JULIANA DE NOVAIS SCHIANTI

**SISTEMAS MICROFLUÍDICOS APLICADOS NA PRODUÇÃO DE
MICRO E NANOPARTÍCULAS**

**SÃO PAULO
2012**

JULIANA DE NOVAIS SCHIANTI

**SISTEMAS MICROFLUÍDICOS APLICADOS NA PRODUÇÃO DE
MICRO E NANOPARTÍCULAS**

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

SÃO PAULO

2012

JULIANA DE NOVAIS SCHIANTI

**SISTEMAS MICROFLUÍDICOS APLICADOS NA PRODUÇÃO DE
MICRO E NANOPARTÍCULAS**

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Microeletrônica

Orientador: Prof.^º Titular Antônio Carlos Seabra

SÃO PAULO

2012

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, dede 20

Assinatura do autor

Assinatura do orientador

FICHA CATALOGRÁFICA

Schianti, Juliana de Novais

**Sistemas microfluídicos aplicados na produção de micro e nanopartículas / J.N. Schianti. -- São Paulo, 2012.
208 p.**

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos.

**1. Fabricação (Microeletrônica) 2. Nanopartículas (Produção)
I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos II. t.**

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Daniel, companheiro desta e de outras vidas.

Aos meus pais, Carlos e Zulmira, e minha irmã Elizandra.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.^o Titular, Dr. Antônio Carlos Seabra pela orientação e apoio constante oferecido neste trabalho.

Ao Prof.^o Dr. Mário Ricardo Gongora-Rúbio, pela orientação, amizade e pelo constante estímulo transmitido durante todo trabalho.

A Dra. Maria Filomena de Andrade Rodrigues, Diretora do CTPP – IPT, por disponibilizar as instalações do CTPP – IPT, para realização deste trabalho.

Ao Dr. Wagner Aldeia, chefe do Laboratório de Processos Químicos e Tecnologia das Partículas do IPT, pelo apoio, amizade e pelos recursos disponibilizados.

Aos Doutores: Adriano Marim, Natália Cerize e Silas Derenzo pelas inúmeras contribuições científicas a este trabalho, amizade e parceria.

Ao Laboratório de Sistemas Integráveis (LSI), pelos recursos disponibilizados, pela equipe técnica e pelas análises de MEV. Em especial, agradeço ao Júlio e ao Adir pela dedicação e paciência.

Ao Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos da UNICAMP, em especial à Prof.^a Dr.^a Lucimara Gaziola de La Torre pela parceria e pelas sugestões oferecidas ao trabalho e também, Prof.^a Dr.^a Maria Helena Andrade Santana pelas aplicações de dispositivos microfabricados.

Ao Laboratório de Materiais Magnéticos do IFUSP pelas deposições dos filmes de cromo, em especial ao Prof. Dr. Antônio Domingues e ao técnico Sérgio pela atenção.

Ao meu esposo Daniel, pelo amor e dedicação, imprescindíveis para enfrentar um desafio como este.

À minha família, que sempre me incentivou com alegria, principalmente meus pais Carlos e Zulmira, e minha irmã Elizandra.

Aos amigos do LPP-IPT, pelo carinho e pelo apoio: Márcio, Heloizy, Isabela, Elsa, Houari, Natália, Adriano, Kleber, Maria Helena, Silas, Wagner, Davi, Natanael, Dirceu, Gicelma, Bento, André, Vanessa, Karen e Arianne. Foi uma honra e uma enorme alegria trabalhar com todos vocês!

À Deus, por me permitir essa conquista e colocar diversos anjos no meu caminho, disfarçados na figura de Amigos!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (processo 142040/2008) pelo suporte financeiro à este trabalho.

“Os ideais que iluminaram meu caminho, e que sempre me deram uma nova coragem para encarar a vida, foram a bondade, a beleza e a verdade.”

Albert Einstein

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos sistemas microfluídicos para aplicações na produção de micro e nanopartículas. Os dispositivos microfluídicos foram microfabricados em vidros do tipo borossilicato e em cerâmica verde LTCC (Low Temperature Co-fired Ceramic). Para os dispositivos em vidro foram utilizadas técnicas de fotolitografia, corrosão úmida e soldagem por cola UV. Com estas técnicas foram produzidos sistemas planares com diversas geometrias, sistemas com dispositivos em paralelo com duas e três camadas de vidros. Além disso, dois polímeros o Benzociclobuteno (BCB) e o Parylene-C foram apresentados como ferramenta para a modificação da superfície do vidro de hidrofílica para hidrofóbica. A cerâmica LTCC foi utilizada para a produção de um sistema microfluídico para focalização hidrodinâmica em 3 dimensões. Os dispositivos microfabricados foram utilizados para estudos sobre a produção de emulsões simples e duplas, observando a influência de parâmetros como taxa de fluxo, razão entre fluxos e diferentes tipos de emulsificantes no tamanho das gotas e no tipo de corte obtido em cada situação. Observou-se que o tamanho máximo das gotas obtidas fica restringido ao tamanho do canal microfabricado, cerca de 50µm e o tamanho mínimo obtido foi de 15µm. Além da produção de emulsões, foi estudada a produção de nanosuspensões pela técnica de nanoprecipitação anti-solvente. Para este estudo, além das geometrias planares, foram testadas as geometrias 3D e também sistemas para o aumento de escala de produção, onde o sistema integrado possuía 4 dispositivos para nanoprecipitação. Os resultados obtidos indicaram que os sistemas microfluídicos permitem a produção de nanopartículas amorfas, na faixa de 100 a 1000 nm, com baixa polidispersão, sendo ainda reproduzíveis em sistema de maior escala. O desenvolvimento deste trabalho mostrou que a microfluídica oferece ferramentas importantes na obtenção de micro e nanopartículas.

Palavras-Chave: Microcanais, intensificação de processo, emulsão simples, emulsão dupla, nanoprecipitação, sistemas planares, sistemas em 3D.

ABSTRACT

In this work microfluidic systems were developed for applications in micro and nanoparticles production. Microfluidic devices were microfabricated in borosilicate glasses substrates and LTCC ceramic (Low Temperature Co-fired Ceramic). For glass devices were used techniques such as photolithography, wet etching and UV glue for sealing glass wafers. With these techniques were manufactured planar systems with various geometries, systems with devices in parallel with two and three glass layers. In addition, two polymers, BCB and Parylene-C, were presented as a tool for glass surface modification, from hydrophilic to hydrophobic. The ceramic LTCC was used for the production of a microfluidic system for hydrodynamic focusing in three dimensions. The devices were used for studies on the single and double emulsions production, observing the influence of parameters such as flow rate, ratio between flows and different types of surfactants at the droplet size and droplet cut type obtained in each situation. It was observed that the maximum size of the droplets obtained is restricted by the channel size, the maximum was about 50 μ m and the minimum size of 15 μ m. Besides, the devices were used to produce nanoparticles using anti-solvent nanoprecipitation technique. For these studies, besides the planar geometries, 3D geometries were tested and also systems for increasing scale production, where 4 devices were integrated in one system for nanoprecipitation. The results indicated that the microfluidic systems allow the production of amorphous nanoparticles in the range of 100 to 1000 nm with low polydispersity, being also reproducible in a larger scale system. The development of this work has shown that microfluidics offers valuable tools in obtaining micro-and nanoparticles.

Keywords: microchannel, process intensification, simple emulsion, double emulsion, nanoprecipitation, planar systems, systems in 3D.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1 Etapas do processo de microfabricação de sistemas microfluídicos	10
Figura 2-2. (a) Esquema da Fotolitografia, (b) perfil da corrosão úmida e (c) perfil da corrosão seca.....	11
Figura 2-3. Tipos de soldagem para sistemas microfabricados em vidros: (a) solda anódica, (b) solda com filme intermediário e (c) solda direta ^[5]	13
Figura 2-4. Exemplos de Interconexão em aço inoxidável: (a) interconexão baseada em aplicação de pressão e (b) interconexão baseada em solda ^[43,44]	15
Figura 2-5. Etapas do processo de microfabricação em LTCC adaptado de IBANEZ-GARCIA et.al. ^[49]	17
Figura 2-6. Esquema da Polimerização do Parylene.	20
Figura 2-7. Sequência das etapas de microfabricação: (a) deposição de cromo e fotoresiste na superfície do vidro; (b) fotolitografia; (c) revelação do fotoresiste e corrosão do cromo; (d) corrosão em HF; (e) vidro com microcanais; (f) deposição de Cola UV e exposição; (g) interconexões e sistema pronto.....	22
Figura 2-8. Sistema com canais em paralelo com 3 camadas de vidro: (a) vista lateral e (b) vista superior.	25
Figura 2-9. Esquema do sistema de focalização hidrodinâmica em 3D: (a) vista superior da geometria e (b) detalhe da focalização hidrodinâmica. (Auto CAD 3D)..	27
Figura 2-10. Esquema do processo de tratamento da superfície.	28
Figura 2-11. Reator CVD para deposição do Polímero Parylene-C, PDS 2010.....	29
Figura 2-12. Vidros com filmes de cromo com tratamento (azulada) e sem tratamento (cinza).	30
Figura 2-13. Vidros após a corrosão em HF por 20 min. (a) sem o tratamento térmico e (b) com o tratamento térmico.	31
Figura 2-14. Perfis de corrosão obtidos em Perfilômetro 3D:](a) perfil retangular e (b) perfil isotrópico.....	32
Figura 2-15. Gráficos da Profundidade corroída pelo tempo de corrosão para o vidro de microscopia.	33
Figura 2-16. Gráficos da Profundidade corroída pelo tempo de corrosão para o vidro borosilicato Schott 8330 utilizado para os sistemas em paralelo. Solução de HF:HCl:H ₂ O (1:1:3).....	34
Figura 2-17. Micrografia dos canais microfluídicos (MEV-LSI).....	35
Figura 2-18. Gráfico da Espessura do filme de cola pela rotação do spinner.	36
Figura 2-19. (a) processo de colagem do tubo Kovar e (b) detalhe da região onde o fluxo é focalizado.....	37
Figura 2-20. Medida de ângulo de contato na superfície do vidro: (a) sem tratamento - $\Theta = 25^\circ$; (b) tratada com Parylene-C, $\Theta = 105^\circ$ e (c) com BCB com $\Theta = 103^\circ$	38

Figura 2-21. Imagem de MEV do filme de Parylene-C sobre a superfície do vidro...	39
Figura 2-22. Tratamento da superfície nos sistemas microfluídicos para a produção de emulsão dupla: (a) sistema com filme de BCB e (b) sistema com Parylene-C.....	40
Figura 2-23. Sistemas Microfluídicos para a produção de micro e nanopartículas: (a) dispositivo para focalização de fluxo (b) focalização hidrodinâmica com ângulo de 45°; (c) geometria para produção de emulsão dupla, (d) geometria para obtenção de gotas do tipo junção T, (e) um exemplo do sistema em paralelo e (f) o sistema para focalização em 3D, microfabricado em LTCC.	42
Figura 3-1. Sistemas para produção de emulsões simples: (a) um sistema microfluídico de emulsificação ^[74,75] e (b) um sistema microfluídico microfabricado em LTCC para produção de emulsões ^[76]	45
Figura 3-2. Tipos de quebra de gotas: (a) fluxo confluyente; (b) fluxo cruzado e (c) quebra por estiramento ^[77]	46
Figura 3-3. (a) Gráfico da Razão entre Fluxos por Ca, com os 4 tipos de quebra de gotas e (b) imagens dos tipos de quebra de gotas correspondente a cada região do gráfico: (a) corte controlado pela geometria, (b) <i>thread formation</i> , (c) <i>dripping</i> e (d) <i>jetting</i> . ^[85]	50
Figura 3-4. Gráfico da relação entre o Ca e o fluxo disperso para uma geometria do tipo junção T ^[87]	51
Figura 3-5. Efeito do aumento do Número de Weber na formação de dupla emulsão. ^[88]	53
Figura 3-6. (a) Geometria Junção T com serpentina; (b) gotas formadas; (c) região de resfriamento, partículas ainda sem congelamento; (d) partículas congeladas. ⁽⁹⁵⁾	55
Figura 3-7. Emulsão Simples para Cristalização de Proteínas. (A) Geometria utilizada e (B) Proteínas Cristalizadas dentro das gotas ^[98]	56
Figura 3-8. Geometria com dupla junção T para produção de emulsão dupla e as gotas coloridas encapsuladas em gotas de óleo ^[84]	57
Figura 3-9. Formação de Tripla Emulsão. ^[88]	57
Figura 3-10. Geometrias para obtenção de emulsão simples: (a) FFD, (b) Junção T e (c) Junção T- 45°	59
Figura 3-11. Montagem experimental do sistema microfluídico em operação.....	60
Figura 3-12. Gráficos do tamanho da gota com relação a razão entre os fluxos R para diferentes concentrações de emulsificante: (a) 1% e (b) 0,5% em volume na Junção T.....	62
Figura 3-13. Gráficos do tamanho da gota com relação a razão entre os fluxos R para diferentes concentrações de emulsificante: (a) 1% e (b) 0,5% em volume, dispositivo Junção Y.....	63
Figura 3-14. Gráficos do tamanho da gota com relação a razão entre os fluxos R para diferentes concentrações de emulsificante: (a) 1% e (b) 0,5% em volume, dispositivo FFD.....	63

Figura 3-15. Histograma do tamanho das gotas pela vazão de água: (a) resultados para 1 % de T20 e (b) 0,5%.	64
Figura 3-16. Gráficos com a relação do tamanho da gota com a razão entre os fluxos ϕ , sendo (a) para o uso do Renex 100 e (b) para o Tween 20.	65
Figura 3-17. Valores do número de Capilaridade (Ca) para diversos valores de vazão de água (Q_c): (a) para Renex 100 e (b) para Tween 20.	67
Figura 3-18. Formação das gotas com ausência de emulsificante: (a) início da formação da gota e (b) gota gerada com formato plug.	69
Figura 3-19. Regimes de corte para diferentes valores de Ca utilizando o Renex 100.	70
Figura 3-20. Regimes de corte para diferentes valores de Ca utilizando o Tween 20.	71
Figura 3-21. Diferentes cortes das gotas para a geometria Junção Y e seus respectivos números de Capilaridade.	73
Figura 3-22. Diferentes tipos de corte de gotas utilizando geometria FFD e suas respectivas condições de operação.	74
Figura 3-23. Produção das gotas em diferentes valores de R	76
Figura 3-24. Esquema do sistema microfluídico para dupla emulsão A/O/A indicando as regiões hidrofílica e hidrofóbica.	78
Figura 3-25. Sistema Microfluídico para dupla emulsão em funcionamento.	79
Figura 3-26. Produção de Dupla Emulsão para diferentes condições, utilizando o emulsificante Tween 20.	82
Figura 3-27. Imagens obtidas por microscopia óptica da dupla emulsão produzida no sistema microfluídico.	83
Figura 3-28. Produção de dupla emulsão com o óleo triglicerídeo: (a) $Q_{\text{óleo}} = 30$, (b) $Q_{\text{óleo}} = 50$, (c) $Q_{\text{óleo}} = 75$ e (d) $Q_{\text{óleo}} = 100 \mu\text{L/min}$	84
Figura 3-29. Emulsão dupla: Gotas de vitamina B12 encapsuladas em óleo triglicerídeo com lecitina de soja como emulsificante.	85
Figura 3-30. Estudo da obtenção de emulsão dupla em sistema microfluídico tratado com BCB. (a) fase oleosa com fluxo de $100 \mu\text{L/min}$ e (b) $50 \mu\text{L/min}$. Fase mais externa e interna fixas em 200 e $25 \mu\text{L/min}$, respectivamente.	86
Figura 4-1. Comparação entre o tempo de mistura de um tanque convencional e um microreactor, (adaptação de Zhao et. al. ^[109]).	92
Figura 4-2. Microreator com geometria em Y para produção de nanopartículas de Danazol. ^[109]	92
Figura 4-3. (a) Esquema ilustrativo da nanoprecipitação de PLGA-PEG e (b) partículas obtidas. ^[116]	94
Figura 4-4. Focalização de fluxo para a produção de niossomas com diferentes emulsificantes. ^[118]	95

Figura 4-5. (a) Dispositivo microfluidico utilizado para a produção de lipossomas e (b) Focalização de fluxo para formação dos lipossomas. ^[122]	96
Figura 4-6. Geometria para dupla focalização de fluxo. Na primeira focalização há a formação de lipossomas e na segunda a inserção de fármaco dentro do lipossoma ^[124]	97
Figura 4-7. Estrutura Molecular da Rifampicina	98
Figura 4-8. Dispositivo microfluidico fabricado em vidro para nanoprecipitação de Rifampicina	101
Figura 4-9. Focalizações de fluxo para as diferentes razões e medidas de tamanho para cada experimento: (a) com razão igual a 10, (b) 30 e (c) 50	105
Figura 4-10. Nanosuspensões de Rifampicina para cada uma das três concentrações de partida utilizadas.	107
Figura 4-11. Gráficos de Pareto: (a) influência dos parâmetros no tamanho das partículas e em (b) influência no índice de polidispersão	108
Figura 4-12. Gráficos de Superfície Resposta	109
Figura 4-13. Comparação dos tamanhos obtidos para uma concentração de Rifampicina de 50 mg/mL: (a) com 1% de emulsificante e (b) sem emulsificante	110
Figura 4-14. Morfologia da Rifampicina crua e da Rifampicina processada nos sistemas microfluídicos: (a) observa-se a imagem da Rifampicina crua podendo-se notar o perfil cristalino do fármaco. (b) observa-se a imagem da Rifampicina processada. A rifampicina nano foi obtida com uso de Tween 20 a (1% v/v), mantendo-se o fluxo da fase contínua em 200 µL/min e R = 50, gerando partículas de 250nm.	112
Figura 4-15. Análise de FTIR para a Rifampicina crua e para a Rifampicina processada. A rifampicina nano foi obtida com uso de Tween 20 (1% v/v), mantendo-se o fluxo da fase contínua em 200 µL/min e R = 20, gerando partículas de 250nm.	113
Figura 4-16. Difrátogramas da Rifampicina crua e da Rifampicina processada em microcanal. A rifampicina nano foi obtida sem uso de Tween 20, mantendo-se o fluxo da fase contínua em 200 µL/min e R = 20, gerando partículas de 700nm.	114
Figura 4-17. Termogramas (DSC) para a Rifampicina crua e processada. A rifampicina nano foi obtida sem uso de Tween 20, mantendo-se o fluxo da fase contínua em 200 µL/min e R = 20, gerando partículas de 700nm.	115
Figura 4-18. Gráfico da Absorbância pela concentração de rifampicina em solução tampão.	116
Figura 4-19. Gráfico do percentual de dissolução ao longo do tempo para a rifampicina comercial e rifampicina nano obtida em sistema microfluídico. A rifampicina nano foi obtida sem uso de Tween 20, mantendo-se o fluxo da fase contínua em 200 µL/min e R = 20, gerando partículas de 700nm.	117
Figura 4-20. Gráfico do Comprimento da Difusão do Metanol em função da relação entre vazões R, sendo R= Qagua/QRif.	119

