivo híbrido desenvolvido foi capaz de produzir cerca de 6 vezes acima (JIANG et al., 2016). De acordo com Rodríguez-Rodríguez et al. (2015), a taxa de produção para dispositivos *T-junction*, produzidos pela técnica de litografia suave é aproximadamente de 1000 bolhas por segundo, nessa condição, o dispositivo microfluídico híbrido apresentou uma taxa de produção próxima de 2 vezes maior (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2015).

4.3 ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS MICROBOLHAS

Para a análise da estabilidade das microbolhas foi utilizado o dispositivo de microfluídica híbrido com a micropipeta MIC-SLM-30. Os experimentos foram divididos em três seções, sendo a primeira com a emulsão composta pela fase dispersa de óleo de girassol (O_{LG}) e emulsificante polissorbato 80 (T_{T80}), a segunda composta por óleo de girassol e emulsificante polissorbato 80 associado ao emulsificante lecitina de soja (T_{LS}) e a terceira com a fase dispersa composta por óleo de girassol e emulsificante polissorbato 80 associado ao emulsificante mono e diglicerídeos (T_{MD}). Para estas emulsões, a fase contínua utilizada foi a água deionizada (H_2O_{DEI}) em proporção de massa (P_{PM}) de 97:3, ou seja, 3 g de fase dispersa (óleo e emulsificante) para 97 g de fase contínua (água deionizada), totalizando 100 g de emulsão, mantendo a concentração mássica para todos os experimentos.

A vazão da fase líquida (Q_L) e a vazão da fase gasosa (Q_G) nestes experimentos foram ajustadas conforme a necessidade de se manter um determinado tamanho de microbolha próximo de 25 μm , para que a posterior fosse possível realizar um comparativo da estabilidade devido à alteração da composição do revestimento da microbolha.

Após o processamento das imagens das microbolhas capturadas nos experimentos realizados nas três seções, foi elaborada a curva de estabilidade para cada população de microbolhas e apresentada em um gráfico com as amostras de estabilidade individual e da curva de estabilidade média para cada experimento. O tempo de estabilidade individual para cada microbolha nos experimentos foi mensurada até atingir o diâmetro aproximado de 5 μm , devido a falta de exatidão no processo de mensurar o tamanho correto da microbolha para valores abaixo desta medida, após este valor, foi considerado o tempo no qual a microbolha se dissolve completamente. No final de cada etapa foram apresentadas as curvas comparativas em escala linear e logarítmica dos experimentos realizados.

4.3.1 Estabilidade da emulsão óleo de girassol e emulsificante polissorbato 80.

Os experimentos realizados nesta seção utilizaram a fase líquida da emulsão composta de água deionizada (H_2O_{DEI}), óleo de girassol (O_{LG}) e emulsificante polissorbato 80 (T_{T80}), na proporção de massa conforme a Tabela 10.

Tabela 10 - Tabela de proporção de massa e concentração da emulsão água, óleo e polissorbato 80.

H ₂ O _{DEI} (g)	OLG (g)	T _{T80} (g)	PPM
97	2	1	97: 2: 1
97	1,5	1,5	97: 1,5: 1,5
97	1	2	97: 1: 2

As Figura 46, Figura 47 e Figura 48 apresentam as curvas de estabilidade da população das microbolhas obtidas para a emulsão contendo água deionizada, óleo de girassol e emulsificante polissorbato 80 em cada experimento. Onde: (a) é a curva de estabilidade individual das microbolhas e (b) a curva de estabilidade média das microbolhas geradas.

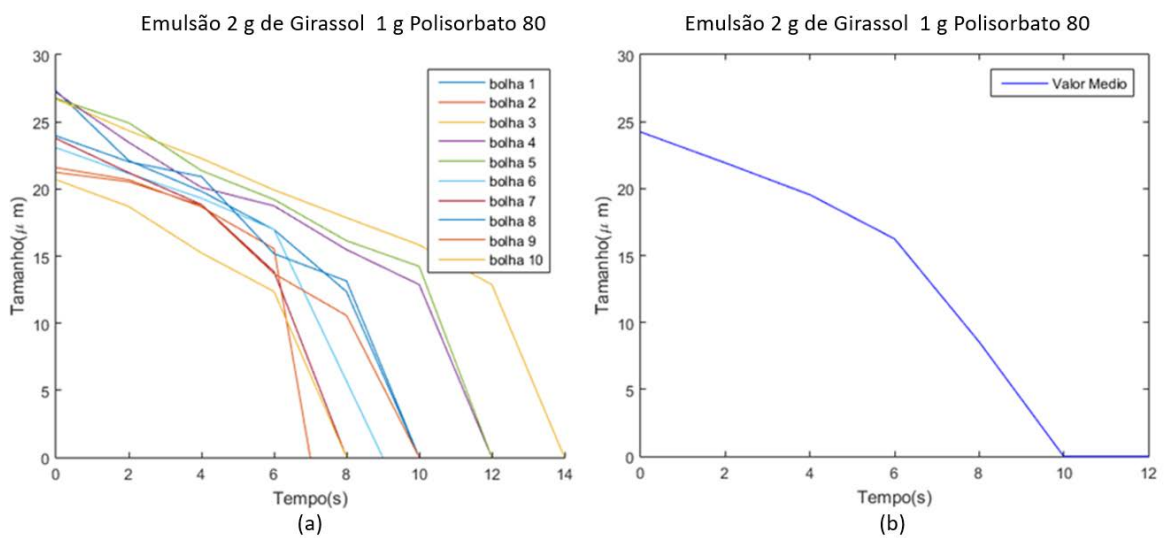


Figura 46 - Curva de estabilidade da população de microbolhas para emulsão de água, óleo de girassol e polissorbato 80 (97: 2: 1).

Fonte: Autoria própria.

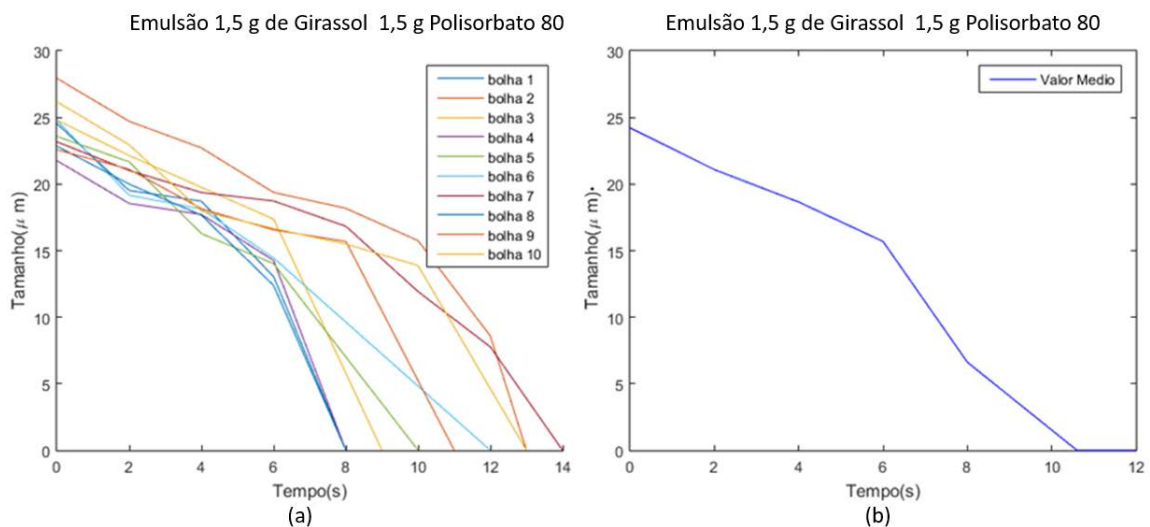


Figura 47 - Curva de estabilidade da população de microbolhas para emulsão de água, óleo de girassol e polissorbato 80 (97: 1,5: 1,5).

Fonte: Autoria própria.