Figura 4-21. (a) Esquema indicando a região de difusão do microreator (4,5 cm). (b) Comprimentos de difusão nas três vazões de água utilizadas com $R=50$ e (c) Sistema em funcionamento para $R=50$ e vazão de água igual a $200 \mu\text{L}/\text{min}$	120
Figura 4-22. Gráfico do Comprimento da Difusão em função da Vazão de Metanol para diferentes R (10, 30 e 50).....	121
Figura 4-23. Gráfico do Comprimento da Difusão em função R para diferentes solventes, mantendo-se o fluxo da fase contínua em $200 \mu\text{L}/\text{min}$	122
Figura 4-24. Gráfico do tamanho das partículas de rifampicina em função de R , para diferentes solventes, mantendo-se o fluxo da fase contínua em $200 \mu\text{L}/\text{min}$	123
Figura 4-25. Focalização de fluxo com diferentes solventes: (a) metanol, (b) isopropílico e (c) etanol. A fase contínua foi mantida em $200 \mu\text{L}/\text{min}$ e a relação entre fases R igual a 50.....	124
Figura 5-1. Sistema Microfluídico com focalização em 3D para a produção de lipossomas. Adaptado de Davis et.al. ^[137]	127
Figura 5-2. Sistema de Focalização 3D para processo de nanoprecipitação de PLGA, adaptado de REE et. al. ^[138]	128
Figura 5-3. Geração de gotas variando tensão elétrica (0 - 2000V). ^[139]	128
Figura 5-4. Sequência de formação do Cone de Taylor, extraído de ZENG, J. ^[145]	129
Figura 5-5. Dispositivo Microfluídico em 3-D operando para nanoprecipitação de rifampicina.....	133
Figura 5-6. Gráfico do tamanho de partícula pela variação de tensão para diferentes taxas de fluxo. No experimento foram testados 4 valores de fluxo da fase contínua (Q_c), sendo mantida a relação entre fases R igual a 20.	133
Figura 5-7. Rifampicina processada em sistema microfluídico 3D com uso de alta tensão.	134
Figura 5-8. Gráfico do tamanho das partículas pela variação de R , para dois distintos solventes: Isopropílico e Metanol.	135
Figura 5-9. Micrografia da Benzofenona-3 processada em sistema microfluídico utilizando um fluxo de fase contínua de $500 \mu\text{L}/\text{min}$ e uma relação entre fase R de 50.	136
Figura 5-10. Gráfico do tamanho das partículas de Benzophenona-3 pela tensão elétrica aplicada em kV. A fase contínua (Q_c) utilizada foi de 500 e $1000 \mu\text{L}/\text{min}$, com relação entre fases R igual a 20.....	136
Figura 5-11. Sistema microfluídico 3D em operação para produção de partículas de alginato de sódio.	137
Figura 5-12. Partículas de Alginato observadas por microscopia ótica: (a) após processo microfluídico e (b) após etapa de gelificação.....	138
Figura 5-13. Gráfico do tamanho da partícula de alginato de sódio pela variação da relação entre as fases R . O fluxo da fase contínua foi fixado com os valores da legenda. O fluxo da fase dispersa é determinado por R	139

Figura 5-14. Gráfico do Tamanho da Partícula de Alginato pela variação de R para diferentes tensões e valores de fluxo da fase contínua (Q_c) fixados com os valores da legenda. O fluxo da fase dispersa é determinado por R.	140
Figura 6-1. Sistema em paralelo com distribuição de fluxos por ramificação, microfabricado em acrílico, para incorporação de gás CO_2 na água. Adaptado de Yue et.al. ^[147]	143
Figura 6-2. Sistema microfluídico com canais em paralelo para troca de calor entre gases. (a) imagem da distribuição dos campos de velocidade e imagem da microfabricação em LTCC. Extraído de Vázquez –Alvarez et. al. ^[148]	144
Figura 6-3. Sistema Microfluídico em Paralelo para Produção de Gotas Janus. (a) esquema de interconexão do sistema, (b) sistema microfluídico e (c) sistema em operação, para geração de gotas. Adaptado de Nisisako et. al. ^[149]	145
Figura 6-4. Sistema microfluidico com canais seis em paralelo e reservatórios para a distribuição dos fluxos de entrada. (a) desenho do sistema e (b) sistema em operação. Extraído de Mulligan e Rothstein ^[150]	146
Figura 6-5. Sistema Microfluídico em Paralelo para Produção de Emulsão Simples. Extraído de Li et. al. ^[151]	146
Figura 6-6. Esquema de Ramificação de Canais. Extraído de Emerson et. al. ^[152]	147
Figura 6-7. Sistema em paralelo com distribuição de fluxos por reservatório	150
Figura 6-8. Sistema em paralelo com distribuição de fluxos por ramificação: (a) base com canais para distribuição de água e focalização; (b) camada intermediária com furos e (c) camada com canais para distribuição da rifampicina.....	151
Figura 6-9. Esquema de distribuição por ramificação com 3 gerações.....	152
Figura 6-10. Sistema microfluídico com canais em paralelo e distribuição de fluxos por reservatório.....	153
Figura 6-11. Focalização de Fluxo para o sistema com distribuição por reservatório: (a) para $R = 5$, rendendo partícula de 950 nm e (b) para $R = 20$ rendendo partícula de 250 nm.....	154
Figura 6-12. Sistema em Paralelo com distribuição de Fluxos por Ramificação.....	155
Figura 6-13. Focalização de Fluxo para o sistema com distribuição por ramificação: (a) para $R = 5$, rendendo partícula de 950 nm e (b) para $R = 17.5$ rendendo partícula de 350 nm.....	156
Figura 6-14. Gráfico da relação do tamanho das partículas pela variação da razão entre fluxos (R) para diferentes valores de taxa de fluxo de água aplicados no sistema em paralelo com distribuição de fluxos por reservatório.....	157
Figura 6-15. Gráfico da relação do tamanho das partículas pela variação da razão entre fluxos (R) para diferentes valores de taxa de fluxo de água aplicados no sistema em paralelo com distribuição de fluxos por ramificação.....	158
Figura 6-16. Gráfico da relação do tamanho das partículas pela variação da razão entre fluxos (R) para as 4 saídas do sistema em paralelo com distribuição de fluxos por reservatório.....	159

Figura 6-17. Gráfico da relação do tamanho das partículas pela variação da razão entre fluxos (R) para as 4 saídas do sistema em paralelo com distribuição de fluxos por ramificação.....160

Figura 6-18. Micrografia Eletrônica de Varredura das nanopartículas de rifampicina obtida em sistema de microcanais em paralelo com distribuição por reservatório.....161

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 DIVISÃO DOS CAPÍTULOS.....	5
1.2 OBJETIVOS	5
1.2.1 <i>Objetivos Tecnológicos.....</i>	<i>6</i>
1.2.2 <i>Objetivos em aplicações da Microfluídica em Processos Químicos Particulados</i>	<i>6</i>
2. MICROFABRICAÇÃO.....	8
2.1 ESTADO DA ARTE.....	8
2.1.2 <i>Microfabricação em Vidro</i>	<i>9</i>
2.1.3 <i>Microfabricação em LTCC.....</i>	<i>16</i>
2.1.4 <i>Tratamento de Superfície</i>	<i>18</i>
2.2 EXPERIMENTAL.....	21
2.2.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
2.2.1.1 <i>Microsistemas em Vidro</i>	<i>21</i>
2.2.1.2 <i>Microfabricação em LTCC.....</i>	<i>25</i>
2.2.1.3 <i>Tratamento de Superfície</i>	<i>28</i>
2.3 RESULTADOS.....	30
2.3.1 <i>Ensaio da Microfabricação em Vidro</i>	<i>30</i>
2.3.2 <i>Microsistemas em LTCC.....</i>	<i>37</i>
2.3.3 <i>Tratamento de Superfície</i>	<i>37</i>
2.3.4 <i>Dispositivos Microfabricados</i>	<i>41</i>
2.4 CONCLUSÕES PARCIAIS	43
3. EMULSÕES.....	44
3.1 ESTADO DA ARTE.....	44
3.1.1 <i>Aspectos Físicos da Formação das Gotas</i>	<i>48</i>
3.1.2 <i>Emulsificantes.....</i>	<i>53</i>

3.1.3	<i>Emulsões Simples</i>	54
3.1.4	<i>Emulsões Duplas</i>	56
3.2	EXPERIMENTAL.....	58
3.2.1	<i>EMULSÃO SIMPLES EM MICROCANAIS</i>	58
3.2.1.1	<i>Materiais e Métodos</i>	59
3.2.1.2	<i>Resultados</i>	61
3.2.2	<i>EMULSÕES DUPLAS NOS MICROCANAIS</i>	77
3.2.2.1	<i>Materiais e Métodos</i>	77
3.2.2.2	<i>Resultados</i>	80
3.3	CONCLUSÕES PARCIAIS	86
4.	NANOPRECIPITAÇÃO	88
4.1	ESTADO DA ARTE	88
4.1.1	<i>Processos de Cristalização</i>	88
4.1.2	<i>Importância da nanoescala</i>	89
4.1.3	<i>Nanoprecipitação em Dispositivos Microfluídicos</i>	90
4.1.4	<i>Rifampicina</i>	97
4.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	100
4.2.1	<i>MATERIAIS E MÉTODOS</i>	100
4.3	RESULTADOS	104
4.3.1	<i>Focalização Hidrodinâmica e Tamanho das Partículas</i>	104
4.3.2	<i>Análise MEV – Morfologia das Nanopartículas</i>	111
4.3.3	<i>Análise por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier</i> 113	
4.3.4	<i>Análise de Difração de Raios-X</i>	114
4.3.5	<i>Análise Térmica (DSC)</i>	115
4.3.6	<i>Ensaio de Dissolução</i>	116
4.3.7	<i>Ensaio com diferentes solventes – cálculo da difusão</i>	117
4.4	CONCLUSÕES PARCIAIS	125

5. FOCALIZAÇÃO DE FLUXO EM 3 DIMENSÕES	126
5.1 ESTADO DA ARTE	126
5.1.1 <i>Cone de Taylor na produção de nanopartículas</i>	<i>129</i>
5.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	130
5.2.1 <i>Ensaio com Rifampicina – Nanoprecipitação</i>	<i>131</i>
5.2.2 <i>Ensaio com Benzofenona-3 – Nanoprecipitação</i>	<i>131</i>
5.2.3 <i>Ensaio com Alginato – Emulsão Simples e Gelificação Iônica</i>	<i>131</i>
5.3 RESULTADOS	132
5.3.1 <i>Ensaio com Rifampicina</i>	<i>132</i>
5.3.2 <i>Ensaio com Benzofenona-3</i>	<i>134</i>
5.3.3 <i>Ensaio com Alginato de Sódio</i>	<i>137</i>
5.4 CONCLUSÕES PARCIAIS	141
6. AUMENTO DE ESCALA DE PRODUÇÃO	142
6.1 ESTADO DA ARTE	142
6.1.1 <i>Sistemas Microfluídicos com Microcanais em Paralelo</i>	<i>142</i>
6.1.2 <i>Sistemas Microfluídicos baseados na Lei de Murray</i>	<i>147</i>
6.2 EXPERIMENTAL	149
6.3 RESULTADOS	153
6.4 CONCLUSÕES PARCIAIS	162
CONCLUSÕES GERAIS	163
TRABALHOS FUTUROS	165
PUBLICAÇÕES E PATENTES	166
Anexo I – Desenvolvimento da Equação da Continuidade	168
Anexo II – Especificações dos Materiais Utilizados na Microfabricação	172
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	173

1. INTRODUÇÃO

A Microfluídica é uma ciência e tecnologia que tem se apresentado como uma grande ferramenta em áreas como análises químicas, biotecnologia e processos químicos. Este ramo, nascido no final dos anos 70 com o advento das impressoras jato de tinta, diversificou-se. Hoje em dia, encontram-se sistemas capazes de separar, detectar ou filtrar substâncias, misturadores de soluções, microválvulas e microbombas, e por fim, sistemas para obtenção de partículas e outros produtos ^[1,2].

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, vidros e cerâmicas. Os substratos são escolhidos conforme a aplicação e os sistemas podem ainda apresentar construções complexas envolvendo eletrodos, termopares, sistemas ópticos, válvulas entre outros ^[3,4,5].

Uma das áreas de grande interesse de aplicação dos sistemas microfluídicos na área de Processos Químicos é a produção de micro e nanopartículas. As vantagens oferecidas pela microfluídica como processo contínuo, consumo controlado de reagentes, fluxo laminar com grande transferência de massa e temperatura e baixo tempo de residência, permitem a formação de partículas com tamanhos, formatos e características físico-químicas controladas ^[6]. Micro e nanopartículas são produzidas normalmente em processos batelada que envolvem maior consumo de energia em processos de misturas em alta pressão, necessitando de etapas de homogeneização de tamanhos e filtração. Além disso, no caso das nanopartículas, os processos em batelada apresentam dificuldades na reprodutibilidade de tamanho, sua distribuição e qualidade das partículas de processo a processo.

A produção de emulsões nos sistemas microfluídicos é primeiro exemplo da aplicação dos dispositivos para obtenção de partículas na microescala. As emulsões são constituídas de gotas dispersas em outra fase líquida imiscível e são importantes na obtenção de cremes, encapsulação de reagentes e fármacos, entre

outras aplicações ^[7,8]. As emulsões podem ser simples ou duplas, 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 microreatores e do controle dos fluxos da fase contínua e da fase dispersa. Por conta das características dos fluidos e das condições de fluxo escolhidas, o fluxo a ser disperso sofre constrição, quebrando em gotas por conta de instabilidades na interface entre os dois fluidos. Nos processos ativos a quebra das gotas se dá com atuação pneumática, com uso de piezoelétricos ou ainda com uso de eletrodos, podendo gerar gotas na escala micrométrica ^[9].

A escolha do substrato, material utilizado na microfabricação dos dispositivos microfluídicos, delimita a produção das emulsões. A cerâmica, por exemplo, permite a fabricação de sistemas com canais em 3D, favorecendo a mistura entre os fluidos e permitindo a produção de partículas pela técnica de evaporação de solventes. Os polímeros, como o polidimetilsiloxano (PDMS), permitem a produção de sistemas ativos onde membranas são atuadas por sistemas piezoelétricos que farão a quebra do fluxo disperso em gotas. Além disso, as características de hidrofobicidade do substrato determinam o tipo de emulsão obtida: dispersões de óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O). O tratamento dos substratos para modificação das características de superfície, como silanizações e modificações por plasma, permitem a obtenção de duplas emulsões, por exemplo, e também oferecem maior versatilidade a um mesmo substrato ^[10,11].

Os sistemas microfluídicos têm sido também aplicados na síntese de nanopartículas com resultados promissores. As nanopartículas podem ser obtidas nos microreatores a partir de processos como precipitação por evaporação de solventes ou adição de antissolvente, por reação de oxidação-redução, hidrólise, técnicas sol-gel. Podem ser sintetizadas nanopartículas poliméricas, partículas orgânicas como proteínas, metais, óxidos, semicondutores e fármacos diversos. Novamente, o tamanho controlado com baixo índice de polidispersão são as grandes vantagens oferecidas pela microfluídica ^[12,13].

Da mesma maneira que no caso da produção de emulsões, o substrato determina a possibilidade de aplicação para obtenção de nanopartículas. Determinados materiais para microfabricação podem favorecer o entupimento dos canais, por conta das características da superfície do substrato que faz com que as

nanopartículas possam se depositar nas paredes. Os polímeros oferecem dispositivos de baixo custo e de rápida obtenção, no entanto não podem ser utilizados com alguns solventes ou mesmo em reações que envolvem mais altas temperaturas. Os vidros oferecem, assim como os polímeros, avaliações imediatas do processo de produção das partículas e ainda são inertes aos solventes, mas não oferecem boa condutividade térmica. A cerâmica tem sido aplicada para processos onde há reações com altas temperaturas, assim como os substratos de metal. O silício também possui aplicações por ter boas características eletrônicas, térmicas e químicas [12,13, 14].

Após a escolha do substrato correto, há a escolha dos processos de microfabricação adequados. Uma das etapas da microfabricação é o processo de selagem ou soldagem dos sistemas, criando dispositivos fechados. Na área de Microfabricação, os processos de soldagem/selagem são conhecidos como processos de encapsulamento. Em aplicações onde há a necessidade da inserção de fluidos em alta pressão, faz-se importante escolher um processo de soldagem que suporte essas pressões. Dependendo do tipo de fluido envolvido nas reações, as vias de acesso devem também suportar altas pressões, temperaturas ou serem inertes quimicamente. Tratamentos de superfície são necessários para modificar superfícies de hidrofóbicas para hidrofílicas ou vice-versa [5].

Diante desse cenário, este trabalho teve como proposta desenvolver sistemas microfluídicos em vidro e cerâmica LTCC (*Low Temperature Co-fired Ceramic*) para a produção de micro e nanopartículas. Algumas etapas do processo de microfabricação foram realizadas utilizando a infraestrutura do Laboratório de Sistemas Integráveis da POLI (USP) e desenvolvimento das emulsões e nanosuspensões foram realizadas nas dependências do Laboratório de Processos Químicos e Tecnologia da Partícula do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (LPP-IPT). Os sistemas microfluídicos microfabricados foram utilizados para quatro aplicações distintas: a produção de emulsões simples e duplas, para a nanoprecipitação de fármacos em sistemas com geometria 2D e 3D, e por fim sistemas em paralelo para aumento da eficiência de produção.

As técnicas de microfabricação em vidro e LTCC já são conhecidas na literatura, entretanto, a contribuição deste trabalho de doutorado no setor de microfabricação foi implementação de novas geometrias como o dispositivo de

focalização em 3-D fabricado em LTCC, utilizar novos tratamentos de superfície para a produção de emulsão dupla como o uso do Parylene-C e do polímero BCB, utilizar técnicas de microfabricação em vidro mais econômicas também para os sistemas em paralelo e a produção dos sistemas em paralelo em 3 camadas para uma melhor distribuição dos fluxos.

No que diz respeito às aplicações, este trabalho teve como contribuição o estudo de diferentes emulsificantes e sua influência na formação de gotas monodispersas. Nesse estudo compararam-se três conhecidas geometrias, onde se percebeu que em termos de tamanho de gotas as geometrias não possuem diferenças significativas e que a escolha da melhor geometria fica determinada por limitações do substrato como tamanho ou ajuste com outras geometrias em dispositivos mais complexos. Na produção de emulsão dupla foram observados parâmetros como influência do tamanho do canal, razão entre fluxos e tipos de corte possíveis utilizando os dois polímeros, o benzociclobuteno (BCB) e Parylene-C, como tratamento de superfície.

O processo de nanoprecipitação foi uma das maiores contribuições desse trabalho, sendo observada em sistema simples de um único canal e sistema com canais em paralelo, aumentando a eficiência de produção das nanopartículas. Os resultados mostraram que a produção de nanopartículas em sistemas microfluídicos é um processo viável, gerando partículas na escala nanométrica e com modificação em seu perfil cristalino, melhorando a biodisponibilidade do medicamento. Os sistemas poderão ser utilizados para sínteses de outros tipos de fármacos, melhorando o desempenho, sem alteração da composição química e sem necessidade de adição de outros elementos. O processo de nanoprecipitação em paralelo mostrou resultados semelhantes aos obtidos em sistema simples, permitindo o escalonamento do processo, aumentando a taxa de fluxo de $\mu\text{L}/\text{min}$ para mL/min .

Os estudos realizados neste trabalho podem ainda ser aprimorados e sugestões são apresentadas no último capítulo. Os resultados obtidos são contribuições importantes da Microfluídica para a área de Processos Químicos.

1.1 DIVISÃO DOS CAPÍTULOS

O presente trabalho foi dividido em sete capítulos, sendo eles:

Capítulo 1: introdução relatando os objetivos gerais e específicos e as motivações deste trabalho.

Capítulo 2: onde são relatados os processos de microfabricação envolvidos, utilizando Vidro e Cerâmica LTCC e fabricação dos dispositivos microfluídicos a serem usados.

Capítulo 3: são relatados os estudos de obtenção de emulsões simples e duplas.

Capítulo 4: são mostrados os resultados da geração de nanopartículas por processo de nanoprecipitação em microcanais.

Capítulo 5: são apresentados os resultados dos processos envolvendo um sistema microfluídico com focalização em 3D para a produção de micro e nanopartículas.

Capítulo 6: são apresentados os resultados obtidos para os sistemas em paralelo, utilizando também o processo de nanoprecipitação.

Capítulo 7: Conclusões Gerais.

1.2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo central o desenvolvimento de sistemas microfluídicos para aplicações na produção de micro e nanopartículas. O propósito é gerar novos dispositivos a partir das técnicas tradicionais de microfabricação para melhorar o desempenho de processos químicos, em particular para a produção de emulsões e nanosuspensões, resultando em tecnologias mais seguras, compactas, ambientalmente corretas e energeticamente eficientes.

O trabalho foi dividido em dois grandes blocos para melhor definição das etapas do trabalho, sendo um bloco o tecnológico referente às ações de

microfabricação dos dispositivos e o segundo grande bloco, referente às aplicações em processos químicos particulados.

1.2.1 Objetivos Tecnológicos

Os objetivos específicos do bloco tecnológico foram desenvolver:

- Sistemas microfluídicos em vidro (lâminas de microscopia e vidros especiais para microfabricação) envolvendo melhorias nas etapas de microfabricação como corrosão, encapsulamento/selagem e tratamento de superfícies com polímeros como o BCB e o Parylene-C.
- Sistemas microfluídicos em vidro, a partir dos primeiros estudos de microfabricação, para produção de partículas em maior escala, os chamados sistemas em paralelo.
- Sistemas microfluídicos em LTCC com focalização hidrodinâmica em 3-D, utilizando tubo de aço-inox e inserção de eletrodos para a aplicação de alta tensão.

1.2.2 Objetivos em aplicações da Microfluídica em Processos Químicos Particulados

Com os dispositivos desenvolvidos, serão realizadas as seguintes aplicações pertinentes ao setor de Processos Químicos, especificamente em Tecnologia de Partículas:

- Produção de emulsão simples e dupla, com as devidas modificações de superfície quando necessário, avaliação do uso de emulsificantes e caracterização das partículas obtidas.
- Fabricação de nanopartículas por nanoprecipitação, nesta aplicação está sendo apresentado o exemplo da nanoprecipitação do fármaco rifampicina, antibiótico importante no combate a Tuberculose. O processo de nanoprecipitação foi estudado em sistema microfluídico com geometria para

focalização hidrodinâmica planar, em sistema para focalização hidrodinâmica em 3D e em sistema planar, com canais em paralelo, para aumento de escala de produção.

2. MICROFABRICAÇÃO

2.1 ESTADO DA ARTE

No final da década de 70, a microfluídica surgiu como sendo parte da tecnologia de sistemas microeletromecânicos (MEMS), utilizando-se da infraestrutura e de técnicas de fabricação bem estabelecidas na Microeletrônica. O desenvolvimento das impressoras inkjet iniciou o ramo da Microfluídica, onde canais e tubos com dimensões na escala do micrometro realizam operações com fluidos. Para obtenção de estruturas com essas dimensões, técnicas como fotolitografia, técnicas de corrosão e de deposição de filmes são amplamente utilizadas ^[3,1,15].

O primeiro dispositivo microfluídico com aplicação em análise química foi produzido em 1979, publicado por pesquisadores da Universidade de Stanford, e tinha como função análise de gases por cromatografia ^[16]. Inicialmente, o silício apresentou-se como substrato natural para a produção de sistemas microfluídicos, aproveitando-se do desenvolvimento técnico existente na Microeletrônica. Atualmente o silício ainda é muito utilizado para a produção dos sistemas, entretanto, nas últimas décadas o uso de outros materiais como vidros ^[17], polímeros diversos ^[18] e materiais cerâmicos ^[19] tem sido também muito empregados.

Todos os materiais citados possuem vantagens e desvantagens dependendo da aplicação desejada. A possibilidade de integração com a eletrônica e com dispositivos ópticos; a resistência química a determinados solventes ou resistência térmica e mecânica; a facilidade de visualização e acompanhamento de fenômenos; possibilidade de confecção de canais complexos em três dimensões são características importantes e que devem ser levadas em consideração no momento de se escolher um substrato para a confecção dos sistemas microfluídicos.

Nas aplicações almejadas para o presente trabalho, os vidros oferecem vantagens como serem quimicamente resistentes; possuírem uma superfície hidrofílica e que pode ser modificada para hidrofóbica; transparência, permitindo o acompanhamento dos fenômenos ou mesmo o acoplamento com dispositivos

ópticos; resistência térmica e permitirem o uso de técnicas de microfabricação mais baratos. Já a cerâmica LTCC é um substrato útil na fabricação de sistemas em 3 dimensões que favorecem a mistura, além de ser compatível com a tecnologia de filmes espessos importantes na inserção de eletrodos de referência que serão utilizados neste trabalho.

2.1.2 Microfabricação em Vidro

A microfabricação de sistemas microfluídicos pode ser dividida em três grandes etapas, sendo que cada etapa oferece uma gama de possibilidades no que diz respeito às técnicas de microfabricação. A primeira etapa consiste na produção dos microcanais, a segunda etapa envolve o processo de encapsulamento/selagem, que envolvem soldagem ou colagem para a que haja vedação do sistema e por fim, a etapa de interconexão com meio externo que além das vias de acesso aos fluidos pode contar ainda com conexões elétricas, térmicas ou ópticas. O diagrama ilustrado na Figura 2-1 indica as três etapas e suas possibilidades na microfabricação em vidro.

Figura 0-1 Etapas do processo de microfabricação de sistemas microfluídicos

✓ **Obtenção dos Microcanais**

Para a confecção dos microcanais em vidro pode-se utilizar a escrita direta com uso de Lasers. Existem no mercado diversos tipos de lasers úteis para a microfabricação como os lasers de excimer CO_2 e Ar_2 , e os lasers pulsados como Nd-YAG ^[20]. O laser pulsado é o mais indicado para microfabricação em vidros e silício, oferecendo um processo rápido, sem etapas intermediárias como uso de máscaras. Oferece ainda a possibilidade da obtenção de geometrias em 3D ^[21]. Por outro lado, o custo de obtenção e manutenção do equipamento é bastante elevado.

A produção de microcanais a partir de processos de fotolitografia é o mais comumente utilizado e necessita da produção de máscaras e deposição de materiais de mascaramento para os processos de corrosão que seguem a etapa de litografia ^[22]. Na Figura 2-2 é apresentado: em (a) um esquema da fotolitografia e duas possibilidades de corrosão do vidro: (b) corrosão úmida e (c) corrosão seca.

Figura 0-2. (a) Esquema da Fotolitografia, (b) perfil da corrosão úmida e (c) perfil da corrosão seca.

A primeira etapa do processo consiste na deposição de um ou mais filmes de mascaramento. O filme de cromo e de ouro são os mais comumente utilizados em processos de corrosão úmida, normalmente combinando-se os dois em múltiplas camadas permitindo corrosões profundas no vidro. Alternativas como uso de fotorresiste espesso, carbeto de silício, cobre e silício-poli também são citados. Para corrosões por plasma, o uso de Níquel é o mais conhecido ^[23,24,25,26].

A segunda etapa consiste na transmissão da geometria desejada para o vidro, no processo de fotolitografia. Nesta etapa há a deposição de um polímero fotossensível, a exposição a um feixe de luz ultra-violeta e revelação da geometria nos filmes de fotorresiste e do cromo. Pode-se encontrar na literatura tipos diferentes de litografia, bem como maiores detalhamentos do uso adequado do fotorresiste tais como etapas de recozimento térmico, escolha do fotorresiste positivo ou negativo ^[3].

A terceira etapa envolve a corrosão do vidro, que pode ser por via seca ^[27] ou úmida ^[23,24,25]. A corrosão seca envolve o uso de plasmas, tendo como base fenômenos físico-químico, como colisões de íons reativos com moléculas dos gases utilizados que interagem então com a superfície do vidro. A corrosão úmida envolve uso de reagentes químicos que atacam a superfície do vidro ^[28].

No caso da corrosão seca, utilizam-se reatores de plasma com íons reativos (Reactive Ion Etching – RIE) e a reatores com plasma indutivo (Inductive Ion Etching-ICP) sendo que o reator do tipo ICP possui maior densidade de plasma do que o reator tipo RIE, o que ocasiona uma maior taxa de corrosão, sendo atualmente mais utilizado. Gases fluorados como o SF_6 e o CF_4 combinados com

gases como Argônio e Oxigênio são utilizados para a corrosão do vidro. A corrosão seca permite a obtenção de perfil isotrópico como também anisotrópico com alta seletividade, com boa uniformidade e pouca rugosidade, perde-se, no entanto, no quesito da taxa de corrosão que para este tipo de corrosão costuma não superar o $1,5 \mu\text{m}/\text{min}$ ^[27].

A corrosão úmida do vidro dá-se com soluções baseadas em ácido fluorídrico (HF). Encontram-se na literatura o uso de HF puro, mas também combinado com outros ácidos como: ácido clorídrico (HCl), tetrafluoreto de amônia (NH_4F), ácido fosfórico (H_3PO_4) ou diluído em água. Essas combinações de ácidos visam diminuir a presença de rugosidades causadas no processo de corrosão somente com HF. Encontram-se no mercado diversos tipos de vidros com diferentes sais em suas composições que não são diluídos na corrosão com HF puro. A corrosão úmida oferece taxas de corrosão bastante altas e tem custo bem reduzido comparado aos outros processos. A maior limitação da corrosão é a dificuldade de mascaramento da superfície do vidro. As soluções que permitem uma alta taxa de corrosão são bastante agressivas, exigindo filmes de mascaramento mais espessos o que torna o custo mais alto e que nem sempre oferecem resultados de maior qualidade ^[24].

✓ ***Encapsulamento/selagem do Sistema Microfluídico***

Para vedação dos sistemas microfluídicos em vidro pode-se escolher entre soldagens com e sem filmes intermediários. Nas soldagens com filmes intermediários pode-se citar a soldagem anódica e soldagem com filmes poliméricos. Nas soldagens diretas, encontram-se a soldagem por fusão e a soldagem por processo químico ^[29]. Na Figura 2-3 é mostrada uma ilustração resumindo os tipos de soldagem existentes para sistemas Vidro – Vidro, sendo elas: (a) solda anódica, (b) solda direta e (c) solda com filme intermediário.

Figura 0-3. Tipos de soldagem para sistemas microfabricados em vidros: (a) solda anódica, (b) solda com filme intermediário e (c) solda direta ^[5].

A soldagem anódica baseia-se na aplicação de temperatura na faixa dos 600°C e alta tensão (250 a 1000 V). Normalmente, este tipo de soldagem é feito entre vidro e silício, onde o óxido de sódio presente no vidro se dissocia e reage com íons de silício, formando na interface entre vidro e silício um filme de dióxido de silício (SiO_2). Para soldagens de vidro com vidro por este processo, é recomendada a deposição de filmes intermediários, tais como nitreto de silício, carbetos de silício, silício amorfo e silício policristalino ^[30, 31].

A soldagem direta pode ser realizada através da aplicação de temperatura próxima a temperatura de transição vítrea do vidro, em torno de 600°C , ou a partir de reações químicas entre as superfícies dos dois vidros ^[29]. Essas reações químicas se dão entre superfícies ativadas através de plasma ^[32] ou através da imersão em soluções ácidas ^[33]. Em ambas as soldagens, deve-se contar com superfícies muito planas, sem rugosidades e extremamente limpas. Nos processos de obtenção dos canais deve-se, portanto, garantir que não haja formação de defeitos ao longo do processo de corrosão, que irão contribuir para possíveis falhas de soldagem.

Na soldagem com filmes poliméricos a selagem entre a base de microcanais e o tampo se dá simplesmente pela cura do polímero, em alguns casos a cura se dá

com aplicação de temperatura e pressão e em outras pela exposição à luz ultravioleta. Podem-se utilizar polímeros como polimetil-metacrilato (PMMA) ^[34], ciclopentanone (SU-8) ^[35], benzociclobuteno (BCB) ^[36], Parylene ^[37], colas epóxi e UV ^[38], entre outros. Nesse tipo de selagem há a vantagem de ser um processo barato e reversível, no entanto, a aplicação do polímero pode ocasionar o bloqueio dos microcanais, sendo necessários testes de diluição e uso de rotação em alta velocidade para afinar a espessura dos filmes.

✓ ***Interconexão com Meio Externo***

Além das vias de acesso aos líquidos, que podem ser inseridas com colas diversas ou através de pressão mecânica, podem se incluir nos sistemas microfluidicos interconexões ópticas como fibras ópticas e guias de onda ^[39], termopares para controle de temperatura ^[40, 41] e eletrodos ^[42] diversos para inúmeras funções como aquecimento, resfriamento, movimentação de íons, entre outras aplicações. Na Figura 2-4 são apresentadas imagens de um exemplo de interconexões para sistemas que operam em mais altas temperaturas e pressões, mas que também podem servir de base para projetos onde não há a aplicação de condições mais severas. Em (a), bases de aço inoxidável servem de base para o sistema microfabricado em silício e vidro e o sistema funciona sem aplicação de colas, somente por pressão ^[43]. Na Figura 2-4 (b) é mostrado um exemplo baseado na solda de tubos de aço inox com abraçadeiras de latão em sistema microfluídico, também muito eficiente para sistemas que operam em maiores pressões e temperaturas ^[44].

(a)

(b)

Figura 0-4. Exemplos de Interconexão em aço inoxidável: (a) interconexão baseada em aplicação de pressão e (b) interconexão baseada em solda ^[43,44].

Em trabalho anterior, o uso do vidro Corning 7056 foi estudado para produção de sistemas microfluídicos, buscando viabilizar um processo de produção de menor custo ^[45]. Os microcanais foram obtidos via corrosão úmida com ácido fluorídrico e devido à presença de inúmeros sais na composição do vidro, notou-se que a adição de ácido clorídrico era importante para eliminação desses sais bem como o uso de maior agitação ao longo do processo. A soldagem foi pela técnica direta, utilizando-se imersão em ácido sulfúrico para ativação das superfícies dos vidros.

2.1.3 Microfabricação em LTCC

Diversos substratos de cerâmicas têm sido utilizados com sucesso em microeletrônica na produção de circuitos impressos, bem como na produção de sensores, atuadores e componentes passivos ^[46]. A cerâmica verde LTCC (Low Temperature Co-Fired Ceramic), material de interesse neste trabalho, é uma cerâmica constituída de alumina, vidro e compostos orgânicos. É chamada cerâmica verde (Green Tape), pois é manipulada em estado não sinterizado, sendo seu aspecto flexível e de fácil manuseio. Além disso, sua sinterização se dá em temperaturas menores que 1000° C, valor de temperatura comum para materiais cerâmicos. A cerâmica LTCC permite a microfabricação de sistemas em diversas camadas, formando estruturas em 3D e são compatíveis com a tecnologia de deposição de filmes espessos por serigrafia, muito aplicados na produção de circuitos. Além disso, as cerâmicas são muito importantes na produção de dispositivos que envolvam mais altas temperaturas durante as aplicações dos microreatores ^[47,48]. Por outro lado, o LTCC é opaco, exigindo para a visualização das reações o uso de janelas transparentes.

A divisão das etapas de microfabricação dos sistemas em LTCC pode ser dividida da mesma maneira que a microfabricação em vidro, sendo o passo inicial a obtenção dos microcanais. Os métodos mais comuns são o uso de lasers e o uso de fresadoras CNC (Controle Numérico Computadorizado), mas processos de corrosão com HF tal como realizado com o vidro também podem ser feitos. Além dos microcanais, nesta fase podem-se inserir outras estruturas como eletrodos através de pastas serigráficas. Na etapa seguinte há o processo de laminação, para vedação dos canais formando um sistema fechado. A laminação se dá sobre termocompressão e em seguida há o processo de sinterização.

O processo de sinterização possui uma rampa na temperatura de 350° C para eliminação do material orgânico e finalmente, a sinterização se dá a 850° C. O ultimo passo de todo o processo de microfabricação é a inserção de interconexões, que podem envolver tubos de acesso aos líquidos, fibras ópticas entre outros exemplos.

Na Figura 2-5 é mostrado um esquema do processo completo de obtenção dos microssistemas em LTCC ^[49].