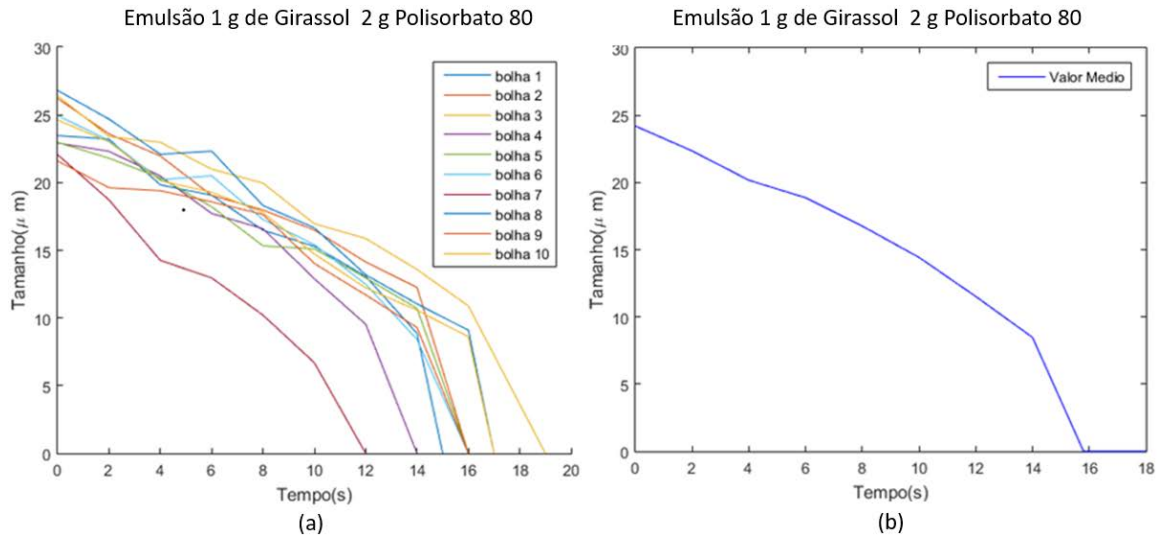


Figura 48 - Curva de estabilidade da população de microbolhas para emulsão de água, óleo de girassol e polissorbato 80 (97: 1: 2).

Fonte: Autoria própria.

A Figura 49 apresenta as curvas de estabilidade média da população de microbolhas para cada experimento realizado com a emulsão de água deionizada, óleo de girassol e emulsificante polissorbato 80. Onde: (a) é a curva de estabilidade média em escala linear do tempo e (b) a curva apresentada em escala logarítmica do tempo.

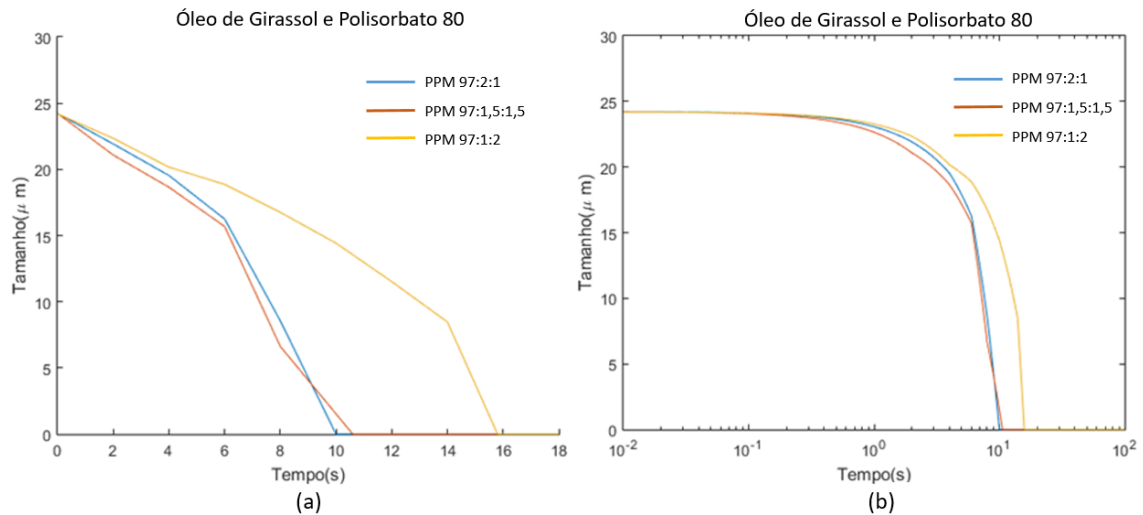


Figura 49 - Curva de estabilidade média dos experimentos com óleo de girassol e emulsificante polissorbato 80.

Fonte: Autoria própria.

Com estes dados, a maior estabilidade encontrada foi aproximadamente de 16 segundos. Pode ser observado que a curva de estabilidade que apresenta o melhor resultado com a emulsão composta de água deionizada, óleo de girassol e polissorbato 80, foi obtida com a emulsão de proporção de massa (P_{PM}) de 97: 1: 2, conforme mostra a Figura 49.

4.3.2 Estabilidade da emulsão óleo de girassol e emulsificante polissorbato 80 associado ao emulsificante lecitina de soja.

Os experimentos realizados nesta seção utilizaram a fase líquida da emulsão composta de água deionizada (H_2O_{DEI}), óleo de girassol (O_{LG}) e emulsificante polissorbato 80 (T_{T80}) associado ao emulsificante lecitina de soja (T_{LS}), na proporção de massa (P_{PM}), conforme a Tabela 11.

Tabela 11 - Tabela de proporção de massa e concentração da emulsão água, óleo, polissorbato 80 e Lecitina de Soja.

H_2O_{DEI} (g)	O_{LG} (g)	T_{T80} (g)	T_{LS}	P_{PM}
97	1	1,5	0,5	97: 1: 1,5: 0,5
97	1	1	1	97: 1: 1: 1
97	1	0,5	1,5	97: 1: 0,5: 1,5

As Figura 50, Figura 51 e Figura 52 apresentam as curvas de estabilidade da população das microbolhas obtidas para a emulsão contendo água deionizada, óleo de girassol e emulsificante polissorbato 80 associado ao emulsificante lecitina de soja em cada experimento. Onde: (a) é a curva de estabilidade individual das microbolhas e (b) a curva de estabilidade média das microbolhas geradas.

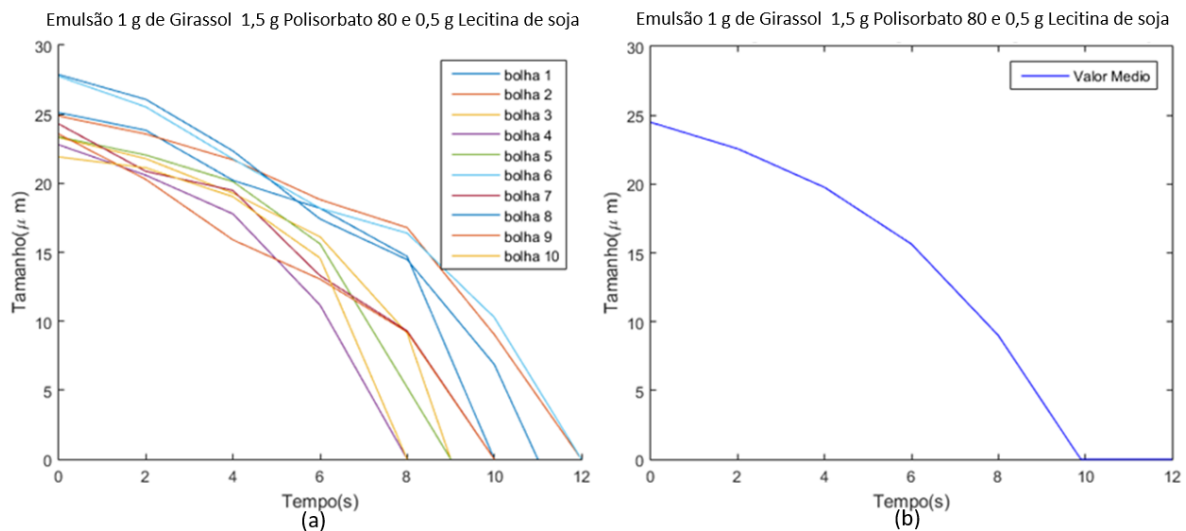


Figura 50 - Curva de estabilidade da população de microbolhas para emulsão de água, óleo de girassol, polissorbato 80 e lecitina de soja (97: 1: 1,5: 0,5).

Fonte: Autoria própria.

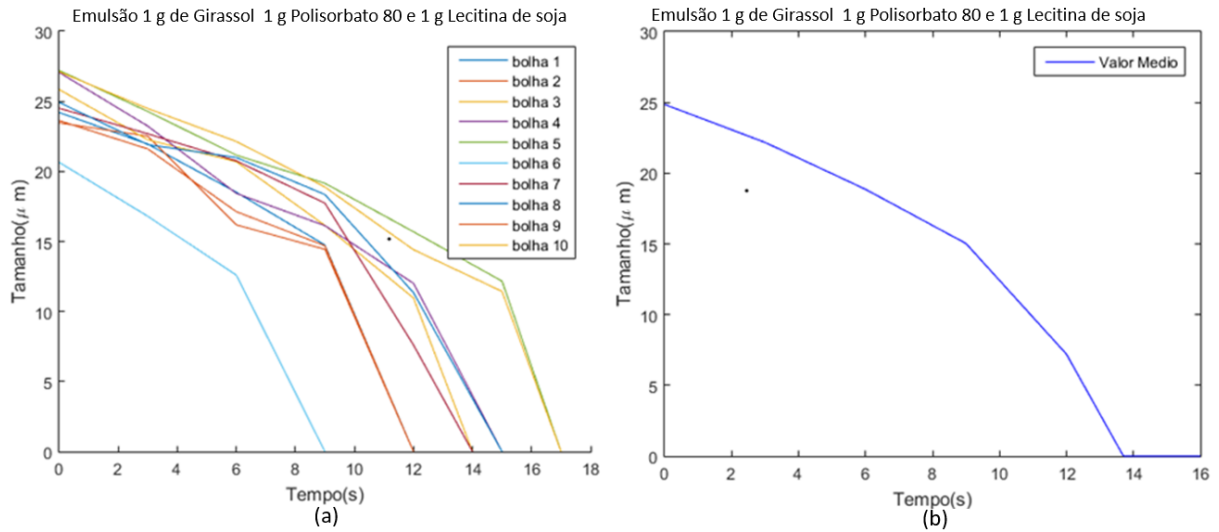


Figura 51 - Curva de estabilidade da população de microbolhas para emulsão de água, óleo de girassol, polissorbato 80 e lecitina de soja 97: 1: 1: 1).
Fonte: Autoria própria.

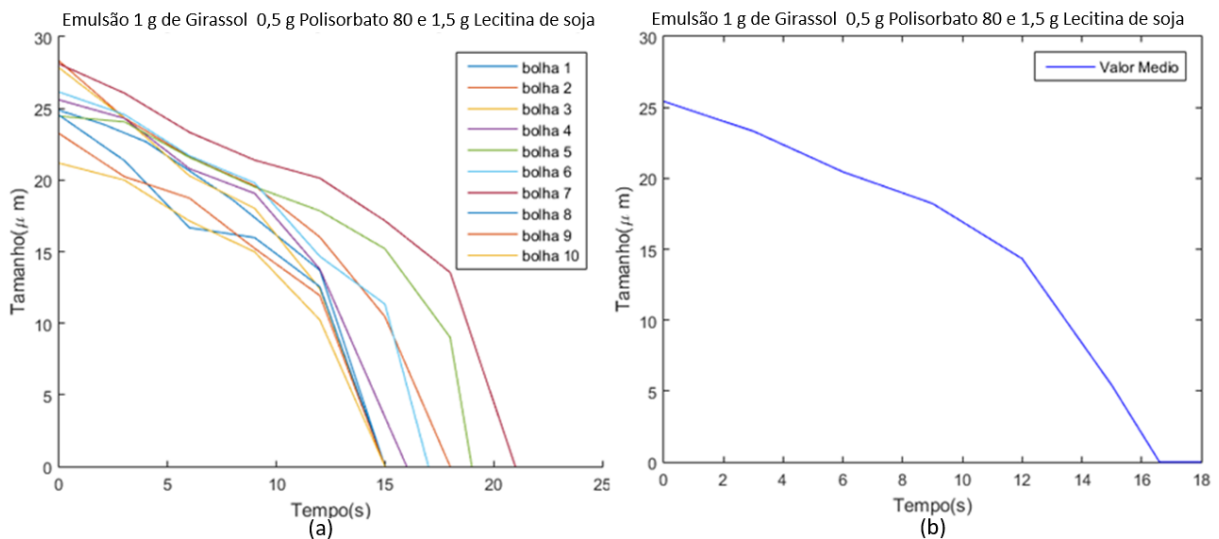


Figura 52 - Curva de estabilidade da população de microbolhas para emulsão de água, óleo de girassol, polissorbato 80 e lecitina de soja (97: 1: 0,5: 1,5).
Fonte: Autoria própria.

A Figura 53 apresenta a curva média dos experimentos realizados com a emulsão de água deionizada, óleo de girassol e emulsificante polissorbato 80 associado ao emulsificante lecitina de soja. Onde: (a) é a curva de estabilidade média em escala linear do tempo e (b) a curva apresentada em escala logarítmica do tempo.

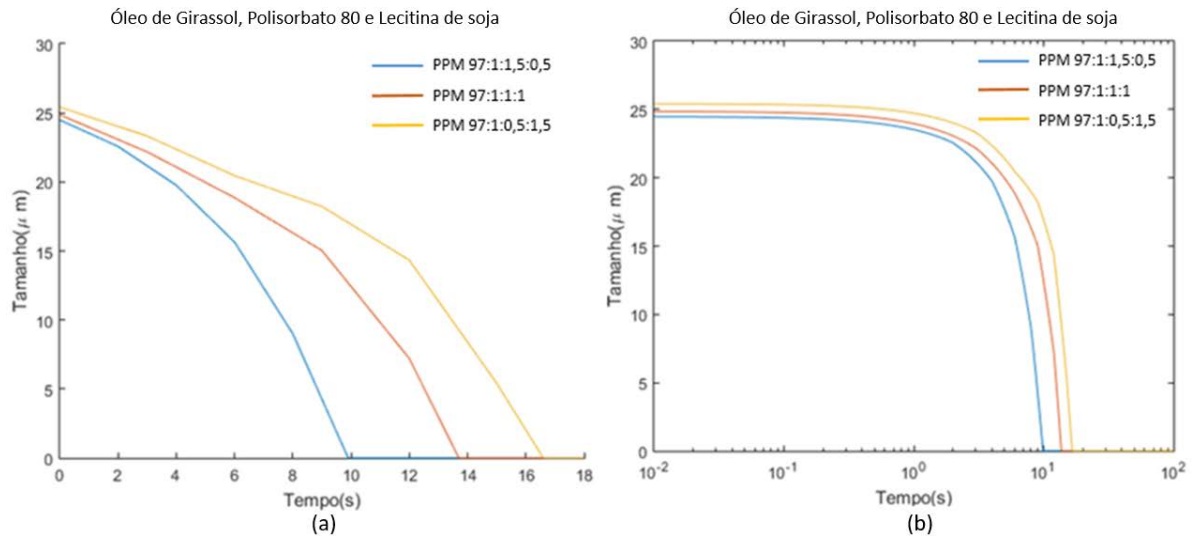


Figura 53 - Curva de estabilidade média dos experimentos com óleo de girassol e emulsificante polissorbatato 80 associado ao emulsificante lecitina de soja.

Fonte: Autoria própria.

Com estes dados, a maior estabilidade encontrada foi aproximadamente de 16,5 segundos. Pode ser observado que a curva de estabilidade que apresenta o melhor resultado com a emulsão composta de água deionizada, óleo de girassol e polissorbatato 80 associado ao emulsificante lecitina de soja, foi obtida com a emulsão de proporção de massa (PPM) de 97: 1: 0,5: 1,5, conforme mostra a Figura 53.

4.3.3 Estabilidade da emulsão óleo de girassol e emulsificante polissorbatato 80 associado ao emulsificante mono e diglicerídeos.

Os experimentos realizados nesta seção utilizaram a fase líquida da emulsão composta de água deionizada (H_2O_{DEI}), óleo de girassol (O_{LG}) e emulsificante polissorbatato 80 (T_{T80}) associado ao emulsificante mono diglicerídeo (T_{MD}), na proporção de massa, conforme a Tabela 12.

Tabela 12 - Tabela de proporção de massa e concentração da emulsão água, óleo, polissorbatato 80 e mono e diglicerídeos.

H_2O_{DEI} (g)	O_{LG} (g)	T_{T80} (g)	T_{MD} (g)	PPM
97	1	1,5	0,5	97: 1: 1,5: 0,5
97	1	1	1	97: 1: 1: 1
97	1	0,5	1,5	97: 1: 0,5: 1,5

As Figura 54, Figura 55 e Figura 56 apresentam as curvas de estabilidade da população das microbolhas obtidas para a emulsão contendo água deionizada, óleo de girassol e emulsificante polissorbatato 80 associado ao emulsificante mono e diglicerídeos em cada experimento.