Figura 0-5. Etapas do processo de microfabricação em LTCC adaptado de IBANEZ-GARCIA et.al. ^[49].

As cerâmicas são opacas, dificultando a visualização dos experimentos. Entretanto, a inserção de janelas nos dispositivos ao longo do processo de microfabricação ou mesmo após o sistema pronto, tem sido apresentada em diversos trabalhos, contornando o problema de visualização quando essa característica se faz necessária ^[50,51].

No IPT, a microfabricação de sistemas em LTCC já vem sendo utilizada há alguns anos e ultimamente a produção dos microssistemas se dão com o uso de um Laser de CO₂ não pulsado de baixo custo. A partir do controle da potência e velocidade do laser é possível realizar diversas funções de microusinagem. Ao incidir a luz do laser sobre a fita cerâmica há absorção da luz pelo grão de cerâmica, induzindo calor ao composto orgânico que serve de ligante ao LTCC. Com isso, a temperatura aumenta até o ponto onde ocorre a pirólise, decompondo o ligante que acaba por arrastar os grãos de cerâmica da superfície, criando um mecanismo auto-

limpante ^[52]. Com o LTCC já se produziu sistemas microfluidicos para diversas aplicações como produção de microesferas de PLGA para encapsulamento de proteína ^[53], sistemas para troca de calor ^[54], entre outros.

2.1.4 Tratamento de Superfície

Quando se opera com sistemas microfluídicos é sabido que por conta das dimensões muito pequenas, a razão entre superfície e volume de um microcanal é grande. Essa afirmativa implica que os fenômenos de interface apresentam maior importância, o que não ocorre na macroescala. Na produção de emulsões, por exemplo, uma das aplicações sugeridas neste trabalho, a molhabilidade das paredes determina o tipo de emulsão que será produzida, emulsão água em óleo ou óleo em água.

A molhabilidade de uma superfície é caracterizada pela medida do ângulo de contato e indica a tendência de um fluido de se espelhar ou aderir sobre a superfície. O ângulo de contato é determinado pela medida do ângulo formado entre a superfície e a tangente que passa pela gota do líquido sobre a superfície. Dependendo do ângulo de contato, uma superfície é considerada molhante ou não molhante, sendo que conforme aumenta o ângulo de contato, menor é a molhabilidade e vice-versa ^[55]. Usualmente, um substrato pode ser classificado como tendo superfície hidrofílica, ou seja, possui afinidade com água, que é o caso do vidro e da cerâmica LTCC. Ou pode ser classificada como hidrofóbica, com baixa afinidade com água (não molha a superfície), que é o exemplo de alguns polímeros como o PDMS (polidimetilsiloxano) entre outros.

A modificação da molhabilidade de uma superfície se faz necessária para muitas aplicações pode ser realizada de diversas maneiras como o uso de plasmas e tratamento com lâmpada de ozônio, e a deposição de outros materiais sobre o substrato, como o uso de polímeros diversos, proteínas e lipídios, além de processos de silanização ^[56,57,58,59]. Neste trabalho optou – se pela deposição de

polímeros para modificar a superfície do vidro, sendo eles o benzociclobuteno (BCB) e o Parylene-C.

O nome BCB é uma sigla de uma linha de produtos baseadas em benzociclobuteno. Este polímero tem sido amplamente utilizado na indústria microeletrônica por ter boas características dielétricas e apresentar baixas perdas de energia elétrica em dispositivos que operam em alta frequência, baixa temperatura de cura (250° C), alta resistência química e compatibilidade com diversos processos de metalização. A aplicação do polímero sobre a superfície é realizada por prato giratório de alta rotação e o processo de cura se dá por temperatura, ou dependendo do produto, por uso de UV ^[60]. O BCB possui ainda uma característica interessante que é a biocompatibilidade, abrindo um importante leque de aplicações na área biotecnológica, como por exemplo, na microfabricação de sensores e implantes diversos ^[61,62] e outras aplicações em microfluídica ^[63].

O Parylene é o nome de um conjunto de produtos derivados do monômero Poly(para-xylylene) , também biocompatível e depositado diretamente na superfície, sem processo de cura, em uma atmosfera rarefeita. São encontradas algumas variações do Parylene, sendo as mais comuns 3 versões primárias do polímero, sendo elas o Parylene-N, C e D. O Parylene-N é o primeiro da série, sendo basicamente o formado do monômero Poly(p-xylylene). Tem como característica ser altamente cristalino, com boa elasticidade, mesmo após várias deposições. O Parylene-C é o mais conhecido, sendo uma variação do Parylene-N, com a presença de um hidrogênio aromático na composição e o Parylene D, possui dois hidrogênios aromáticos. De maneira geral, o Parylene além de ser biocompatível apresenta baixa constante dielétrica e grande resistência química ^[64]. As aplicações do Parylene vão de dispositivos da microeletrônica, sensores e dispositivos microfluídicos diversos, com funções de substrato, material de encapsulamento e região ativa para sensores ^[65,66,67].

A deposição do Parylene-C é realizada em câmara para deposição química a vapor (processo CVD), a partir de um dímer (o di-para-xylylene). Inicialmente o dímer é colocado para sublimação a 175 °C. O polímero precursor sublimado segue para uma fornalha a 690 °C, onde ocorre um processo de pirólise, transformando-se em um monômero reativo. Finalmente, o gás passa para a câmara de deposição

onde é resfriado a 25 °C e se deposita como Parylene sobre o substrato ^[64]. A sequência do processo é ilustrada na Figura 2-6.

Figura 0-6. Esquema da Polimerização do Parylene.

Tanto o polímero BCB como o Parylene-C apresentam diversas aplicações em microfluídica, entretanto, ainda não há publicações do uso destes polímeros para a produção de emulsão dupla, onde se exige a presença de superfície hidrofílica e hidrofóbica no mesmo dispositivo.

2.1.5 Objetivos

Nesta sessão são apresentadas as técnicas de microfabricação utilizadas para a produção dos sistemas microfluídicos para aplicação na produção de micro e nanopartículas. O vidro foi o substrato escolhido para a produção de emulsões, nanoprecipitação e para o processo de escalonamento dos dispositivos. A cerâmica LTCC foi utilizada para a produção de um sistema de focalização hidrodinâmica em 3 dimensões também para o processo de nanoprecipitação.

Para os dispositivos em vidro foram utilizadas técnicas de microfabricação padrão, como fotolitografia e corrosão úmida. Para o processo de soldagem, optou-se pelo uso de cola UV, um processo reversível e de baixo custo. A modificação da

superfície do vidro, necessária para a produção de emulsão dupla, foi realizada com os polímeros BCB e Parylene-C.

O uso da cerâmica LTCC permitiu a microfabricação de um sistema para focalização hidrodinâmica em 3-D. O sistema conta com uma geometria inovadora, com a inserção de um tubo Kovar (liga Ni/Fe/Co) no interior do sistema e a presença de eletrodos depositados por técnicas de serigrafia que permitiram a avaliação da influência de altas tensões no tamanho das partículas produzidas.

2.2 EXPERIMENTAL

2.2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1.1 *Microsistemas em Vidro*

Para a fabricação dos sistemas microfluídicos simples foram utilizadas lâminas de vidro para microscopia da empresa *Knittel Gläser* ^[68] com dimensões de 76 x 26 x 1 mm e para os sistemas em paralelo foram utilizadas lâminas de vidro Borosilicato (Schott 8330) com dimensões de 76x50x3 mm. Na Figura 2-7 são indicadas as etapas da microfabricação dos sistemas microfluídicos e que são descritos em maiores detalhes na sequência:

Figura 0-7. Sequência das etapas de microfabricação: (a) deposição de cromo e fotoresiste na superfície do vidro; (b) fotolitografia; (c) revelação do fotoresiste e corrosão do cromo; (d) corrosão em HF; (e) vidro com microcanais; (f) deposição de Cola UV e exposição; (g) interconexões e sistema pronto.

A primeira etapa de nosso processo de fabricação consistiu na limpeza das lâminas de vidro efetuadas em capela química com a sequência indicada:

- Remoção de Compostos Orgânicos: Solução de $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ (4:1) a 120°C durante 10 min e enxágue em água DI por 5min;
- Remoção de Metais e Materiais Orgânicos: Solução $\text{NH}_4\text{OH} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ (1:1:5) a 70°C durante 10 min e enxágue em água deionizada por 5 min;
- Fervura em Álcool Isopropílico;
- Secagem em jato de N_2 .

Filmes de Cromo foram utilizados como material de mascaramento para o processo de corrosão úmida do vidro em soluções de ácido fluorídrico. Os filmes foram obtidos por processo de *Sputtering* (*Physical Vapor Deposition* - *PVD*) no Laboratório de Materiais Magnéticos do IFUSP. A espessura utilizada foi de 50 nm depositadas em uma potência de 200 W, à temperatura ambiente e em pressão de 5 mTorr, com fluxo de Nitrogênio de 20 sccm. Para obtenção de maior tempo de resistência do Cromo em soluções de HF foi efetuado tratamento térmico em temperatura de 500°C por 120 min em forno Mufla, com rampa de aquecimento de

10 °C/min. Após este período em forno dentro de ambiente com oxigênio há a formação de óxido de cromo CrO_2 .

Na sequência foi realizado o processo de fotolitografia obedecendo as seguintes etapas:

- Deposição do fotoresiste AZ1518 em prato giratório na rotação de 3500 rpm durante 20 segundos;
- Pré-cura (*soft baking*) do fotoresiste por 1 min e 30 s em 105° C.
- Exposição ao UV por 16 segundos em fotoalinhadora (25 mW/cm², 4A) para a transferência da geometria.
- Revelação do fotoresiste em solução de KOH (17g/L) em água na proporção de 1:2, sendo tempo de revelação 20 segundos.
- Etapa de cura do fotoresiste (hard-baking), 5 min em 130°C.
- Abertura da geometria no filme de cromo, corrosão em solução de 40 g de nitrato de cério IV e Amônio $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ (VETEC Química Fina), 200 ml de água de-ionizada e 11,25 ml de ácido acético (General Chemical).

Diversas geometrias foram planejadas dentro deste trabalho, como focalização hidrodinâmica, junções T e Y, sistema com canais em paralelo, cada uma delas pertinentes as aplicações propostas e apresentadas em maiores detalhes nas sessões seguintes. Os projetos foram efetuados em programa CAD já nas dimensões desejadas e impressos em fotolito comercial.

A microusinagem dos canais foi feita através do processo de corrosão úmida em solução de ácido fluorídrico (49%, General Chemical) juntamente com ácido clorídrico (38%, General Chemical) diluídos em água deionizada, na proporção 1:1:3 e na proporção de 1:2:3 (HF + HCl + H₂O). Para obtenção da profundidade foi utilizado perfilômetro 3D (Keyence – Digital Microscope VHX-600) e também Perfilômetro DEKTAK 3030.

Para soldar os sistemas microfluídicos foi realizado um estudo de soldagem com cola UV, Pizzani 1201. A cola possui alta viscosidade (1750 ± 750 mPa.s) e o tempo de cura deve ser maior que 30 segundos a uma potência de 30 mW/cm². Para a realização da cura foi confeccionada uma câmara UV simples baseado no trabalho

de Alvarenga et.al.⁽⁶⁹⁾, com lâmpada ultravioleta germicida de 15 W e 110 V (Philips). A cola foi diluída em acetona para diminuição da viscosidade nas proporções de 30 e 50%, semelhante à técnica proposta por Pan e Yang⁽⁷⁰⁾. A aplicação da cola foi realizada através de prato giratório para uma faixa de velocidades variando de 1500 a 4000 rpm por 20 segundos. Os filmes foram caracterizados após a cura através da medida do perfil, no Perfilômetro DEKTAK 3030. A condição de deposição que rendeu o filme de cola mais fino foi utilizada na confecção dos sistemas microfluídicos.

A introdução dos furos de acesso é realizada com retífica manual (Western, 10.000 RPM) e brocas diamantadas de uso odontológico (Microdont, 3018 HL). Foram utilizados tubos de acesso de 4 mm (Limarco Ltda) como vias de acesso aos líquidos, fixados com cola instantânea do tipo Super Bonder e Epóxi Araldite 10 min.

Utilizando o mesmo processo de fabricação foram confeccionados sistemas com canais em paralelo, utilizando distribuição de fluxos por reservatórios e distribuição de fluxos por ramificação. No processo de ramificação foi projetado um sistema em três camadas, com esquema demonstrado na Figura 2-8, sendo (a) a vista do corte transversal e em (b) a vista superior do sistema. No projeto dos canais em paralelo os vidros de fotomáscara possuem tamanho de 70x50 mm e espessura de 3mm, e na camada intermediária foi utilizado um vidro de microscopia com mesmo tamanho e espessura de 1 mm.

Figura 0-8. Sistema com canais em paralelo com 3 camadas de vidro: (a) vista lateral e (b) vista superior.

2.2.1.2 Microfabricação em LTCC

Para produção dos dispositivos em cerâmica foi utilizada a cerâmica LTCC 951 da DuPont. Para usinagem foi utilizado o Laser de CO₂, modelo VersaLaser da empresa Universal Laser, com tubo de 40W, acoplado a um acessório (HPDFO™) *High Power Density Focusing Optic* que aumenta a densidade de potência do laser, reduzindo o diâmetro do *Spot* (*abertura do feixe*) do laser e com isso produzindo o

efeito de um laser de maior potência. Para o corte das fitas de LTCC foi selecionada as seguintes condições: a Potência de 10% e Velocidade de 5%, na condição de varredura VECTOR e com aplicação de Nitrogênio para resfriamento.

A geometria do sistema em LTCC é mostrada na Figura 2-9 (a). O sistema foi projetado pelo Prof. Dr. Mário Gongora e opera em regime de focalização de fluxo em três dimensões conforme indicado na Figura 2-9 (b). Um tubo de aço inox foi inserido no sistema para inserção do fluxo que sofre a focalização. Os sistemas podem ser microfabricados com tubos de diversos diâmetros e são colados com Epóxi de Prata. Além disso, o tubo de aço inox está ligado a um dos dois eletrodos inseridos no dispositivo microfluídico. A pasta condutora 6146 (Prata – Paládio) da Dupont foi utilizada para inserção dos eletrodos.

Figura 0-9. Esquema do sistema de focalização hidrodinâmica em 3D: (a) vista superior da geometria e (b) detalhe da focalização hidrodinâmica. (Auto CAD 3D)

2.2.1.3 Tratamento de Superfície

Para a produção de emulsão dupla é necessário uma modificação da superfície do vidro de hidrofílica para hidrofóbica em parte do canal. Para o tratamento da superfície foram utilizados dois polímeros, o Parylene-C e o BCB. A área a ser mantida hidrofílica foi protegida com uso de fita adesiva (Polyimide - Kapton 3M) que serviu de máscara ao longo do processo de deposição do filme polimérico, conforme esquema apresentado na Figura 2-10.

Figura 0-10. Esquema do processo de tratamento da superfície.

O polímero Parylene-C foi depositado pelo equipamento PDS 2010 (Speciality Coating Systems) indicado na Figura 2-11.

Figura 0-11. Reator CVD para deposição do Polímero Parylene-C, PDS 2010

Foram medidos 5 ± 1 g do polímero para a deposição e as condições de operação da deposição são as já fornecidas previamente pelo equipamento sendo:

- Vácuo de 35 mTorr
- Temperatura de Pirólise 690°C
- Temperatura de vaporização 174°C.

O polímero BCB, da linha 3022-46 Cyclotene 3000, foi aplicado com uso de pincel simples, já que vem na forma líquida e possui baixa viscosidade facilitando sua aplicação. Essa linha oferece filmes com espessura de no máximo 5,5 μm . Inicialmente, as lâminas de vidro passaram por processo de limpeza e o promotor de adesão, AP3000, foi aplicado. A linha 3022-46 tem cura por temperatura, seguindo o ciclo proposto pelo manual do produto, com primeira cura a 100°C por 15 min e cura completa a 250°C por 60 min. O procedimento de cura foi efetuado em estufa.

A espessura do filme foi observada utilizando perfilômetro e micrografias do processo também foram obtidas. A molhabilidade da superfície foi observada com

imagens da medida do ângulo de contato para vidros com os dois polímeros depositados comparados a vidros sem tratamento de superfície.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 *Ensaio da Microfabricação em Vidro*

Na literatura recomenda-se o uso de recozimento térmico em temperaturas em torno de 400° e 500°C para aliviar o stress residual das lâminas ao longo da microfabricação ^[17]. Seguindo este procedimento, realizou-se um tratamento térmico em mufla a 500°C da lâmina de microscopia já com o filme de cromo depositado (condições na página 22), resultando num crescimento de óxido de cromo na superfície. O filme de 50 nm, após 2h de tratamento térmico passou a ter espessura de 55 nm e coloração azulada conforme ilustrado na imagem da Figura 2-12.

Figura 0-12. Vidros com filmes de cromo com tratamento (azulada) e sem tratamento (cinza).

As lâminas passaram por um primeiro teste de corrosão para averiguar o tempo de permanência do filme na superfície. Os resultados das lâminas com filme

termicamente tratado foram comparados aos resultados obtidos com as lâminas de filme de cromo sem tratamento. Na Figura 2-13 é apresentada uma comparação entre uma lâmina com cromo sem tratamento (a) corroída por 20 min e (b) uma lâmina que passou pelo tratamento térmico do cromo, com o mesmo tempo de corrosão.

Figura 0-13. Vidros após a corrosão em HF por 20 min. (a) sem o tratamento térmico e (b) com o tratamento térmico.

Analisando as imagens pode-se notar a maior presença de defeitos nas lâminas sem tratamento térmico. O aumento da espessura do filme que passou pelo tratamento térmico permite um tempo maior de corrosão, garantindo canais com maior profundidade e com menos defeitos na superfície. Entretanto, o tratamento não elimina completamente os defeitos de superfície e para projetos de sistemas com maior profundidade e menos rugosidade superficial a melhor escolha é opção por filmes mais espessos ou ainda, a combinação de filmes de cromo com filmes de ouro.

Os resultados da corrosão dos vidros com solução de HF são mostrados na sequência. Este método para produção dos microcanais já é bem conhecido e produz resultados bastante eficientes, com a possibilidade de se produzir canais de poucas dezenas de microns de largura e com profundidades da ordem de até algumas centenas de microns. Há uma limitação neste processo devido à formação de resíduos ao longo do processo de corrosão o que é contornado com o acréscimo de ácido clorídrico e também com o uso de agitação ^[45].