Onde: (a) é a curva de estabilidade individual das microbolhas e (b) a curva de estabilidade média das microbolhas geradas.

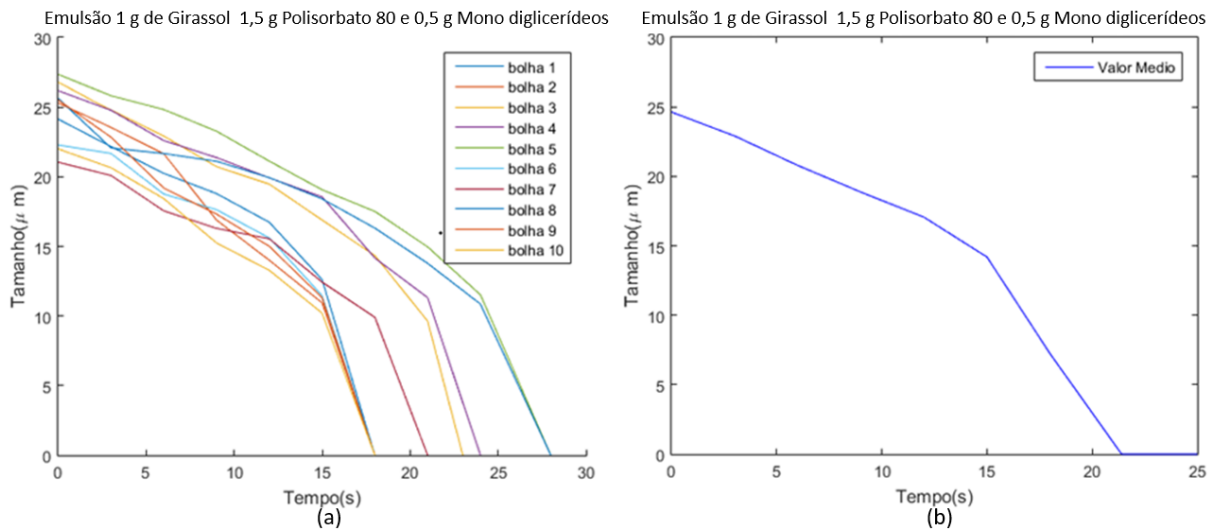


Figura 54 - Curva de estabilidade da população de microbolhas para emulsão de água, óleo de girassol, polissorbato 80 e mono e diglicerídeos (97: 1: 1,5: 0,5).

Fonte: Autoria própria.

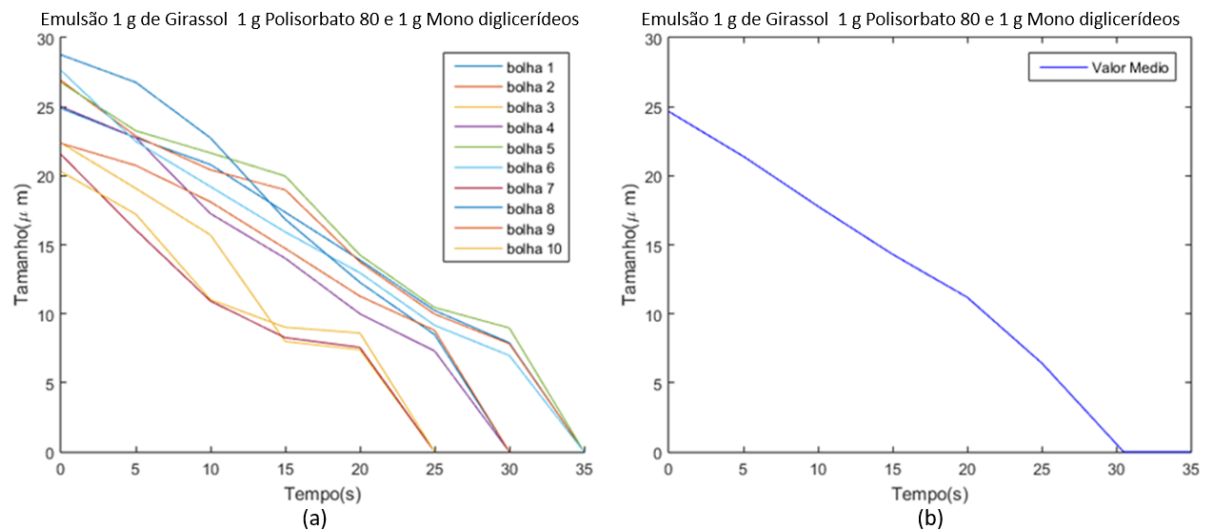


Figura 55 - Curva de estabilidade da população de microbolhas para emulsão de água, óleo de girassol, polissorbato 80 e mono e diglicerídeos (97: 1: 1: 1).

Fonte: Autoria própria.

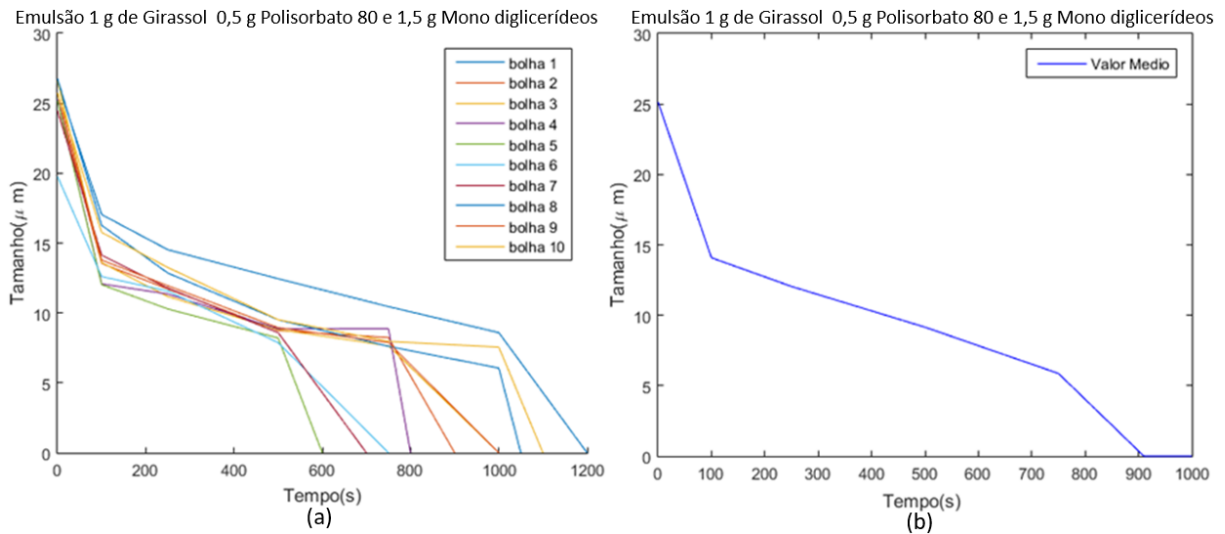


Figura 56 - Curva de estabilidade da população de microbolhas para emulsão de água, óleo de girassol, polissorbat 80 e mono e diglicerídeos (97: 1: 0,5: 1,5).

Fonte: Autoria própria.

A Figura 57 apresenta a curva média dos experimentos realizados com a emulsão de água deionizada, óleo de girassol e emulsificante polissorbat 80 associado ao emulsificante mono e diglicerídeos. Onde: (a) é a curva de estabilidade média em escala linear do tempo e (b) a curva apresentada em escala logarítmica do tempo.