O primeiro experimento importante para a produção dos microcanais foi o levantamento da taxa de corrosão do vidro utilizado. O experimento foi realizado

medindo-se as profundidades corroídas ao longo do tempo. Na Figura 2-14 são mostradas imagens da medida de profundidade em perfilômetro 3D. A corrosão do vidro é classificada como isotrópica, ou seja, possui a mesma taxa de corrosão em todas as direções e deve ter um perfil semicircular. Na Figura 2-14 (a), obtivemos um perfil próximo ao retangular, pela ausência de agitação durante a corrosão. Em (b) com o uso de agitador magnético, obtivemos um perfil mais próximo do isotrópico.

Figura 0-14. Perfis de corrosão obtidos em Perfilômetro 3D: (a) perfil retangular e (b) perfil isotrópico.

Com os valores das profundidades foi levantada a curva da taxa de corrosão. Com o valor da taxa de corrosão é possível se estimar o tempo necessário para corroer em uma espessura desejada. Duas soluções de HF com HCl foram utilizadas com as proporções 1:1:3 e 1:2:3 (HF:HCl:H₂O) conforme descritas anteriormente. O gráfico destes resultados é mostrado na Figura 2-15:

Figura 0-15. Gráficos da Profundidade corroída pelo tempo de corrosão para o vidro de microscopia.

Para a solução de HF na proporção de 1:1:3 obteve-se uma taxa de corrosão no valor de $4,30 \pm 0,10 \mu\text{m}/\text{min}$ e para a solução na proporção 1:2:3, a taxa de corrosão obtida foi de $3,10 \pm 0,02 \mu\text{m}/\text{min}$. Importante ressaltar que as taxas de corrosão podem variar conforme a composição do vidro, podendo-se obter valores maiores ou menores neste mesmo processo.

Para os sistemas em paralelo foi utilizado o vidro de fotomáscara modelado por corrosão úmida também com a solução de HF na proporção de 1:1:3. Da mesma maneira, levantou-se o perfil de corrosão do vidro borofloat que é apresentado na Figura 2-16. O vidro borofloat possui uma taxa de corrosão baixa para a solução testada, sendo de $0,93 \pm 0,10 \mu\text{m}/\text{min}$. A corrosão do borofloat é mais lenta, portanto exige um filme de cromo como mascaramento mais espesso para suportar maiores tempos de corrosão. Os canais projetados neste trabalho tiveram como profundidade máxima $90 \mu\text{m}$.

Figura 0-16. Gráficos da Profundidade corroída pelo tempo de corrosão para o vidro borosilicato Schott 8330 utilizado para os sistemas em paralelo. Solução de HF:HCl:H₂O (1:1:3).

Análises com Microscopia de Eletrônica de Varredura complementam a observação dos processos de corrosão e são mostrados na Figura 2-17. Podem-se observar algumas falhas produzidas pelos furos no cromo ao longo dos processos de corrosão. Além disso, pode-se notar o perfil isotrópico da corrosão, gerando um canal com seção transversal arredondada. Para observação do perfil dos canais foi utilizado um suporte especial para os vidros mantendo-os em angulação de 45 graus, além da angulação já permitida pelo equipamento.

Figura 0-17. Micrografia dos canais microfluídicos (MEV-LSI).

As falhas de superfície geradas no processo de corrosão dificultam processos de soldagem química entre vidros onde se exige normalmente grande planicidade e ausência de defeitos. No entanto, os defeitos superficiais não dificultam a soldagem com polímero intermediário que oferecem uma alternativa bastante econômica para a produção dos dispositivos.

Na Figura 2-18 é mostrado o gráfico da espessura para diferentes rotações do spinner. A cola pura, sem nenhuma diluição, oferece filmes muito espessos, sendo que a menor espessura observada foi de aproximadamente 12 µm. Para rotações menores é possível obter filmes com espessura de 75 µm, valor inadmissível para as estruturas propostas neste trabalho que possuem espessuras entre 50 e 150 µm.

Figura 0-18. Gráfico da Espessura do filme de cola pela rotação do spinner.

Pode-se observar que com a diluição de 35%, temos um filme de espessura de 8 µm no melhor caso, na rotação de 4000 rpm. Para uma diluição de 50%, na mesma rotação, observamos uma espessura de 1,5 µm. Este valor de 1,5 µm de espessura foi adotado para a colagem dos sistemas. A cola permite um tempo de trabalho para limpeza de qualquer obstrução.

A cola possui alta resistência química aos ácidos, tais como ácido sulfúrico, clorídrico e acético, resultados importantes quando se considera utilizar esses ácidos como auxiliares na formação de partículas. O mesmo se dá com outros solventes como etanol, álcool Isopropílico e dimetilformamida. As lâminas permaneceram soldadas por mais de 48 horas seguidas imersas nessas soluções. Para esses testes foram utilizadas lâminas curadas por 1 minuto na câmara UV. O uso de cola UV permite não somente a soldagem de vidro com vidro, mas também de vidro com cerâmica ou com algum metal. Além disso, este tipo de soldagem é reversível. Os sistemas podem ser descolados utilizando-se temperaturas maiores que 150° C, limpos e colados novamente. Terminada todas as etapas da microfabricação foram inseridas as vias de acesso dos líquidos.

2.3.2 *Microsistemas em LTCC*

Na Figura 2-18 (a) é mostrada a imagem do procedimento de colagem do tubo Kovar no sistema microfluídico. A inserção do tubo é realizada após um processo de pré-laminação de parte do sistema, sendo a laminação completa realizada na sequência. Na Figura 2-19 (b) é mostrado o detalhe da região onde o fluxo central é focalizado no sistema completo.

Figura 0-19. (a) processo de colagem do tubo Kovar e (b) detalhe da região onde o fluxo é focalizado.

2.3.3 *Tratamento de Superfície*

Na Figura 2-20 são mostradas as medidas do ângulo de contato para o vidro com tratamento de superfície utilizando os dois polímeros, BCB e Parylene-C. Para comparação, em (a) é apresentada a medida do ângulo de contato para o vidro sem tratamento, onde se pode observar que a superfície é hidrofílica, com ângulo menor que 90°. Em (b) é mostrada a gota de água sobre a superfície com Parylene-C, com Θ em torno de 105° e (c) a gota sobre a superfície com BCB, com Θ em torno de 103°.

Figura 0-20. Medida de ângulo de contato na superfície do vidro: (a) sem tratamento - $\Theta = 25^\circ$; (b) tratada com Parylene-C, $\Theta = 105^\circ$ e (c) com BCB com $\Theta = 103^\circ$.

Na sequência é mostrada a imagem obtida em microscópio eletrônico de varredura e perfilômetro 3D para a superfície do vidro com Parylene-C depositado. O polímero apresenta boa conformação aos canais, rendendo filmes de espessura de $5\ \mu\text{m}$. Na Figura 2-21 é mostrada a imagem de MEV do filme de Parylene-C sobre a superfície do vidro.

Figura 0-21. Imagem de MEV do filme de Parylene-C sobre a superfície do vidro.

Na Figura 2-22 (a), apresentada na sequência, pode-se observar o sistema por inteiro, antes do processo de soldagem com cola UV. Tanto a base com os canais como o tampo com os furos deve receber o tratamento de superfície para evitar problemas na formação das gotas. Neste exemplo o sistema está tratado com o polímero BCB que possui coloração amarela. Já na Figura 2-22 (b) é mostrado o vidro com Parylene C com maior detalhe na região da junção de fluxos. Pode-se observar uma linha que separa as duas regiões, a hidrofóbica da hidrofílica.

(a)

(b)

Figura 0-22. Tratamento da superfície nos sistemas microfluídicos para a produção de emulsão dupla: (a) sistema com filme de BCB e (b) sistema com Parylene-C.

2.3.4 Dispositivos Microfabricados

Na Figura 2-23 são mostrados alguns exemplos dos dispositivos fabricados em vidro. A transparência do vidro, bem como da cola utilizada permitem a visualização dos fenômenos com auxílio de microscópio óptico. Em (a) pode-se observar um dispositivo para focalização de fluxo, utilizado para produção de gotas; (b) observa-se outra possibilidade para focalização hidrodinâmica, com fluidos entrando com ângulo de 45° ; (c) geometria para produção de emulsão dupla, (d) geometria para obtenção de gotas do tipo junção T, (e) um exemplo do sistema em paralelo, com 4 saídas e (f) é mostrado o sistema para focalização em 3D, microfabricado em LTCC.

Figura 0-23. Sistemas Microfluídicos para a produção de micro e nanopartículas: (a) dispositivo para focalização de fluxo (b) focalização hidrodinâmica com ângulo de 45°; (c) geometria para produção de emulsão dupla, (d) geometria para obtenção de gotas do tipo junção T, (e) um exemplo do sistema em paralelo e (f) o sistema para focalização em 3D, microfabricado em LTCC.

2.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste trabalho utilizaram-se processos de microfabricação em vidro e cerâmica LTCC para a produção de diversos sistemas microfluídicos para a produção de micro e nanopartícula.

A técnica de microfabricação em vidro utilizando vidros comerciais de baixo custo, o fotolito como máscara e a cola UV para selagem, mostrou-se economicamente e tecnicamente viável. A selagem com cola é reversível, permitindo a desobstrução de canais entupidos sem comprometer o sistema e não exige superfícies totalmente isenta de defeitos, o que facilita o processo de manufatura dos sistemas. No caso dos sistemas em paralelo, onde há mais canais e mais defeitos de superfície e menor área disponível para solda, a cola se mostra uma alternativa bastante interessante.

A interconexão com o meio externo ainda é um ponto crítico que pode ser melhorado. O uso de epóxi para colagem dos tubinhos é de baixo custo e de simples aplicação, entretanto, não é um processo duradouro e não resiste à temperatura ou mesmo a determinados solventes utilizados ao longo deste trabalho. A ideia de se projetar cabeçotes ou bases de distribuição de fluxos de aço inox ou outro material inerte pode contribuir para melhorar a praticidade do sistema.

No sistema LTCC em 3D há a possibilidade de inserção de tubos com diferentes diâmetros para melhorar o processo de obtenção de partículas. Uma das necessidades levantadas foi a inserção de janelas para se acompanhar o processo de focalização, já que a cerâmica é opaca.

3. EMULSÕES

3.1 ESTADO DA ARTE

Emulsões são formadas por gotas líquidas dispersas em outra fase líquida, sendo esses fluidos imiscíveis. As gotas normalmente possuem tamanhos que podem ir de nanômetros a alguns micrometros. As emulsões possuem aplicações no setor alimentício e farmacêutico, sendo útil para melhoria de textura de produtos como cremes e para encapsulação de fármacos e essências. Diversos processos são encontrados para a produção de emulsões na macroescala, como atomização, sprays e misturas em alta velocidade, entretanto todos exigem maior consumo de energia e reagentes, além de gerarem gotas de tamanhos não uniformes. A microfluídica por sua vez, oferece uma excelente ferramenta para a produção de emulsões simples e múltiplas, gerando gotas com tamanhos uniformemente distribuídos sem etapas adicionais de processo e com outras vantagens inerentes a Microfluídica, como economia de reagentes, processo contínuo, entre outras vantagens.

As emulsões podem ser produzidas com dispositivos microfluídicos de maneiras distintas. Há exemplos na literatura, utilizando dispositivo microfluídico de emulsificação, onde os sistemas são projetados para que o fluxo a ser disperso seja forçado contra poros ou orifícios, gerando assim gotas monodispersas ^(71,72). Outros processos envolvem a emulsificação através da mistura dos fluidos em sistemas 3D ⁽⁷³⁾, tendo geometrias projetadas de forma a melhorarem a eficiência de mistura, e por fim, através de sistemas planares que são o escopo deste trabalho. Na Figura 3-1 são mostrados: (a) um sistema microfluídico de emulsificação ^(74,75) e (b) um sistema microfluídico microfabricado em LTCC para produção de emulsões ⁽⁷⁶⁾.

Figura 3-1. Sistemas para produção de emulsões simples: (a) um sistema microfluídico de emulsificação^[74,75] e (b) um sistema microfluídico microfabricado em LTCC para produção de emulsões^[76].

Este último sistema indicado na Figura 3-1(b) foi produzido também nas dependências do LPP-IPT, obtendo resultados que demonstram a versatilidade desta técnica para obtenção de emulsões de forma contínua. Estas emulsões foram preparadas como precursores da etapa de formação de partículas poliméricas, potenciais veículos de liberação controlada de componentes ativos, ou seja, sistemas microencapsulados. No entanto, até o presente momento, as emulsões, e por consequência, as partículas geradas a partir destas dispersões geradas nos micromisturadores utilizados, têm apresentado polidispersividade de tamanho (faixa de 1 a 30 microns), o que pode comprometer o desempenho (perfil cinético de liberação) de produtos microencapsulados.

Os sistemas microfluídicos planares são microfabricados de forma a oferecerem dois métodos para a geração de gotas, sendo eles ativo ou passivo⁽⁷⁷⁾. No caso do método ativo, há a necessidade de alguma forma de atuação externa, através do uso de piezoelétricos, eletrodos e válvulas⁽⁷⁸⁾. No caso do método passivo, os sistemas operam baseados em suas geometrias e com controle das vazões dos fluxos. O método passivo por sua vez, pode ser dividido em três

categorias caracterizadas pela natureza do corte da gota ^[77], na região limite do corte, sendo elas:

- a) Quebra da gota com fluxos confluentes – *co-flowing streams*;
- b) Quebra da gota em fluxos cruzados – *cross-flowing streams*,
- c) Quebra por estiramento ou alongamento dos fluxos.

As categorias podem ser visualizadas com as devidas geometrias na Figura 3-2. Nos três casos os fluxos são introduzidos em vias de acesso independentes, com controles de pressão e velocidade também independentes. Os fluidos imiscíveis só se encontram nas junções onde a fase dispersa forma um jato, quebrando o fluido em gotas. A geometria da junção e as taxas de fluxo determinam um campo de fluxo local na junção, que deforma a interface do fluxo disperso.

Figura 3-2. Tipos de quebra de gotas: (a) fluxo confluyente; (b) fluxo cruzado e (c) quebra por estiramento ^[77]

O corte das gotas pelo método de fluxos confluentes são comumente realizados utilizando-se capilares de vidro que possuem diâmetros na escala de dezena de microns até 1mm ^(79,80,81). Esse tipo de montagem com tubos capilares não exige equipamentos de microfabricação como alinhadoras para fotolitografia, gerando também gotas de dezenas de microns. No entanto, os experimentos ficam limitados pelos tamanhos dos capilares de vidro encontrados no mercado. Utilizando processos de microfabricação para geração de sistemas microfluídicos em 3D, com polímeros ou cerâmicas, por exemplo, pode-se obter esse tipo de corte com maior versatilidade no que diz respeito a tamanhos e também a introdução de eletrodos e outras conexões.

Os sistemas microfluídicos planares são comumente projetados para gerarem emulsões com geometrias com corte por fluxo cruzado ou por estiramento ^[82]. Os sistemas são produzidos com técnicas de microfabricação como litografia e corrosões, permitindo um maior aperfeiçoamento das estruturas microfluídicas, como inserção de poços reservatórios, eletrodos, etc. Os microcanais podem ser projetados para gerarem emulsões simples ou múltiplas emulsões.

Outro fator importante na produção dos sistemas microfluídicos para a produção de emulsões é a escolha do substrato ^[77]. A molhabilidade do substrato, além da geometria e do controle das taxas de fluxo, é um fator importante que influencia a formação das gotas nos dispositivos. A regra é que a fase contínua, que corta as gotas, molhe a superfície do substrato, impedindo que o fluxo disperso tenha contato com as paredes do canal. Até mesmo nos procedimentos experimentais, recomenda-se que se iniciem os experimentos com a introdução da fase contínua. Dessa maneira, o substrato delimita o tipo de emulsão resultante. O polímero PDMS, por exemplo, tem uma superfície hidrofóbica, gerando emulsões de água em óleo. Já os vidros e o silício são utilizados para gerar emulsões de óleo em água. Para a geração de múltiplas emulsões há a necessidade da modificação da superfície em vários pontos do sistema ^[83].

3.1.1 Aspectos Físicos da Formação das Gotas

Para entender o mecanismo de quebra das gotas nos sistemas microfluídicos normalmente se analisa a influência do estresse viscoso e da pressão no entorno da gota. Dentro disso, a geometria da junção onde se realiza o corte da gota tem grande importância e determina quais forças estão atuando para que haja o corte. O tamanho total, no sentido do comprimento, dos dispositivos não apresenta grande relevância no que diz respeito ao corte, mas determina a pressão total e perda de carga do sistema microfluídico. Na formação das gotas, alguns números adimensionais são importantes para o entendimento do sistema, sendo o mais conhecido o *número de Reynolds* apresentado na Equação 3.1:

$$Re = \frac{\rho V D h}{\mu}$$

Equação 3.1.

Os sistemas microfluídicos operam com fluxos tipicamente laminares, sendo $Re < 2000$. Em sistemas para produção de emulsão é comum se operar com números de $Re \ll 1$, garantindo maior estabilidade de tamanhos das gotas e, no caso das emulsões duplas, o número de Reynolds determina a quantidade de gotas encapsuladas em outras gotas ⁽⁸⁴⁾. O número de capilaridade, apresentado na Equação 3.2, por sua vez, caracteriza a relevância da viscosidade e da tensão interfacial no sistema, sendo definido em termos da fase contínua do sistema:

$$Ca = \frac{\mu_c * V_c}{\gamma}$$

Equação 3.2.

Onde μ_c é viscosidade da fase contínua, V_c é a velocidade, podendo ainda ser escrita em termos da vazão e da geometria do canal sendo $V_c = \frac{Q_c}{Area}$ e γ a tensão interfacial entre os dois líquidos imiscíveis. Conforme o valor do número de capilaridade aumenta, pode-se observar que as gotas quebram de maneira diferente, reduzindo cada vez mais seu tamanho. Quando $Ca > 1$, o cisalhamento domina o mecanismo de corte; para Ca entre 0,01-1 há uma combinação entre cisalhamento e pressão e para $Ca < 0,01$ há predomínio da pressão sobre o mecanismo de corte das gotas.

Na Figura 3-3 (a) é apresentado um gráfico com essa relação e em (b) uma sequência dos tipos de quebra de gotas correspondente a cada região do gráfico, sendo eles os cortes controlados pela geometria (a), com formação de fio (*thread fomatation*) (b), por gotejamento (*dripping*) (c) e por formação de esguicho (*jetting*) (d) [85]. Para pequenos valores de Ca , tem-se a o mecanismo de quebra controlado pela geometria do canal, com gotas geradas do tamanho do canal interno.