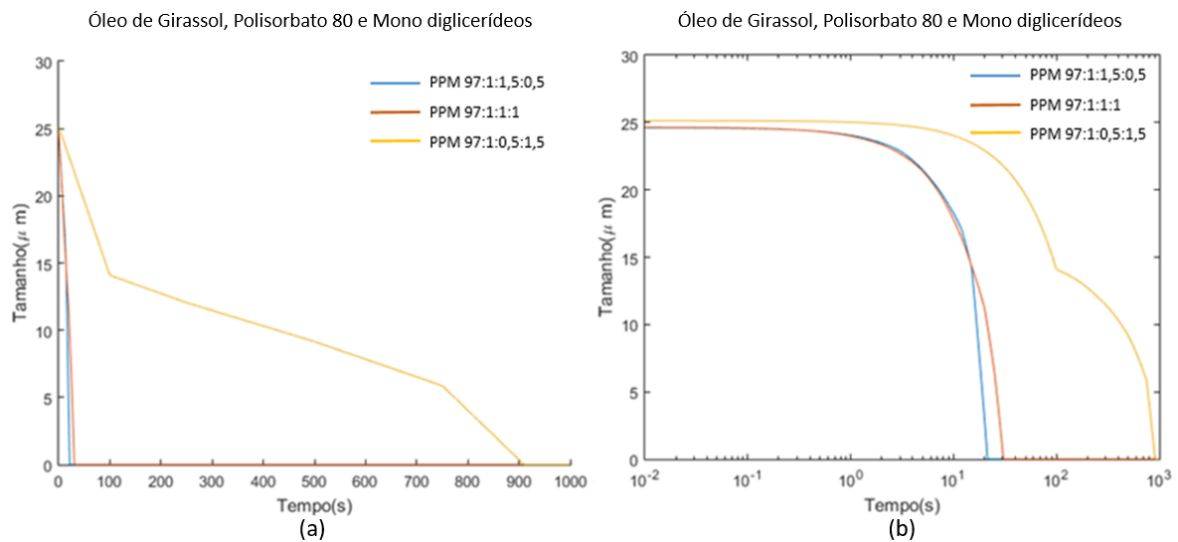


Figura 57 - Curva de estabilidade média dos experimentos com óleo de girassol e emulsificante polissorbat 80 associado ao emulsificante mono e diglicerídeos.

Fonte: Autoria própria.

Com estes dados, a maior estabilidade encontrada foi aproximadamente de 900 segundos. Pode ser observado que a curva de estabilidade que apresenta o melhor resultado com a emulsão composta de água deionizada, óleo de girassol e polissorbat 80 associado ao emulsificante mono e diglicerídeos, foi obtida com a emulsão de proporção de massa (PPM) de 97: 1: 0,5: 1,5, conforme mostra a Figura 57.

4.3.4 Análise comparativa da estabilidade das microbolhas entre as emulsões.

Com base nas curvas de estabilidades da população de microbolhas obtidas nas seções anteriores, pode ser elaborado um gráfico com as curvas de melhor estabilidade média obtida para cada composição de emulsão, apresentado pela Figura 58. Onde: (a) é a curva de estabilidade média em escala linear do tempo e (b) a curva apresentada em escala logarítmica do tempo.

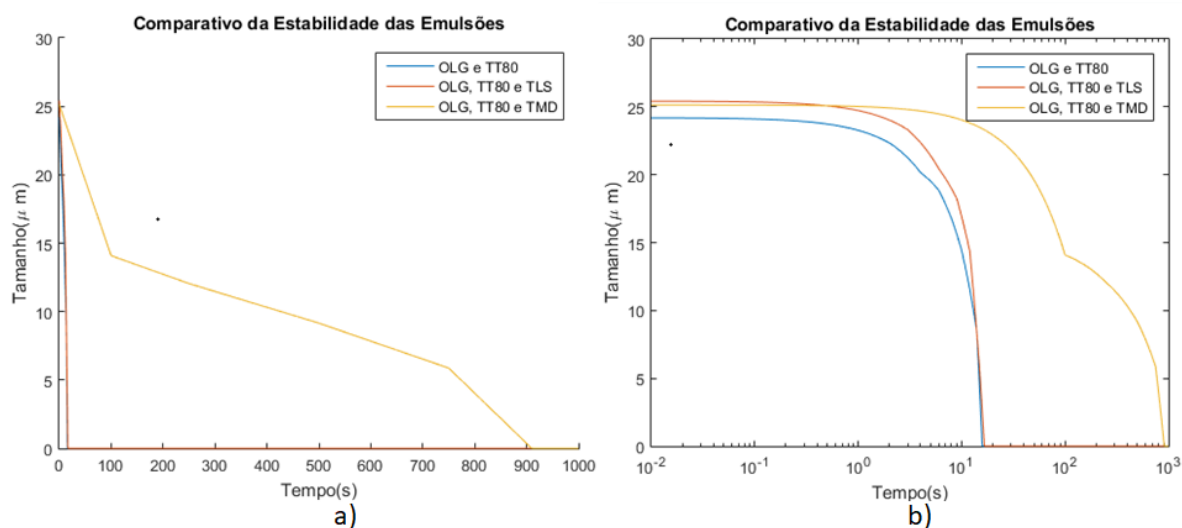


Figura 58 - Curva característica de estabilidade das emulsões.
Fonte: Autoria própria.

Na curva característica de estabilidade das emulsões pode ser observada que a emulsão composta de água deionizada (H_2O_{DEI}), óleo de girassol (OLG) e emulsificante polissorbato 80 (TT_{80}) associado ao emulsificante mono e diglicerídeo (TMD) na proporção de massa ($PPM = 97:1:0,5:1,5$), apresenta a melhor estabilidade da população de microbolhas em aproximadamente 900 segundos no estudo de estabilidade das emulsões.

Takamura et al. (1979) realizaram estudos com emulsão de óleo em água utilizando a parafina líquida como fase dispersa misturada à emulsionantes da família do polissorbato e do span. Em seus estudos foi constatada a maior estabilidade, em emulsões provenientes de associação de emulsificantes, comparada a uma emulsão com único emulsionante. Neste mesmo estudo, foi constatado o não aumento da estabilidade da emulsão para determinadas composição de emulsificantes utilizados na mistura, evidenciando a fundamental importância na seleção dos emulsionantes para produzir emulsões mais estáveis (TAKAMURA et al., 1979).

Em outro estudo realizado por Shen, Powell e Longo (2008), a estabilidade de emulsões utilizando fosfolipídios e emulsificantes alimentícios associados ao emulsionante estearato de

polietilenoglicol 40 (PEG40), verificou que a emulsão contendo lecitina de soja e PEG40 não produziu um revestimento estável, devido à baixa resistência a pressão e alta tensão superficial, sendo incapaz de formar uma monocamada de fase compacta à temperatura ambiente. Verificou-se também que certas misturas de emulsionantes podem obter um revestimento mais compacto em uma interface ar-água do que componentes individuais, relacionado à maior estabilidade de emulsão com associações de emulsificantes comparadas a emulsão com emulsificante único (SHEN; POWELL; LONGO, 2008).

Os resultados obtidos nestes estudos com o óleo de girassol corroboram com os estudos desenvolvidos por Takamura et al. (1979) e Shen, Powell e Longo (2008), que utilizaram outras matrizes lipídicas. Nestes estudos a emulsão com o óleo de girassol e emulsificante polissorbato 80 (único emulsificante) teve uma estabilidade inferior ao encontrado com a emulsão de óleo de girassol, emulsificante polissorbato 80 associado ao emulsificante mono e diglicerídeos. Neste mesmo estudo, também apresenta o resultado com a emulsão de óleo de girassol e emulsificante polissorbato 80 associado ao emulsificante lecitina de soja, que não apresentou uma estabilidade maior que o resultado obtido apenas com óleo de girassol e emulsificante polissorbato 80, corroborando com o estudo realizado por Shen, Powell e Longo (2008) na produção de um revestimento estável.

A análise da estabilidade de emulsões ainda é objeto de grande estudo devido à diversidade de substâncias simples e compostos que pode formar a camada de revestimento das microbolhas, bem como a compreensão da composição do revestimento na investigação da tensão superficial, do módulo de elasticidade interfacial, da perfusão, dos efeitos relativo à temperatura e pressão, e das características que envolvem os parâmetros de eclosão da microbolha por pulsos ultrassônicos (potência do sinal e frequência de ressonância) devido à composição da estrutura do revestimento.

5 CONCLUSÃO

A utilização da técnica de impressão 3D na fabricação possibilitou desenvolver um dispositivo de entroncamento microfluídico híbrido, capaz de gerar microbolhas monodispersas revestidas por matriz lipídica associada a emulsificantes na ordem de 16,55 μm de diâmetro, próximo da dimensão desejada para aplicações de uso clínico (diâmetro menor que 10 μm). O dispositivo híbrido foi capaz de produzir microbolhas com elevado grau de uniformidade, para uma população de 117 microbolhas. O índice de polidispersidade de 0,91% representa um valor muito próximo ao obtido por Stride (2009), isto é, em torno de 1%. Nos experimentos realizados por Araújo et al. (2012), o diâmetro médio das microbolhas produzidas foi de 73,74 μm , comparado a este resultado, o tamanho da microbolha obtido neste trabalho, proporcionou uma redução de 57,15 μm , ou seja, aproximadamente 77% menor.

O experimento realizado com o dispositivo de entroncamento híbrido, utilizando diferentes modelos de micropipetas, demonstrou a capacidade de produzir microbolhas pela utilização de três modelos específicos, com elevado grau de uniformidade e índice de polidispersidade entre 0,47% e 1,06%, valores muito próximos a 1% obtido por Stride (2009). Com a determinação da relação do diâmetro das microbolhas geradas a partir de um determinado diâmetro interno da micropipeta, foi possível obter uma curva característica que relaciona estes parâmetros através do uso de um polinômio de 2ª ordem. Os resultados encontrados foram comparados a outros dois estudos realizados, utilizando a matriz lipídica como revestimento da microbolha e ar como fase gasosa. No experimento realizado por Araújo et al. (2012), o diâmetro médio das microbolhas foi de 73,74 μm para uma micropipeta com diâmetro interno de 70 μm . Comparando estes dados com a curva característica gerada pelo polinômio, o diâmetro da micropipeta seria de 65,36 μm , um erro absoluto de 4,64 μm e erro percentual de 6,62%. No experimento realizado por Duncan e Needham (2004), a microbolha com raio inicial de 15 μm foi produzida e mantida na ponta de uma micropipeta de 4 μm . Para este caso, utilizando a mesma curva, o valor do diâmetro da micropipeta seria de 4,11 μm , um erro absoluto de 0,11 μm e erro percentual de 2,75%. Analisando os experimentos, pode-se concluir que a curva de estimativa obtida através da equação (4.1), possibilita a geração de microbolhas, utilizando o ar como componente gasoso e a matriz lipídica como revestimento, com dimensões de uso clínico (abaixo de 10 μm), utilizando micropipetas com diâmetro interno inferior a 3 μm . Com a recente comercialização de micropipetas pela fabricante Word Precision Instruments (WPI) de diâmetros de ponta interna de até 0,1 μm , certamente permitirá a produção de microbolhas menores

com o dispositivo híbrido. Além disso, de acordo com Jiang et al. (2016), o diâmetro das microbolhas pode ser reduzido até as dimensões necessárias para o uso clínico, utilizando múltiplos *T-junction*.

Nos testes em elevada taxa de produção de microbolhas, o dispositivo microfluídico híbrido desenvolvido em impressão 3D foi capaz de produzir cerca de 1800 bolhas por segundo, taxa de produção compatível com os dispositivos *T-junction*, produzidos pela técnica de litografia suave descrito em Rodríguez-Rodríguez et al. (2015), que é aproximadamente 1000 bolhas/s, nessa situação, o dispositivo microfluídico híbrido apresentou uma taxa de produção próxima de 2 vezes maior.

Nos experimentos realizados para analisar a estabilidade das microbolhas pela alteração da composição da fase dispersa da emulsão (óleo de girassol e emulsificante), foi possível determinar o aumento da estabilidade das microbolhas utilizando a emulsão composta pelos emulsificantes polissorbato 80 e mono e diglicerídeos com proporção de massa de 97: 1: 0,5: 1,5, em relação à emulsão contendo apenas o emulsificante polissorbato 80, corroborando com os estudos desenvolvidos anteriormente por Takamura et al. (1979) que utilizou a associação de emulsificantes da família do polissorbato e span, e os estudos de Shen, Powell e Longo (2008) com os emulsificantes alimentícios e PEG40. Neste mesmo experimento, a emulsão de óleo de girassol e emulsificante polissorbato 80 associado ao emulsificante lecitina de soja, não apresentou uma estabilidade maior que o resultado obtido com a emulsão com único emulsificante polissorbato 80, de acordo com os resultados encontrados por Shen, Powell e Longo (2008) com a emulsão de lecitina de soja e emulsificante PEG40.

6 TRABALHOS FUTUROS

Na continuidade deste trabalho, algumas melhorias e testes serão objetos de estudos para a realização de trabalhos futuros. Dentre estas, podem ser mencionados:

- Estudo da melhoria no controle da regulagem do fluxo e da pressão do sistema gasoso do aparato de geração de microbolhas por ajustes de maior precisão que os utilizados nestes experimentos. Os atuais modelos são por ajustes mecânicos (uso de manopla), sendo possíveis controles de regulagem digitais e retroalimentados.
- Realizar testes de estabilidade da microbolha alterando o ar (componente gasoso) pelo gás biocompatível hexafluoreto de enxofre, que possui massa molar aproximadamente cinco vezes maior que o ar. Conforme a equação de Epstein-Plesset, a substituição do componente gasoso por um de massa molar maior, propicia uma diminuição da taxa de variação do raio em função do tempo.
- Realizar testes com micropipetas de diâmetros internos inferiores a $3\ \mu\text{m}$ com os dispositivos microfluídicos, para produzir microbolhas com dimensões para uso clínico (inferior a $10\ \mu\text{m}$).
- Desenvolver e realizar testes com dispositivos de múltiplos *T-junctions*, analisando o comportamento na geração das microbolhas e a taxa de produção.
- Realizar estudos de um modelo matemático para a geração de microbolhas pela técnica *T-junction* em dispositivos híbridos.

7 ARTIGOS PUBLICADOS

- Artigo publicado no XXV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica 2016, Foz do Iguaçu – PR, com o título: “Geração de microbolhas monodispersas utilizando dispositivo de entroncamento microfluídico”.
- Artigo publicado na Revista Micromachines em 04 de agosto de 2018, com o título “Micropipette-Based Microfluidic Device for Monodisperse Microbubbles Generation”, <https://doi.org/10.3390/mi9080387>.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, Z. et al. Generation of multilayered structures for biomedical applications using a novel tri-needle coaxial device and electrohydrodynamic flow. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 5, n. 27, p. 1255–1261, 2008.

AMARA, S. et al. In vitro digestion of citric acid esters of mono- and diglycerides (CITREM) and CITREM-containing infant formula/emulsions. **Food & Function**, v. 5, n. 7, p. 1409, 2014.

ANNA, S. L.; BONTOUX, N.; STONE, H. A. Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels. **Applied Physics Letters**, v. 82, n. 3, p. 364–366, 2003.

ARAUJO, W. D. **Generation of Monodisperse Microbubbles using Sunflower Oil as Lipidic Coating**. Thesys. p. 1-69.: Federal University of Technology Paraná. Curitiba, Brasil., 2013.

ARAUJO, W. D.; SCHNEIDER, F. K.; MORALES, R. E. M. Evaluation of stability and size distribution of sunflower oil-coated micro bubbles for localized drug delivery. **BioMedical Engineering OnLine**, v. 11, n. 1, p. 71, 2012.

BANERJEE, R. Liposomes: Applications in Medicine. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 16, n. 1, p. 3–21, 2001.

BECKER, H.; GÄRTNER, C. Microfluidics and the life sciences. **Science Progress**, v. 95, n. 2, p. 175–198, 2012.

BEEBE, D. J.; MENSING, G. A.; WALKER, G. M. Physics and Applications of Microfluidics in Biology. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 4, n. 1, p. 261–286, 2002.

BEZ, M. et al. In situ bone tissue engineering via ultrasound-mediated gene delivery to endogenous progenitor cells in mini-pigs. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 390, p. 6, 2017.

BLOMLEY, M. J. K. et al. Science, medicine, and the future: Microbubble contrast agents: a new era in ultrasound. **BMJ**, v. 322, n. 7296, p. 1222–1225, 2001.

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.; QIN, S.; FERRARA, K. W. Ultrasound contrast agents. **Molecular imaging: Principles and practice**, v. 28, p. 425–444, 2009.

BRESLAUER, D. N.; LEE, P. J.; LEE, L. P. Microfluidics-based systems biology. **Molecular BioSystems**, v. 2, n. 2, p. 97, 2006.

CHEN, H.; HWANG, J. Ultrasound-targeted microbubble destruction for chemotherapeutic drug delivery to solid tumors. **Journal of Therapeutic Ultrasound**, v. 1, n. 1, p. 10, 2013.

CHEN, J. L. et al. Synthesis and characterization of transiently stable albumin-coated microbubbles via a flow-focusing microfluidic device. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 40, n. 2, p. 400–409, 2014.

CHIN, C. T.; BURNS, P. N. Predicting the acoustic response of a microbubble population for contrast imaging in medical ultrasound. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 26, n. 8, p. 1293–1300, 2000.