Conforme o valor de Ca aumenta, há modificação do tipo de corte, gerando uma espécie de esguicho ou estrangulamento do fluxo central, gerando gotas cada vez menores. O modelo apresentado é empírico, válido para sistemas microfluídicos com corte por estiramento, entretanto, para sistemas do tipo junção T ou Y, vale o mesmo princípio de que com o aumento de Ca há a diminuição do tamanho das gotas.

Figura 3-3. (a) Gráfico da Razão entre Fluxos por Ca, com os 4 tipos de quebra de gotas e (b) imagens dos tipos de quebra de gotas correspondente a cada região do gráfico: (a) corte controlado pela geometria, (b) *thread formation*, (c) *dripping* e (d) *jetting*.^[85]

No trabalho de Xu et. al.⁽⁸⁶⁾ Um sistema do tipo junção T foi estudado observando-se os regimes de corte conforme o número de Capilaridade. Observou-se que quando os valores de Ca estavam na faixa de 10^{-4} a 0,002 a fase dispersa se quebra em gotas com formatos cilíndricos, chamados plugs. Nesta situação, a tensão interfacial é maior que a força de cisalhamento, sendo assim a dinâmica do corte é regida pela pressão exercida pela fase dispersa e o regime de corte é chamado de *squeezing*. Neste mesmo trabalho, foi proposta uma adaptação à equação do número de Capilaridade, levando-se em consideração o tamanho da

gota formada, pois a presença da gota altera a velocidade da fase contínua. Essa adaptação é apresentada na Equação 3.3.

$$Ca_c = Ca_{cinicial} * \frac{wh}{wh - 0,785d_d^2}$$

Equação 3.3.

Onde o Ca_c é a capilaridade adaptada, w a largura do canal, h a profundidade, d_d o diâmetro da gota obtida e $Ca_{cinicial}$, a capilaridade calculada inicialmente sem considerar a formação da gota.

Quando Ca fica numa faixa entre 0,002 a 0,01, a dinâmica de corte das gotas está num regime dito transiente onde tanto o cisalhamento como a tensão interfacial atuam no sistema em conjunto. Para valores de Ca maiores que 0,01 até 0,3, a força de cisalhamento tem predominância no regime de corte, sendo chamado regime *dripping*. Na Figura 3-4 é apresentado um gráfico da relação entre o Ca e o fluxo disperso para uma geometria do tipo junção T. Conforme se aumenta Ca , tem-se gotas variando dos chamados plugs até gotas menores ⁽⁸⁷⁾.

Figura 3-4. Gráfico da relação entre o Ca e o fluxo disperso para uma geometria do tipo junção T ⁽⁸⁷⁾.

O número de Weber, também é um adimensional utilizado para caracterizar formação de gotas e é aplicado para a fase dispersa, indicando quando a inércia e a capilaridade são mais importantes que o estresse viscoso. O número de Weber é apresentado em função da velocidade do fluxo disperso ($V_{disperso}$), ρ densidade do líquido disperso e γ tensão interfacial, indicado na Equação 3.4.

$$We = \frac{\rho * V_{disperso}^2}{\gamma}$$

Equação 3.4.

No trabalho de Abate et. al.^[88] o número de Weber foi utilizado para entender o mecanismo de quebra das emulsões duplas e múltiplas. Na Figura 3-5 pode-se observar o efeito do aumento do número de Weber na encapsulação da fase mais interna. Com o aumento de We , as gotas mais internas foram quebradas na segunda junção, gerando maior uniformidade de tamanhos na formação de múltiplas emulsões.

Figura 3-5. Efeito do aumento do Número de Weber na formação de dupla emulsão.^[88]

3.1.2 Emulsificantes

Para a produção de emulsões estáveis é imprescindível o uso de emulsificantes. Os emulsificantes são produtos utilizados para reduzir a tensão interfacial (γ) entre os dois líquidos imiscíveis, diminuindo a energia de superfície entre as duas fases imiscíveis e auxiliando no corte das gotas. Além disso, os emulsificantes, por sua constituição, inibem a coalescência das gotas, ou seja, a união de duas ou mais gotas formando partículas maiores até a completa separação das fases, formando novamente água e óleo em duas fases distintas ^[55, 89,90].

Os emulsificantes são moléculas anfífilas, compostas de uma extremidade polar, solúvel em água e classificada como hidrofílica e outra extremidade apolar, insolúvel em água, classificada como lipofílica ou hidrofóbica. Podem ser classificados como aniônicos, com extremidade polar negativa; catiônico, com

extremidade polar positiva e não iônico. Os emulsificantes podem ser selecionados quanto ao seu uso por uma escala proposta por Griffin, a partir do número HLB, que indica o balanço hidrofílico lipofílico. Um emulsificante com baixo HLB possui maior solubilidade em óleo, e um emulsificante com mais alto HLB possui maior solubilidade em água. Dessa maneira, o índice HLB indica se o seu emulsificante será eficiente para a produção de uma emulsão óleo em água, ou água em óleo. Na tabela 3-1 é indicada a classificação do uso do emulsificante conforme se valor de HLB ^[91,92].

Tabela 3-1. Classificação HLB

HLB	Sistema
1,5-3	Anti-espumas
3-6	Emulsão Água em Óleo
7-9	Espumas, agente molhante
8-18	Emulsão Óleo em Água
13 -15	Detergentes
15 - 20	Solubilizantes de produtos orgânicos

Nos dispositivos microfluídicos a concentração de emulsificante utilizada deve ser menor comparada aos processos em macroescala, por conta das leis de escalonamento. No entanto, da mesma maneira que na macroescala, o aumento da concentração relativa do emulsificante reduz o tamanho das gotas e aumenta o número da frequência dessas gotas. Garante também maior estabilidade do produto final e interfere no tipo de corte produzido, conforme discutido na sessão anterior, indicando também o formato da gota gerada ^[93,94].

3.1.3 Emulsões Simples

Na literatura se encontram diversas aplicações de sistemas microfluídicos para a produção de emulsões simples. Em muitos exemplos, a produção da emulsão simples consiste somente na primeira etapa de algum processo de obtenção de

outras partículas ou geração de algum outro produto, como o uso das gotas como reatores para cristalização de proteínas, por exemplo.

No trabalho de Sgro et. al.^[95] um sistema microfluídico para geração de emulsão simples foi microfabricado em PDMS e associado a um sistema de resfriamento termoelétrico para redução da temperatura das gotas produzidas, tendo aplicações úteis em processos biológicos de cristalização de proteína. Células de rato (B lymphocytes) foram suspensas em uma solução aquosa e distribuídas em gotas, de maneira que tivesse uma célula em cada gota. O sistema de resfriamento foi inserido numa região de canais em serpentina (Figura 3-6), logo após a região da junção-T, de forma garantir o tempo desejado de resfriamento. A fase aquosa com as células foi dispersa em óleo mineral, de maneira que houvesse somente o congelamento das gotas e não do óleo. O encapsulamento das células é uma maneira eficiente de arquivar o produto biológico por maior tempo, principalmente na forma já congelada, mostrando que os sistemas microfluídicos podem ser uma ferramenta interessante para estes estudos.

Figura 3-6. (a) Geometria Junção T com serpentina; (b) gotas formadas; (c) região de resfriamento, partículas ainda sem congelamento; (d) partículas congeladas.⁽⁹⁵⁾

No trabalho de Yang et. al., partículas de tripolifosfato-chitosana foram obtidas em um sistema microfluídico fabricado em acrílico^[96]. Em J. Berthier et.al^[97], um sistema microfluídico fabricado em um polímero fotossensível Ordyl foi utilizado para processar gotas de alginato em óleo. Outro exemplo de aplicação dos sistemas é a cristalização de proteínas dentro de gotas. O sistema foi microfabricado em PDMS com geometria mostrada na Figura 3-7 (a), e as proteínas cristalizadas são apresentados em (b)^[98]. Muitos outros estudos já demonstraram que as gotas

servem como excelentes reatores para produtos biológicos com grande eficiência de mistura interna ^[99].

Figura 3-7. Emulsão Simples para Cristalização de Proteínas. (A) Geometria utilizada e (B) Proteínas Cristalizadas dentro das gotas ^[98].

3.1.4 Emulsões Duplas

As múltiplas emulsões podem ser obtidas da mesma maneira que as emulsões simples, somente com a adequação da geometria para receber a fase mais externa. Em Okushima et. al. ^[84] um sistema microfabricado em vidro quartzo foi utilizado para produção de dupla emulsão O/A/O e também A/O/A com a modificação da superfície nas junções dos microcanais. Foram testados diversos tamanhos e para a modificação da superfície na segunda junção, foi utilizado *silane coupling agent*. Na Figura 3-8 pode-se visualizar uma das geometrias utilizadas com dupla junção T e as gotas coloridas encapsuladas em gotas de óleo. Com o controle dos fluxos de entrada pode-se não somente regular o tamanho das gotas, como também o número de gotas encapsuladas na junção seguinte.

Figura 3-8. Geometria com dupla junção T para produção de emulsão dupla e as gotas coloridas encapsuladas em gotas de óleo ^[84].

Em Seo et. al. ^[100] os sistemas para emulsão dupla foram microfabricados utilizando PDMS e para a modificação da superfície em determinadas junções utilizou-se polimerização por ácido acrílico com cura por UV. Segundo os autores, esse tipo de modificação pode durar mais de dez semanas, o que nem sempre ocorre com outros tipos de tratamento que devem ser repetidos mais vezes. Os sistemas foram utilizados para diversos tipos de emulsão A/O/A, O/A/O e outras combinações com a alteração da molhabilidade da superfície.

No trabalho de Abate et. al., os sistemas microfluídicos foram utilizados também para produzirem múltiplas emulsões operando com o valor do número de Weber de forma que a quebra da gota se dê em uma única junção ^[88]. Na Figura 3-9 pode-se observar essa formação da múltipla emulsão.

Figura 3-9. Formação de Tripla Emulsão. ^[88]

Esses exemplos citados ilustram as inúmeras aplicações dos sistemas microfluídicos geradores de emulsões. Dentro dessa perspectiva foi proposta a produção de sistemas microfluídicos com geometrias planares para a produção de emulsão simples e dupla. O estudo consistiu no estudo comparativo de geometrias mais conhecidas para a produção de emulsões simples, utilizando-se diferentes emulsificantes e observando-se o comportamento dos fluidos no sistema. Além disso, para a produção de emulsão dupla, foi proposto o uso de dois novos polímeros para o tratamento de superfície, já descrito processo de microfabricação no capítulo 2. Tanto na produção de emulsão simples como na dupla foi observado a influência do tamanho dos canais no tamanho das gotas obtidas, bem como a influência dos fluxos de entrada no tipo de corte das gotas formadas. O estudo da produção de emulsão contou com medidas de tamanho e índice de polidispersão, além de imagens da produção das gotas auxiliando a caracterizar o tipo de corte.

3.2 EXPERIMENTAL

3.2.1 *EMULSÃO SIMPLES EM MICROCANAIS*

Nesta seção são apresentados os experimentos realizados com os sistemas microfluídicos desenvolvidos para a obtenção de emulsão simples. Características como tamanho das gotas, polidispersão e regime de corte das mesmas são observadas neste estudo.

3.2.1.1 Materiais e Métodos

Para a produção das emulsões simples foram testadas três geometrias conhecidas, a geometria do tipo focalização de fluxo (FFD), a tipo T e tipo T-45°, indicados na Figura 3-10. Os dispositivos possuíam as mesmas dimensões, sendo 100 μm a largura do canal da fase contínua, 50 μm a largura do canal da fase dispersa e profundidade de 80 μm em média.

Figura 3-10. Geometrias para obtenção de emulsão simples: (a) FFD, (b) Junção T e (c) Junção T- 45°

As soluções para a produção de emulsão foram:

- Água De-ionizada (DI) obtida em equipamento Millipore;
- Óleo Mineral NP-35, empresa Anidrol Produtos para Laboratórios Ltda;
- Renex 100, Oxiteno S.A Indústria e Comércio;
- Tween 20 PS, Anidrol Produtos para Laboratórios Ltda.

Na Tabela 3.2 são indicados valores de densidade e viscosidade do óleo mineral e da água utilizados nos cálculos apresentados na sequência.

Tabela 3.2. Propriedades Físico-Químicas do Óleo Mineral e Água

	Densidade ρ (Kg/m ³)	Viscosidade μ (N.s/m ²)
Óleo Mineral	870	0.04
Água	1000	0.001006

Os fluxos foram controlados com duas bombas de seringa PHD 4400 Programable da empresa Harvard Apparatus. Para caracterização da produção das emulsões foram realizados filmes em máquina fotográfica Sony DSC-S600 (6.0 Mega Pixels) e Microscópio Esteroscópio Triocular COLEMAN XTB-2T. Na Figura 3-11 é mostrada a montagem experimental do sistema microfluídico em operação.

Figura 3-11. Montagem experimental do sistema microfluídico em operação

Foram realizados testes comparando os efeitos da vazão de água no tamanho das gotas (150, 100 e 50 $\mu\text{L}/\text{min}$), bem como a influência do percentual de emulsificante (0,2 – 5%) e da razão entre os fluxos de óleo e água (10 a 100), em cada um dos dispositivos testados.

Para a caracterização das gotas foram utilizados os seguintes métodos:

1. O tamanho das gotas foi medido em equipamento da Beckman Coulter - LS230 Laser Diffraction Particle Analyzer.

2. Para os cálculos do número de Capilaridade e Weber foi obtido o valor da tensão interfacial (γ) entre a água e os emulsificantes aplicados com o óleo mineral utilizando um tensiômetro de anel DCAT11 da Dataphysics Instruments GmbH.

3.2.1.2 Resultados

Na Tabela 3.2 são apresentados os valores de tensão interfacial obtidos no tensiômetro DCAT11. A primeira medida foi realizada tomando o óleo mineral e água sem emulsificante, e nas medidas seguintes a água tinha acréscimo dos emulsificantes, testados em diferentes concentrações. Estes valores foram utilizados para os cálculos do número de Capilaridade nos experimentos apresentados.

Tabela 3.2. Medidas de Tensão Interfacial entre Óleo Mineral e Água em diferentes condições.

	γ (mN/m)	Temperatura (°C)
Água e Óleo Mineral	$43,705 \pm 0,002$	$22,54 + 0,01$
Renex 100 (% v/v)		
0,5	$2,522 \pm 0,003$	$20,13 + 0,01$
1	$2,080 \pm 0,004$	$19,77 + 0,01$
5	$1,624 \pm 0,009$	$23,28 + 0,01$
Tween 20 (% v/v)		
0,5	$6,085 \pm 0,012$	$20,78 + 0,01$
1	$5,597 \pm 0,015$	$21,69 + 0,01$
5	$4,242 \pm 0,026$	$20,14 + 0,01$

Na sequência são apresentados os gráficos da relação entre as vazões de água e óleo (ϕ), sendo $R = Q_{\text{água}}/Q_{\text{óleo}}$ e o tamanho de partícula obtido em micrômetros. Na Figura 3-12 são apresentados os gráficos obtidos para o sistema

com geometria do tipo junção T. Em (a) são mostradas as curvas para uma concentração de emulsificante Tween 20 de 1 % em volume e em (b) curvas para a concentração de 0,5%. Foram testadas duas vazões de água, sendo $Q_{\text{água}}$ igual a 50 e 150 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Figura 3-12. Gráficos do tamanho da gota com relação a razão entre os fluxos R para diferentes concentrações de emulsificante: (a) 1% e (b) 0,5% em volume na Junção T.

As curvas mostram que conforme se aumenta o valor de R o tamanho das partículas diminui. Os tamanhos máximos obtidos para as partículas são muito

próximos a largura do canal do óleo (50 μ m), isso para as condições mais baixas de ϕ . Resultados semelhantes foram obtidos para os sistemas com geometria junção Y e para a geometria FFD. Na Figura 3-13 podem ser observados os gráficos para a junção Y e na Figura 3-14 os resultados obtidos para a geometria FFD.

Figura 3-13. Gráficos do tamanho da gota com relação a razão entre os fluxos R para diferentes concentrações de emulsificante: (a) 1% e (b) 0,5% em volume, dispositivo Junção Y.

Figura 3-14. Gráficos do tamanho da gota com relação a razão entre os fluxos R para diferentes concentrações de emulsificante: (a) 1% e (b) 0,5% em volume, dispositivo FFD.

Observa-se ainda, que quando se altera os valores da vazão de água, de 50 para 150 μ L/min tem-se uma diminuição do tamanho da gota de cerca de 10 % somente, conforme indicado na Figura 3-15, sendo (a) o resultado para uma concentração de 1% de Tween 20 e (b) 0,5 % (v/v). Os valores apresentados

referem-se ao dispositivo do tipo Junção T. Os coeficientes de variação de tamanhos variaram de forma aleatória, tendo valores de 1 a 4 % de forma aleatória, sem relação com as variáveis adotadas. Outra observação importante é que os diferentes dispositivos apresentaram comportamento semelhante, tendo valores muito próximos de tamanho de gota, apesar da física que envolve o processo de corte seja distinto.

Figura 3-15. Histograma do tamanho das gotas pela vazão de água: (a) resultados para 1 % de T20 e (b) 0,5%.

O aumento do emulsificante diminui o tamanho das partículas e altera também o tipo de corte. Para observar o efeito desta diminuição, foram testados os dois tipos de emulsificantes (Tween 20 e Renex 100) e em uma concentração mais

alta. Na Figura 3-16 são apresentados os gráficos com a relação do tamanho da gota com a razão entre os fluxos R, sendo (a) para o uso do Renex 100 e (b) para o Tween 20.

Figura 3-16. Gráficos com a relação do tamanho da gota com a razão entre os fluxos R, sendo (a) para o uso do Renex 100 e (b) para o Tween 20.

Observa-se em (a) os resultados para o uso do Renex 100 e em (b) os resultados para o emulsificante Tween 20. Com o uso do Renex 100 é possível se obter partículas com tamanho de 15 μm , uma maior redução de tamanho levando-se em conta a dimensão de 50 μm do canal do óleo mineral. Para uma razão entre fases (R) menor, os tamanhos obtidos para as gotas também são menores. Além disso, com este óleo mineral foi possível chegar a uma relação entre as fases R de até 100, valores maiores não foram possíveis de serem obtidos. Em alguns trabalhos são apresentados valores de R de até 400. A razão de viscosidade λ é definida como $\mu_{\text{disperso}}/\mu_{\text{contínuo}}$. No caso do óleo utilizado nestes experimentos, a diferença foi igual a 40, ou seja, foi utilizado um óleo bastante viscoso o que dificulta se trabalhar com relações maiores entre as fases aquosa e oleosa.