CHO, H. et al. Localized Down-regulation of P-glycoprotein by Focused Ultrasound and Microbubbles induced Blood-Brain Barrier Disruption in Rat Brain. **Scientific reports**, v. 6, n. August, p. 31201, 2016.

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.

CORDON-CARDO, C. et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 2, p. 695–8, 1989.

CUIGNET, O. Y.; BAELE, P. M. A Second-Generation Blood Substitute (Perflubron Emulsion) Increases the Blood Solubility of Modern Volatile Anesthetics In Vitro. **Blood**, p. 368–372, 2002.

DAYTON, P. A. et al. Optical and acoustical observations of the effects of ultrasound on contrast agents. **IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control**, v. 46, n. 1, p. 220–232, 1999.

DE JONG, N. et al. Optical imaging of contrast agent microbubbles in an ultrasound field with a 100-MHz camera. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 26, n. 3, p. 487–492, 2000.

DE JONG, N.; BOUAKAZ, A.; FRINKING, P. Basic acoustic properties of microbubbles. **Echocardiography (Mount Kisco, N.Y.)**, v. 19, n. 3, p. 229–40, 2002.

DUNCAN, P. B.; NEEDHAM, D. Test of the Epstein - Plesset Model for Gas Microparticle Dissolution in Aqueous Media: Effect of Surface Tension and Gas Undersaturation in Solution. **Langmuir**, v. 20, n. 7, p. 2567–2578, 2004.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Liposomes in analyses. **Talanta**, v. 68, n. 5, p. 1421–1431, 2006.

EH SUK, V. R.; MISRAN, M. Preparation, characterization and physicochemical properties of DOPE-PEG2000 stabilized oleic acid-soy lecithin liposomes (POLL). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 513, p. 267–273, 2017.

ENGL, W.; BACKOV, R.; PANIZZA, P. Controlled production of emulsions and particles by milli- and microfluidic techniques. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 13, n. 4, p. 206–216, 2008.

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.

ERRICO, C. et al. Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging. **Nature**, v. 527, n. 7579, p. 499–502, 2015.

FAROOK, U. et al. Preparation of microbubble suspensions by co-axial electrohydrodynamic atomization. **Medical Engineering and Physics**, v. 29, n. 7, p. 749–754, 2007.

FESHITAN, J. A. et al. Microbubble size isolation by differential centrifugation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 329, n. 2, p. 316–324, 2009.

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

FISCHER, P. et al. Rheological approaches to food systems. **Comptes Rendus Physique**, v. 10, n. 8, p. 740–750, 2009.

FU, 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.

GAÑÁN-CALVO, A. M.; GORDILLO, J. M. Perfectly Monodisperse Microbubbling by Capillary Flow Focusing. **Physical Review Letters**, v. 87, n. 27, p. 274501, 2001.

GARG, S.; THOMAS, A. A.; BORDEN, M. A. The effect of lipid monolayer in-plane rigidity on in vivo microbubble circulation persistence. **Biomaterials**, v. 34, n. 28, p. 6862–6870, 2013.

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, 2006.

GARSTECKI, P. et al. Formation of monodisperse bubbles in a microfluidic flow-focusing device. **Applied Physics Letters**, v. 85, n. 13, p. 2649–2651, 2004.

GRINSTAFF, M. W.; SUSLICK, K. S. Air-filled proteinaceous microbubbles: synthesis of an echo-contrast agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. September, p. 7708–7710, 1991.

GUO, F.; CHEN, B. Numerical study on Taylor bubble formation in a micro-channel T-junction using VOF method. **Microgravity Science and Technology**, v. 21, n. SUPPL. 1, 2009.

HETTIARACHCHI, K. et al. On-chip generation of microbubbles as a practical technology for manufacturing contrast agents for ultrasonic imaging. **Lab on a chip**, v. 7, n. 4, p. 463–468, 2007.

HWANG, J. Y. et al. Cell Deformation by Single-beam Acoustic Trapping: A Promising Tool for Measurements of Cell Mechanics. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 27238, 2016.

JAKOBSEN, J. Å. et al. Safety of ultrasound contrast agents. **European Radiology**, v. 15, n. 5, p. 941–945, 2005.

JIANG, X. et al. Combining microfluidic devices with coarse capillaries to reduce the size of monodisperse microbubbles. **RSC Advances**, v. 6, n. 68, p. 63568–63577, 2016.

JU, K.-Y. et al. pH-Induced aggregated melanin nanoparticles for photoacoustic signal amplification. **Nanoscale**, v. 8, n. 30, p. 14448–14456, 2016.

KANG, J. et al. Photoacoustic imaging of breast microcalcifications: A validation study with 3-dimensional ex vivo data and spectrophotometric measurement. **Journal of Biophotonics**, v. 8, n. 1–2, p. 71–80, 2015a.

KANG, J. et al. A prototype hand-held tri-modal instrument for in vivo ultrasound, photoacoustic, and fluorescence imaging. **Review of Scientific Instruments**, v. 86, n. 3, 2015b.

KIM, H. et al. Thermal therapeutic method for selective treatment of deep-lying tissue by combining laser and high-intensity focused ultrasound energy Thermal therapeutic method for selective treatment of deep-lying tissue by combining laser and high-intensity focused u. **OPTICS LETTERS**, v. 39, n. January 2016, p. 2806–2809, 2014.

KIM, W.; KIM, S. S. Synthesis of biodegradable triple-layered capsules using a triaxial electro spray method. **Polymer**, v. 52, n. 15, p. 3325–3336, 2011.

KINOSHITA, M. et al. Noninvasive localized delivery of Herceptin to the mouse brain by MRI-guided focused ultrasound-induced blood-brain barrier disruption. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 31, p. 11719–23, 2006.

KOOIMAN, K. et al. Sonoporation of endothelial cells by vibrating targeted microbubbles. **Journal of Controlled Release**, v. 154, n. 1, p. 35–41, 2011.

LEE, J. et al. Backscattering measurement from a single microdroplet. **IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control**, v. 58, n. 4, p. 874–879, 2011.

LEE, T. et al. Optical Characterization of Contrast Agents for Optical Coherence Tomography. **Proc. of SPIE**, v. 4967, p. 129–134, 2003.

LEE, Y. H.; BAI, M. Y.; CHEN, D. R. Multidrug encapsulation by coaxial tri-capillary electro spray. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 1, p. 104–110, 2011.

LENTACKER, I. et al. Understanding ultrasound induced sonoporation: Definitions and underlying mechanisms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 72, p. 49–64, 2014.

LIANG, H. et al. Sonoporation, drug delivery, and gene therapy. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**, v. 224, n. 2, p. 343–361, 2010.

LIN, G.; LEE, A. P. Microfluidics: An emerging technology for food and health science. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1190, p. 186–192, 2010.

LINDNER, J. R.; KAUL, S. Delivery of drugs with ultrasound. **Echocardiography (Mount Kisco, N.Y.)**, v. 18, n. 4, p. 329–37, 2001.

MACE, E. E. et al. Functional ultrasound imaging of the brain. **Nat Methods**, v. 8, n. 8, p. 662–664, 2011.

MANALIGOD, J. M. et al. Surfactant and partial liquid ventilation via conventional and high- frequency techniques in an animal model of respiratory distress syndrome. **Pediatr Crit Care Med**, v. 1, n. 1, p. 72–78, 2000.

MEHIER-HUMBERT, S. et al. Plasma membrane poration induced by ultrasound exposure: Implication for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 104, n. 1, p. 213–222, 2005.

MILLER, A. P.; NANDA, N. C. Contrast echocardiography: new agents. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 30, n. 4, p. 425–434, 2004.

MOLINA, C. A. et al. Microbubble administration accelerates clot lysis during continuous 2-MHz ultrasound monitoring in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. **Stroke**, v. 37, n. 2, p. 425–429, 2006.

MONTILLA, L. G. et al. Real-time photoacoustic and ultrasound imaging: a simple solution for clinical ultrasound systems with linear arrays. **Physics in Medicine and Biology**, v. 58, n. 1, p. N1-12, 2013.

NGUYEN, N.; WERELEY, S. T. **Fundamentals and Applications of Microfluidics**. 2nd. ed. Boston, London: Artech House., 2006.

NIKOLAEVSKII, A. N.; FILIPPENKO, T. A.; SERGOVSKAYA, T. S. Inhibiting Properties of Some Antioxidants. v. 14, n. ii, p. 102–106, 1980.