A partir dos valores medidos de tensão interfacial, foram calculados os valores do número de Capilaridade para diversos valores de vazão de água (Q_c). Os resultados são mostrados para os dois tipos de emulsificantes utilizados na Figura 3-17. Em (a) são indicados os resultados para o Renex 100 e em (b) os valores para o Tween 20. As curvas foram plotadas considerando-se diferentes percentuais de concentração, sendo que os valores de tensão interfacial (γ) gerados foram apresentados na Tabela 3.2.

Figura 3-17. Valores do número de Capilaridade (Ca) para diversos valores de vazão de água (Q_c): (a) para Renex 100 e (b) para Tween 20.

Com o aumento da vazão de água tem-se o aumento do número de capilaridade. Com o acréscimo de emulsificante, os valores de Ca também aumentam gradualmente. O valor de Ca determina o tipo de corte nos sistemas

microfluídicos. Para valores de Ca_c abaixo de 0,011, apresentados principalmente nos cálculos sem a presença de emulsificante, temos o corte do fluxo disperso sem a formação de gotas, mas sim a formação dos chamados plugs. Com o aumento do número de Capilaridade, há sim a formação de gotas e quanto maior o valor, menor será o tamanho das gotas, caminhando para um corte de gotas denominado jetting, onde há a formação de um prolongamento da fase dispersa para ser cortada em gotas mais a frente nos microcanais. Nas próximas sessões são mostradas as imagens dos cortes para cada tipo de dispositivo onde se pode perceber a formação dos prolongamentos com o aumento da capilaridade.

- **Junção T**

Na Figura 3-18 são apresentadas imagens da sequência da formação de gotas com a ausência de emulsificantes para o sistema Junção-T. Neste exemplo, $Q_{\text{água}}$ era igual a 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, $Q_{\text{óleo}}$ era 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ e o número de capilaridade foi de 0.001. Em (a) observa-se o início do corte e, além disso, nesses exemplos não há a formação de gotas exatamente redondas, mas sim dos chamados plugs (b). Neste exemplo as gotas coalescem, ou seja, se unem formando gotas maiores no reservatório final. As emulsões neste caso, não tem estabilidade e por isso, não possuem aplicação, pois o óleo e água se separam, formando duas fases separadas no Becker.

Figura 3-18. Formação das gotas com ausência de emulsificante: (a) início da formação da gota e (b) gota gerada com formato plug.

São apresentados na sequência os resultados principais obtidos para o sistema Junção T, utilizando os emulsificantes Renex 100 e Tween 20, indicando os regimes de corte conforme o número de Capilaridade. São indicadas nas imagens as condições de fluxo utilizadas e os valores de Ca . Nos exemplos mostrados, a concentração de emulsificante foi de 0,5% em volume. Na Figura 3-19 é mostrada uma sequência para o emulsificante Renex 100 e na Figura 3-20 a sequência de imagens para o Tween 20.

Imagens	Condições
<p>Ca = 0.044</p> <p>$Q_{\text{água}} = 45 \mu\text{L/min}$</p>
<p>Ca = 0.098</p> <p>$Q_{\text{água}} = 100 \mu\text{L/min}$</p>
<p>Ca = 0.196</p> <p>$Q_{\text{água}} = 200 \mu\text{L/min}$</p>

Figura 3-19. Regimes de corte para diferentes valores de Ca utilizando o Renex 100.

Imagens	Condições
<p>$Ca = 0.018$</p> <p>$Q_{\text{água}} = 45 \mu\text{L/min}$</p>
<p>$Ca = 0.081$</p> <p>$Q_{\text{água}} = 100 \mu\text{L/min}$</p>
<p>$Ca = 0.098$</p> <p>$Q_{\text{água}} = 200 \mu\text{L/min}$</p>

Figura 3-20. Regimes de corte para diferentes valores de Ca utilizando o Tween 20.

Nas imagens obtidas para o Renex 100, pode-se observar que conforme Ca aumenta, o corte da gota se realiza cada vez mais distante da junção T, formando um prolongamento do fluxo disperso que se quebra numa gota pequena e de formato arredondado. Para o Tween 20, mesmo para números de Ca bem pequenos houve a formação do prolongamento, mas da mesma maneira, conforme o aumento do valor de Ca o corte se dá cada vez mais distante da junção T. Para o emulsificante Tween 20 não houve uma diminuição muito grande dos tamanhos das gotas obtidas, possivelmente porque a tensão interfacial, cerca de 6,0 mN/m, não foi tão pequena como no caso do Renex 100, cerca de 2,5 mN/m. Considerando a classificação de regimes de corte propostas por J. Xu et al. ^[86] todos os experimentos realizados permaneceram na região chamada *dripping*, com Ca entre 0.01 e 0.3.

- **Junção Y**

A Junção Y opera de forma semelhante ao sistema Junção T. Na Figura 3-21 pode-se observar o corte das gotas em situações distintas. Conforme Ca aumenta, tem-se uma modificação no tipo de corte e por conta disso, obtêm-se gotas maiores ou menores, com formatos arredondados ou plugs. Com o aumento do valor de Ca, o corte da gota se dá mais distante da junção, após o prolongamento do fluxo de óleo, dessa maneira obtendo-se gotas cada vez menores e com formato arredondado. Nas condições de Ca mais baixos, há a formação de plugs e coalescência das gotas no reservatório final.

Figura 3-21. Diferentes cortes das gotas para a geometria Junção Y e seus respectivos números de Capilaridade.

- **FFD**

No sistema com geometria FFD, o fluxo de óleo é pressionado pelo fluxo de água em duas vias. Conforme apresentado nos resultados anteriores, com relação ao tamanho das gotas as diferenças não são tão relevantes que se possa optar por uma geometria ou por outra. Resultados semelhantes podem ser obtidos em cada um dos sistemas, cuidando dos valores da viscosidade, tensão interfacial e dos fluxos, disperso e contínuo. Na Figura 3-22 são apresentadas imagens com os valores correspondentes de Ca. Nos exemplos mostrados, a concentração do emulsificante Renex 100 é de 1%.

Imagens	Condições
$Ca = 0.06$ $Q_{água} = 50 \mu\text{L}/\text{min}$ <i>Regime dripping</i>
$Ca = 0.179$ $Q_{água} = 100 \mu\text{L}/\text{min}$ <i>Regime dripping</i>
$Ca = 0.238$ $Q_{água} = 100 \mu\text{L}/\text{min}$ <i>Regime dripping</i>

Figura 3-22. Diferentes tipos de corte de gotas utilizando geometria FFD e suas respectivas condições de operação.

Da mesma maneira que os resultados obtidos anteriormente, conforme se aumenta o valor de Ca , obtém-se o corte das gotas cada vez mais distante da junção. No trabalho de Anna et.al.^[85], o regime do corte do tipo dripping aparece para valores maiores de Ca , acima de 0.3. A partir de um valor de Ca acima de 1, tem-se ainda um regime de corte intitulado jetting, com formação de gotas extremamente pequenas considerando um dispositivo do tipo flow focusing. Na última imagem da Figura 3-22, percebe-se a formação de um prolongamento fino do fluxo de óleo, parecido com um jato, formando as gotas. O dispositivo do artigo, no entanto, fora fabricado em PDMS com óleo mineral como fase contínua e água como fase dispersa. As diferenças nos valores de Ca , onde se modificam os regimes de corte podem ser explicados por essa diferença no tipo de emulsão (A/O) produzido nos sistemas apresentados no artigo com os sistemas operados neste trabalho, já que a viscosidade do óleo, utilizada para calcular o valor de Ca no artigo, é maior que a da água. Deve-se observar também, como já apresentada nos gráficos relativos ao tamanho das gotas, a influência da razão entre os fluxos ϕ . Na Figura 3-23 pode-se observar este efeito para um mesmo valor de $Q_{\text{água}}$ e de Ca . Conforme já observado nos gráficos, com o aumento de R há a diminuição do tamanho das gotas.

$Ca = 0.179$ e $We = 0,0104$

$Q_{\text{água}} = 150 \mu\text{L}/\text{min}$

Regime dripping

$R=30$

$Ca = 0.179$ e $We = 0,2203$

$Q_{\text{água}} = 150 \mu\text{L}/\text{min}$

Regime dripping

$R=60$

$Ca = 0.179$ e $We = 0,301$

$Q_{\text{água}} = 150 \mu\text{L}/\text{min}$

Regime dripping

$R=100$

Figura 3-23. Produção das gotas em diferentes valores de ϕ .

Diante desses resultados pode-se concluir que os sistemas microfluídicos microfabricados são eficazes na produção de gotas. Para projetar uma dada emulsão, valores como o número de Capilaridade, viscosidade dos líquidos e relação entre as vazões de fluxo são extremamente importantes. O número de

Reynolds nesses experimentos variou de 2 a 59 garantem um escoamento laminar e são importantes no sentido de determinar a rapidez com que se produzem as gotas. Em um sistema com maior vazão, onde Re é igual a 59, por exemplo, a frequência da produção de gotas é maior e garante maior quantidade em menos tempo. Os sistemas operaram de maneira muito próxima, ou seja, não apresentam grandes divergências de resultados dos tamanhos das gotas considerando-se as mesmas condições, de forma que se pode escolher qualquer uma das geometrias para se produzir as emulsões simples.

3.2.2 EMULSÕES DUPLAS NOS MICROCANALIS

Nesta seção são apresentados os resultados referentes à produção de emulsão dupla, utilizando-se o sistema de dupla focalização hidrodinâmica e tratamentos de superfície com os polímeros BCB e Parylene-C.

3.2.2.1 Materiais e Métodos

Para a produção de emulsão dupla foi microfabricado um sistema de dupla focalização hidrodinâmica (FFD) com tratamento de superfície (BCB/ou Parylene-C) na região indicada na Figura 3-24, sendo possível a produção de emulsões A/O/A. As dimensões do sistema são indicadas na Tabela 3.3:

Figura 3-24. Esquema do sistema microfluídico para dupla emulsão A/O/A indicando as regiões hidrofílica e hidrofóbica.

Tabela 3.3 Dimensões do sistema microfluídico para dupla emulsão

Especificação	Dimensão
	μm
1ª junção	50 ± 1
2ª junção	100 ± 1
Canal de Saída	200 ± 1
Profundidade	87 ± 1
Espessura do Filme Polimérico	5 ± 1

Para caracterização do sistema de dupla emulsão foi proposta a encapsulação da vitamina B12 em óleo, sendo a vitamina diluída em água cortada pelo óleo na primeira junção, e o óleo sendo cortado por uma fase aquosa mais externa na segunda junção. Na Figura 3-25 são mostradas imagens do sistema para dupla emulsão em operação.

Figura 3-25. Sistema Microfluídico para dupla emulsão em funcionamento.

As soluções utilizadas para a caracterização do sistema de dupla emulsão foram:

- Água De-ionizada obtida em equipamento Millipore;
- Óleo Mineral NP-35, empresa Anidrol Produtos para Laboratórios Ltda;
- Óleo Triglicerídeo de ácido cáprico e caprílico;
- Emulsificante Lecitina de Soja;
- SpanTM 80 (monooleato de sorbitano – $C_{24}H_{44}O_6$), empresa Sigma Aldrich.
- Tween 20 - Polisorbato 20 - Laurato de Sorbitan Etoxilado, Sigma-Aldrich
- Vitamina B12 (α -(5,6-dimetilbenzimidazolil)cianocobalamina – $(C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P)$).

A vitamina B12 foi dissolvida em água, na concentração de 4 mg/ml, e 0,5% (v/v) de Tween 20 foi adicionado nesta solução. Ao óleo mineral foram adicionados 0,1% de Span 80, e na fase aquosa mais externa foi adicionado Tween 20 5% (v/v). O óleo Triglicerídeo permitiu efetivamente o encapsulamento das gotas de vitamina B12 em óleo e foi testado com a Lecitina de Soja mais o Span 80 como emulsificante na concentração de 1 % w/v. Nos ensaios onde foi possível o encapsulamento foi utilizado o Tween 20 na primeira junção e o na fase mais externa, na concentração de 0,5%.

Foram realizadas medidas de tensão interfacial entre os fluidos para os cálculos diversos através de um tensiômetro da empresa DataPhysics modelo DCAT 11 para os primeiros ensaios, onde se trabalhou com o óleo mineral. As gotas obtidas foram observadas por microscópio óptico da marca Olympus modelo BX41.

3.2.2.2 Resultados

✓ Sistema com Parylene-C

Nos primeiros ensaios foram utilizados o óleo mineral e o emulsificante Tween 20 para caracterização do sistema de dupla emulsão. O que se observou, porém, é que apesar de haver o corte de gotas nas duas junções do sistema, não foi possível o encapsulamento da gota de vitamina B12 dentro da gota de óleo. O óleo mineral com SPAN 80 como emulsificante não é eficiente para esse processo de dupla emulsão. O encapsulamento só foi possível com a modificação do óleo mineral para o óleo triglicérido com a Lecitina de soja como emulsificante. No entanto, os estudos com Tween 20 são apresentados na sequência, servindo de base para entendimento dos tipos de corte possíveis no sistema de emulsão dupla.

Para se conhecer os valores da tensão interfacial γ entre as fases foram realizadas medidas no tensiômetro e os resultados são expressos na Tabela 3.4. Os valores foram obtidos para o uso de óleo mineral e os emulsificantes Tween 20 e SPAN 80. Para os resultados com a lecitina de soja e o SDS não houve a medida e deverá ser realizada em trabalhos futuros. Esses valores são utilizados nos cálculos de Capilaridade e Número de Weber.

Tabela 3.4. Tensões Interfaciais entre as fases utilizadas para produção de Emulsão Dupla.

Fases	γ (mN/m)
O. M. com SPAN 80 (0,1%) e Água com T20 (5%)	$0,644 \pm 0,011$
O. M. com SPAN 80 (0,1%) e Água com T20 (0,5%)	$0,377 \pm 0,026$

A primeira sequência de ensaios foi realizada com o sistema tratado com Parylene-C e são apresentadas na Figura 3-26, combinando as imagens com as condições trabalhadas. A relação entre as vazões na região do primeiro corte,

adotou-se a notação R_1 e na região do segundo corte, adotou-se a notação R_2 . Nos exemplos mostrados, a fase aquosa mais externa foi fixada com valor de vazão de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. Os valores de capilaridade referem-se à fase mais externa (Q_{ext}) e Weber refere-se à fase da Vitamina, mais interna (Q_{vit}). Os ensaios foram realizados dentro de regiões onde deveria ocorrer o corte nas duas junções, considerando-se os valores de Weber e Capilaridade. Os valores de Capilaridade e de Weber calculados referem-se aos fluxos da primeira junção, ou seja, a vitamina B12 diluída em água e o óleo mineral.

Imagens	Condições
$Q_{\text{vitamina}} = 10 \mu\text{L/min}$ $Q_{\text{óleo}} = 75 \mu\text{L/min}$ $Q_{\text{água}} = 200 \mu\text{L/min}$ $R_1 = 7,5$ e $R_2 = 2,6$ $Ca = 0,2$ $We = 0,014$
$Q_{\text{vitamina}} = 50 \mu\text{L/min}$ $Q_{\text{óleo}} = 150 \mu\text{L/min}$ $Q_{\text{água}} = 200 \mu\text{L/min}$ $R_1 = 3$ e $R_2 = 1,33$ $Ca = 0,38$ $We = 1,45$
$Q_{\text{vitamina}} = 25 \mu\text{L/min}$ $Q_{\text{óleo}} = 100 \mu\text{L/min}$ $Q_{\text{água}} = 200 \mu\text{L/min}$ $R_1 = 4$ e $R_2 = 2$ $Ca = 0,5$ $We = 1,26$

Figura 3-26. Produção de Dupla Emulsão para diferentes condições, utilizando o emulsificante Tween 20

Observa-se que com o aumento do número de Weber para valores tendendo a 1, o corte das gotas se dirige mais para depois da segunda junção. Na primeira imagem da Figura 3-26 é mostrado o contraexemplo, onde os cortes deveriam se dar em cada junção de maneira independente. No entanto, pode-se notar que as gotas de vitamina B12, caracterizadas pela cor vermelha, escapam do óleo, não

ocorrendo o encapsulamento. Na terceira imagem, pode-se ver o escape completo da vitamina sem a formação de emulsão, e o óleo sendo cortado em dois pontos distintos. As gotas obtidas não possuíam tamanho homogêneo, com partículas de tamanhos da dimensão dos canais, podendo chegar até 200 μm . Em todos os exemplos estudados, o número de Reynolds não foi superior a 45.

Foram testados também, antes da modificação do óleo mineral para o óleo triglicerídeo, alguns sais na fase aquosa interna e externa de forma a garantir a estabilidade da gota dentro do óleo. A ideia de se utilizar algum sal foi de criar uma barreira eletroquímica para que a gota permanecesse encapsulada. Sais como Cloreto de Cálcio e Cloreto do Sódio foram testados na concentração de 1 a 5%, mas sem sucesso para reter a vitamina B12.

Na Figura 3-27 são mostradas imagens dos resultados obtidos das emulsões em microscopia óptica. Pode-se notar a presença de gotas de vitamina B12, cor naturalmente avermelhada, e gotas transparentes (óleo) independentes, ou seja, sem a formação de emulsão dupla.

Figura 3-27. Imagens obtidas por microscopia óptica da dupla emulsão produzida no sistema microfluídico.

Após estes resultados, optou-se por trocar o óleo mineral para o triglicerídeo com a lecitina de soja como emulsificante com o acréscimo do SPAN 80, mas na concentração de 1%. Não houve a possibilidade de se mensurar a tensão interfacial, mas pelos resultados pode-se prever de maneira qualitativa em que região está o corte das gotas.

Na Figura 3-28 é apresentada uma sequência de imagens da obtenção de emulsão dupla com o uso do triglicerídeo e da lecitina de soja. Nesta sequência, o fluxo mais externo (Q_{ext}) de água foi fixado em 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ e o fluxo de vitamina (Q_{vit}) B12 em 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, o fluxo de óleo ($Q_{óleo}$) variou de 30 até 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Então, seguindo a sequência tem-se em (a) o fluxo de óleo ($Q_{óleo}$) de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$, em (b) $Q_{óleo}$ de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, em (c) 75 $\mu\text{L}/\text{min}$ e (d) 100 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Figura 3-28. Produção de dupla emulsão com o óleo triglicerídeo: (a) $Q_{óleo} = 30$, (b) $Q_{óleo} = 50$, (c) $Q_{óleo} = 75$ e (d) $Q_{óleo} = 100$ $\mu\text{L}/\text{min}$.