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

OGUZ, H. N.; PROSPERETTI, A. Dynamics of Bubble-Growth and Detachment from a Needle. **Journal of Fluid Mechanics**, v. 257, p. 111–145, 1993.

PANCHOLI, K. P. et al. Novel methods for preparing phospholipid coated microbubbles. **European Biophysics Journal**, v. 37, n. 4, p. 515–520, 2008.

PANCHOLI, K.; STRIDE, E.; EDIRISINGHE, M. Dynamics of Bubble Formation in Highly Viscous Liquids. **Lanmguir**, v. 1, n. 7, p. 4388–4393, 2008.

PARHIZKAR, M.; STRIDE, E.; EDIRISINGHE, M. Preparation of monodisperse microbubbles using an integrated embedded capillary T-junction with electrohydrodynamic focusing. **Lab on a chip**, p. 2437–2446, 2014.

PODELL, S. et al. Sheila Podell Cindy Burrascano Marc Gal et al Physical and Biochemical stability of Opsition.pdf. **Biotechnol. Appl. Biochem**, n. 30, p. 213–223, 1999.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J. et al. Generation of Microbubbles with Applications to Industry and Medicine. **Annual Review of Fluid Mechanics**, v. 47, n. 1, p. 405–429, 2015.

SACKMANN, E. K.; FULTON, A. L.; BEEBE, D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. **Nature**, v. 507, n. 7491, p. 181–189, 2014.

SAMIOTAKI, G. et al. Pharmacokinetic analysis and drug delivery efficiency of the focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening in non-human primates. **Magnetic**

Resonance Imaging, v. 37, p. 273–281, 2017.

SAPRA, P.; ALLEN, T. M. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. **Progress in Lipid Research**, v. 42, n. 5, p. 439–462, 2003.

SCHRAMM, G. A Practical Approach to Rheology and Rheometry. **Rheology**, p. 291, 1994.

SCHUTT, E. G. et al. Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: The key role of perfluorochemicals. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 42, n. 28, p. 3218–3235, 2003.

SHEN, Y.; POWELL, R. L.; LONGO, M. L. Interfacial and stability study of microbubbles coated with a monostearin/monopalmitin-rich food emulsifier and PEG40 stearate. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 321, n. 1, p. 186–194, 2008.

SIRSI, S. R.; BORDEN, M. A. Advances in ultrasound mediated gene therapy using microbubble contrast agents. **Theranostics**, v. 2, n. 12, p. 1208–1222, 2012.

SMITH, C. S. On blowing bubbles for Bragg's dynamic crystal model [1]. **Journal of Applied Physics**, v. 20, n. 6, p. 631, 1949.

SONG, J. H. et al. Real-time monitoring of HIFU treatment using pulse inversion. **Physics in Medicine and Biology**, v. 58, n. 15, p. 5333–5350, 2013.

SONG, S. et al. Self-assembled microbubbles as contrast agents for ultrasound/magnetic resonance dual-modality imaging. **Acta Biomaterialia**, v. 24, p. 266–278, 2015.

STEFFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**. 2. ed. East Lansing, MI: Freeman Press, 1996. v. 23

STRIDE, E. Physical principles of microbubbles for ultrasound imaging and therapy. **Cerebrovascular Diseases**, v. 27, n. 2, p. 1–13, 2009.

STRIDE, E.; EDIRISINGHE, M. Novel preparation techniques for controlling microbubble uniformity: A comparison. **Medical and Biological Engineering and Computing**, v. 47, n. 8, p. 883–892, 2009.

STRIDE, E.; EDIRISINGHE, M. Novel microbubble preparation technologies. **Soft Matter**, v. 4, n. 12, p. 2350–2359, 2008.

STRIDE, E.; SAFFARI, N. Microbubble ultrasound contrast agents: a review. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine**, v. 217, n. 6, p. 429–47, 2003.

SUSLICK, K. S.; GRINSTAFF, M. W. Protein Microencapsulation of Nonaqueous Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 21, p. 7807–7809, 1990.

TABELING, P. **Introduction to Microfluidics**. Oxford Uni ed. Oxford: Oxford University Press, 2005. v. 95

TACHIBANA, K.; TACHIBANA, S. Albumin microbubble echo-contrast material as

an enhancer for ultrasound accelerated thrombolysis. **Circulation**, v. 92, n. 5, p. 1148–1150, 1995.

TAITEL, Y.; DUKLER, E. A. A Model for Predicting Flow Regime Transitions in Horizontal and Near Horizontal Gas-liquid Flow. **AIChE Journal**, v. 22, n. 1, p. 47–55, 1976.

TAKAMURA, A. et al. Effects of Tween and Span Group Emulsifiers on the Stability of o/w Emulsions. **Chemical Pharm. Bull**, v. 27, n. 12, p. 2921–2926, 1979.

TEMESGEN, T. et al. Micro and nanobubble technologies as a new horizon for water-treatment techniques: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 246, p. 40–51, 2017.

TERASAKA, K. et al. Development of microbubble aerator for waste water treatment using aerobic activated sludge. **Chemical Engineering Science**, v. 66, n. 14, p. 3172–3179, 2011.

THORSEN, T. et al. Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. **Physical Review Letters**, v. 86, n. 18, p. 4163–4166, 2001.

TRÜBESTEIN, G. et al. Thrombolysis by ultrasound. **Clinical science and molecular medicine. Supplement**, v. 3, p. 697s–698s, 1976.

TSUNODA, S. et al. Sonoporation using microbubble BR14 promotes pDNA/siRNA transduction to murine heart. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 336, n. 1, p. 118–127, 2005.

TSUTSUI, J. M.; XIE, F.; PORTER, R. T. The use of microbubbles to target drug delivery. **Cardiovascular ultrasound**, v. 2, p. 23, 2004.

TUNG, Y.-S. et al. The mechanism of interaction between focused ultrasound and microbubbles in blood-brain barrier opening in mice. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 130, n. 5, p. 3059, 2011.

UNGER, E. C. et al. Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1291–1314, 2004.

UNGER, E. C.; MCCREERY, T.; WU, Y. (12) **United States Patent OXYGEN DELIVERY AGENTS AND USES FOR THE SAME**, 2003.

URDAHL, O.; FREDHEIM, A. O.; LOKEN, K. P. 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. 123–124, n. 96, p. 623–634, 1997.

VALLDEPERAS, M. et al. Sponge Phases and Nanoparticle Dispersions in Aqueous Mixtures of Mono- and Diglycerides. **Langmuir**, v. 32, n. 34, p. 8650–8659, 2016.

WALTON, C. B.; SHOHET, R. V. Tiny bubbles and endocytosis? **Circulation Research**, v. 104, n. 5, p. 563–565, 2009.

WHEATLEY, M. A.; SCHROPE, B.; SHEN, P. Contrast agents for diagnostic

ultrasound: development and evaluation of polymer-coated microbubbles. **Biomaterials**, v. 11, n. 9, p. 713–717, 1990.

WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. July, p. 368–373, 2006.

WOLF, G. K. et al. Gas exchange and lung mechanics during high frequency ventilation in the perflubron-treated lung. **Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies**, v. 9, n. 6, p. 641–646, 2008.

XIONG, R.; BAI, M.; CHUNG, J. N. Formation of bubbles in a simple co-flowing micro-channel. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 17, n. 5, p. 1002–1011, 2007.

YANG, F. Y. et al. Quantitative evaluation of the use of microbubbles with transcranial focused ultrasound on blood-brain-barrier disruption. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 4, p. 636–643, 2008.

YOON, S. et al. Direct and sustained intracellular delivery of exogenous molecules using acoustic-transfection with high frequency ultrasound. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 20477, 2016.

ZHAO, C. X.; MIDDELBERG, A. P. J. Two-phase microfluidic flows. **Chemical Engineering Science**, v. 66, n. 7, p. 1394–1411, 2011.

ZHAO, Y. Z. et al. Preparation, characterization and in vivo observation of phospholipid-based gas-filled microbubbles containing hirudin. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 31, n. 9, p. 1237–1243, 2005.

ZIMMERMAN, W. B. et al. On the design and simulation of an airlift loop bioreactor with microbubble generation by fluidic oscillation. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, n. 3, p. 215–227, 2009.

ZONG, L.; RAMANATHAN, S.; CHEN, C. C. Predicting thermophysical properties of mono- and diglycerides with the chemical constituent fragment approach. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 11, p. 5479–5484, 2010.