A sequência de imagens indica que conforme se aumentou a taxa de fluxo da fase oleosa, mais distante da junção foi o corte da segunda gota e obtendo-se partículas de tamanhos grandes. Quando o corte se deu mais próximo as junções, as gotas foram menores, isso valendo tanto para a vitamina como para o óleo.

Na Figura 3-29 são mostradas as imagens da emulsão dupla obtida com o óleo triglicerídeo e a lecitina de soja como fase oleosa, encapsulando a vitamina B12. Observou-se que com as condições utilizadas, muitas gotas de óleo ficaram

sem gotas de vitamina em seu interior, e que os tamanhos ainda estão polidispersos e muito grandes, chegando à largura do canal de saída de 200 μm . As gotas de vitamina tiveram o tamanho máximo idêntico à largura do canal de 50 μm . Outra questão é a estabilidade da emulsão. A emulsão obtida não permanece estável por muitos minutos, o que impossibilitou medidas mais precisas dos tamanhos. Encontrar condições de concentrações de emulsificantes para se obter emulsões duplas estáveis e controladas será tarefa para próximos trabalhos.

Figura 3-29. Emulsão dupla: Gotas de vitamina B12 encapsuladas em óleo triglicérido com lecitina de soja como emulsificante.

✓ Sistema com BCB

O sistema tratado com o polímero BCB foi estudado utilizando-se inicialmente também o óleo mineral, obtendo-se basicamente os mesmos problemas. É possível a obtenção do corte de gotas em cada uma das junções, no entanto, não houve encapsulamento. Na Figura 3-30 são mostrados dois exemplos dos cortes obtidos em sistema tratado com o BCB, utilizando o óleo mineral com SPAN 80 e as fases aquosas com Tween 20. A fase mais externa foi mantida a 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ e a mais interna a 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, sendo a fase oleosa em (a) igual a 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ e em (b) igual a 50 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Figura 3-30. Estudo da obtenção de emulsão dupla em sistema microfluídico tratado com BCB. (a) fase oleosa com fluxo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ e (b) 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Fase mais externa e interna fixas em 200 e 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, respectivamente.

O uso do óleo triglicerídeo, porém, não permitiu os mesmos resultados, pois a lecitina de soja aglomera nas paredes tratadas com BCB, causando entupimento. A concentração de lecitina de soja foi reduzida até 0,1 %, porém, não foi possível a obtenção da emulsão dupla para o sistema tratado com BCB. Esse problema da adesão da lecitina nas paredes levantou a hipótese de que possam ocorrer interações elétricas entre alguns produtos utilizados e determinados fluidos com as paredes dos canais tratados. Essa hipótese vem conduzindo um estudo à respeito do potencial zeta de superfície dos substratos utilizados na microfabricação conforme a variação do pH dos fluidos utilizados na medida.

3.3 CONCLUSÕES PARCIAIS

A produção de emulsão dupla em sistemas microfluídicos é uma tarefa mais complexa do que a produção de emulsão simples, levando-se em conta a necessidade de tratamentos de superfície dos sistemas para modificação de regiões de hidrofílica para hidrofóbica e vice-versa, além do acerto dos fluidos como os óleos que permitem a produção da emulsão com emulsificantes nas concentrações corretas para a produção de emulsões controladas e estáveis.

Os resultados obtidos mostram que há viabilidade no uso do Parylene-C e do BCB como tratamento de superfícies, no entanto maiores estudos precisarão ser realizados. Almeja-se um controle efetivo de encapsulamento, obter condições corretas do uso de maneira que se possa controlar o número de gotas encapsuladas no óleo, bem como seu tamanho. A produção de emulsões O/A/O também são almejadas, dessa maneira esse trabalho terá continuidade.

A produção de emulsão dupla foi possível utilizando-se o Parylene-C como tratamento de superfície, utilizando o óleo triglicérido com a lecitina de soja como emulsificante. Uma medida mais precisa do das partículas obtidas não foi possível pela rápida separação de fases dos líquidos utilizados. A mesma emulsão, no entanto, não foi possível quando o sistema microfluídico possuía o tratamento de superfície com o BCB. Observou-se que a lecitina aderiu nas paredes do polímero promovendo seu entupimento. Esse problema levantou a hipótese de que a carga elétrica dos fluidos e emulsificantes utilizados pode comprometer o funcionamento do dispositivo microfluídico causando entupimentos. Com isso, um estudo do potencial de superfície dos substratos utilizados na microfabricação com a variação do pH dos fluídos foi proposto e está em desenvolvimento no laboratório do IPT.

4. NANOPRECIPITAÇÃO

4.1 ESTADO DA ARTE

4.1.1 *Processos de Cristalização*

A cristalização é um processo importante de separação e purificação de um sólido, amplamente aplicada na indústria química, de alimentos e farmacêutica. Com a cristalização é possível se obter um cristal com tamanho e hábito cristalino desejado a partir de uma solução precursora que possui as moléculas de interesse para a formação do cristal ^[101,102]. Em produtos farmacêuticos, por exemplo, o processo de cristalização permite controlar propriedades da partícula gerada, além da distribuição de tamanhos e do hábito cristalino, a área superficial e o formato do cristal, itens que afetam a biodisponibilidade da droga processada.

O processo de cristalização se inicia com a nucleação primária, onde as moléculas presentes na solução mãe se agregam para formar os primeiros cristais. Para que a nucleação ocorra é necessário atingir a condição de supersaturação da solução precursora, ou seja, condição em que a concentração de soluto no meio líquido é maior que a condição de saturação (limite de solubilidade). Os primeiros cristais podem ainda se transformar em novos núcleos gerando novos cristais, promovendo o que se intitula nucleação secundária. Estes núcleos podem crescer, e o controle de propriedades como temperatura, agitação, auxiliam no controle desse crescimento e conseqüentemente nas propriedades do produto final ^[103].

Para a obtenção da condição de supersaturação da solução precursora são comumente aplicados os seguintes métodos ^[101]:

- Evaporação de solvente;
- Processos de Resfriamento;
- Por Reação Química, como reação eletroquímica ou neutralização;

- Por mudança do meio, como a precipitação com adição de anti-solvente que reduz a solubilidade do soluto.

O controle da condição de supersaturação é algo complexo de ser obtido na escala macrométrica em equipamentos chamados cristalizadores. As condições de temperatura e concentração em cada operação nem sempre são homogêneas, gerando cristais com larga distribuição de tamanhos e mesmo traços de impurezas. O solvente da solução precursora também desempenha papel importante, podendo gerar cristais de um mesmo produto com formatos diferentes.

Dentro desse contexto da Cristalização, a obtenção de nanocristais é um grande destaque da atualidade. O controle da nucleação pode garantir partículas com tamanhos que variam de 1 a 1000 nm (1µm). Diversos métodos são aplicados para obtenção dos nanocristais em sistemas bateladas como a precipitação, moagem e homogeneização em alta pressão. Estes métodos, no entanto, apresentam dificuldades como necessitarem de mais etapas como estabilização, homogeneização e filtragem, serem lentos ou exigirem altos dispêndios de energia [104]. A Microfluídica, por sua vez, se apresenta como uma alternativa promissora para a obtenção dos nanocristais.

4.1.2 Importância da nanoescala

No setor farmacêutico a produção de nanopartículas representa um grande avanço na produção de fármacos. Estima-se que na atualidade cerca de 40% dos fármacos disponíveis no mercado, por efeito da cristalinidade, são insolúveis em meio aquoso e cerca de 70% dos fármacos que vêm sendo estudadas são consideradas pouco solúveis no mesmo meio [105]. Essa condição implica no uso de mais altas doses do medicamento para garantir o efeito terapêutico desejado, no entanto, para muitos desses fármacos, a dose desejada causa graves efeitos colaterais chegando até mesmo a altos níveis de toxicidade, impedindo o seu uso [106]. Para se contornar o problema da baixa solubilidade desses fármacos, algumas medidas podem ser adotadas como a modificação do perfil cristalino do material a

partir de formação de co-cristais ou obtenção de polimorfos metaestáveis; a modificação de pH pode ser utilizada; a amorfização do cristal; a redução do cristal em micro ou nanopartículas ou mesmo a reformulação do fármaco, utilizando-se de aditivos como emulsificantes ou formulação com uso de lipídios e outros tipos de carreadores.

Dentro das soluções apresentadas, a redução do tamanho dos cristais para a micro e nanoescala tem ganhado destaque. Com a redução de tamanho, há um aumento da área superficial do cristal, aumentando assim a taxa de dissolução da partícula e sua difusão em diferentes meios. A redução de tamanho dos cristais pode ser obtida através de processo de moagem, chamados de cominuição, por processos de homogeneização em alta pressão, uso de spray-dryers e uso de dispositivos microfluídicos a partir de processos de nanoprecipitação.

4.1.3 Nanoprecipitação em Dispositivos Microfluídicos

A mistura por difusão em sistemas microfluídicos possui aplicações interessantes na produção de micro e nanopartículas. A partir de reações químicas entre duas ou mais soluções, pode-se obter partículas autoformadas (self-assembly), controlando-se parâmetros simples como os fluxos de entrada dos reagentes, geometria dos microcanais e concentração do ativo precursor desejado. Essa técnica de produção de partículas é classificada como processo *bottom-up*, ou seja, parte de estruturas menores ou moleculares para estruturas maiores^[107].

Com os dispositivos microfluídicos podem-se sintetizar materiais diversos, orgânicos ou inorgânicos, produzindo-se nanopartículas. Para isso, toma-se uma solução precursora, material desejado dissolvido em um solvente, por exemplo, e uma solução anti-solvente. As duas soluções quando em contato, se misturam, criando uma condição de supersaturação, permitindo a nucleação e crescimento das partículas. Esse processo é conhecido como nanoprecipitação. A microfluídica oferece condições ideais para a produção de partículas por nanoprecipitação, sendo elas^[108].

- a) Alto grau de supersaturação;
- b) Distribuição espacial uniforme da concentração do ativo;
- c) Mesmo tempo de crescimento para todos os cristais, gerando partículas com baixa polidispersidade.

Em Zhao et. Al. ^[109] é apresentada uma comparação entre o tempo de mistura em um tanque convencional e um micromisturador, para justificar a uniformidade de tamanho para as partículas formadas. Inicialmente, definiu-se o tempo de mistura como sendo τ_m (Equação 4.1), sendo o tempo em que se alcança a máxima mistura no nível molecular e τ_i , como tempo de indução, aquele em que ocorre a primeira nucleação. Para uma nucleação nanométrica homogênea, o tempo de mistura deve ser menor que o tempo de indução ($\tau_m < \tau_i$).

$$\tau_m = k_m \left(\frac{\nu}{\epsilon} \right)^{1/2}$$

Equação 4.1.

Sendo k_m uma constante, ν viscosidade cinemática e ϵ dissipação de energia.

O tanque convencional garante um tempo de mistura entre 5 a 50 ms. Considerando-se um tempo de indução de 1 ms, temos que $\tau_m > \tau_i$, implicando na formação de partículas de difícil controle de tamanho e crescimento. O micromisturador, entretanto, rendeu um tempo τ_m de 0.25 a 0.35 ms, garantindo que $\tau_m < \tau_i$, condição essencial para a formação de partículas de tamanho uniforme. Na Figura 4-1 é mostrado um diagrama esquemático comparando esses tempos.

Figura 4-1. Comparação entre o tempo de mistura de um tanque convencional e um microreator, (adaptação de Zhao et. al.^[109]).

Utilizando então um microreator com uma geometria do tipo Y (Figura 4-2), os autores sintetizaram nanopartículas de Danazol, um medicamento utilizado para tratamento de Endometriose. As nanopartículas obtidas no microreator mantiveram as características físicas e químicas do Danazol não processado em sistemas microfluídicos. A solubilidade do fármaco, no entanto, foi ampliada de 35% para 100% no tempo de 5 min. Outros exemplos de fármacos como hidrocortisona oftalmológica ^[110,111], cefuroxime axetil ^[112,113], calcium atorvastatin ^[114] foram processados da mesma maneira com comportamento semelhante, ou seja, obteve-se nanopartículas do fármaco com baixo índice de polidispersão, aumentando a área superficial e melhorando a taxa de dissolução da droga.

Figura 4-2. Microreator com geometria em Y para produção de nanopartículas de Danazol.^[109]

Nanopartículas de Sulfato de bário foram obtidas a partir da reação química entre ácido sulfúrico e cloreto de bário em Kockmann et. al. ^[115]. O sistema

microfluídico utilizado tinha uma geometria conhecida como junção-T microfabricada em silício. Diversos sistemas com tamanhos diferentes de canais foram construídos permitindo testes em diferentes números de Reynolds. O número de Reynolds foi variado de 200 a 500, obtendo-se partículas menores conforme o aumento do número adimensional, indicando maior eficiência de mistura. As partículas variaram de 91 nm até 252 nm. Uma questão importante levantada no trabalho foi o tamanho da região onde as partículas são formadas, região de difusão. A região de difusão não ultrapassou 15 mm, pois se observou que canais muito compridos entupiam com facilidade. Dessa forma, o projeto dos sistemas devem levar em consideração as dimensões para que se evite a aglomeração e entupimento ou ainda, pode-se optar por dispositivos descartáveis.

Em Karnik et. al. ^[116] é apresentado um exemplo de aplicação de microreatores na sintetização de nanopartículas poliméricas. Os autores justificam que em outros processos de mistura, o controle do tamanho e das propriedades das nanopartículas fica comprometido. Neste trabalho utilizou-se o polímero de ácido láctico-co-glicólico ligado a cadeias de polietileno glicol (PLGA-PEG), com o objetivo de se gerar nanopartículas em torno de 200nm. Os microreatores foram fabricados em PDMS com uma geometria do tipo focalização hidrodinâmica (FFD), onde o fluxo precursor é confinado por fluxos laterais que são constituídos de um antissolvente. Quanto maior a constrição feita ao fluxo central, menores são as partículas formadas. O tempo de mistura (Equação 4.2) foi estimado considerando-se também um modelo em 2 dimensões, onde o tamanho do canal e a relação entre os fluxos determinam o tempo de mistura:

$$\tau_{mix} \sim \frac{W_f^2}{4D} \approx \frac{W^2}{9D} \frac{1}{(1 + \frac{1}{R})^2}$$

Equação 4.2.

Sendo W_f a largura do fluxo do fluido precursor e W é a largura do canal (Figura 4-3 (a)), R a razão entre a taxa de fluxo do polímero e o fluxo total de água e D a difusividade do solvente. Observou-se que quanto menor o tempo de mistura,

menores são as partículas obtidas. Na Figura 4-3 (b) são mostradas partículas obtidas.

Figura 4-3. (a) Esquema ilustrativo da nanoprecipitação de PLGA-PEG e (b) partículas obtidas. ^[116]

Em Lo et. al.^[117] microreatores são utilizados para a produção de niossomas. Vesículas sintéticas, formadas a partir de emulsificante aniônico, úteis para o encapsulamento de fármacos. Foram microfabricados dispositivos em silício e em PDMS, com uma geometria do tipo focalização de fluxo. Testes foram realizados variando-se o fluxo total, a presença de emulsificantes e a relação entre os fluxos. O solvente utilizado foi o isopropanol. Nos resultados, observou-se que o uso de determinados emulsificantes podem alterar a focalização do fluxo (SPAN 60), aumentando o tamanho das partículas (Figura 4-4). O valor do fluxo total não interfere no tamanho das partículas, podendo-se gerar partículas de tamanhos idênticos com fluxos em 50 ou 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Já a relação entre o fluxo central e os fluxos laterais é determinante nos tamanhos finais dos niossomas, sendo que quanto maior o valor entre a razão dos fluxos, menor é o tamanho das partículas.

Figura 4-4. Focalização de fluxo para a produção de niossomas com diferentes emulsificantes.^[118]

Notou-se ainda, fator bastante relevante, que o dispositivo microfabricado em silício permitiu a geração de partículas menores, da ordem de 27 nm, enquanto que nos dispositivos em PDMS observou-se um aumento do tamanho das partículas obtidas, devido à expansão das paredes do polímero em fluxos mais altos (aumento de até 16 % das paredes), além do problema de deformação com determinados solventes comumente utilizados na produção de nanopartículas como clorofórmio, acetona, entre outros.

Além dos niossomas, lipossomas também podem ser processados através da nanoprecipitação em sistemas microfluídicos^[118,119,120]. Em Jahn et.al.^[121] foi realizado um estudo da formação de lipossomas em microcanais fabricados em silício e vidro, com tamanhos de canais diferentes. Notou-se que para as mesmas condições de fluxo havia diferença nos tamanhos das partículas em cada um dos sistemas. Entretanto, acertando corretamente os fluxos e a variação entre os fluxos de solvente e antisolvente era possível se obter o mesmo tamanho de partícula (desejado entre 50 a 150 nm). Isso quer dizer que o tamanho dos canais não é um fator limitante e o uso de canais mais largos oferecem maior facilidade de fabricação dos sistemas, além de maior volume de solução final.

No Laboratório de Processos Biotecnológicos da Unicamp, a formação dos lipossomas em sistemas microfluídicos foi comparada com a formação em sistema batelada^[122]. Os dispositivos microfluídicos utilizados foram microfabricados conforme descrição apresentada no Capítulo 2, dentro da perspectiva das aplicações deste trabalho, nas dependências do LSI (POLI-USP) e IPT. Observou-se

que as características físicas químicas dos lipossomas foram semelhantes no processo batelada e no processo microfluídico. Para se comparar efetivamente o volume produzido entre os dois sistemas batelada e microfluídico se propõe a produção de microcanais em paralelo. Os resultados mostraram ainda que a formação de lipossomas depende não somente da relação entre as vazões dos fluidos como também da concentração inicial dos lipídeos em Etanol. Quanto maior a concentração, maiores foram os tamanhos obtidos das nanopartículas. Nos melhores resultados deste trabalho obteve-se partículas na faixa dos 100 nm com polidispersão menor que 0.3. Na Figura 4-5 (a) é apresentado o dispositivo utilizado e em (b), a focalização de fluxo para obtenção dos lipossomas.

Figura 4-5. (a) Dispositivo microfluídico utilizado para a produção de lipossomas e (b) Focalização de fluxo para formação dos lipossomas.^[122]

Em outro trabalho do mesmo laboratório foi estudada a nanoprecipitação de ácido hialurônico utilizando o mesmo sistema microfluídico ^[123]. As partículas formadas também possuem aplicação de interesse na área de encapsulamento e liberação de fármacos. No estudo desenvolvido foram testados três diferentes solventes, sendo eles o álcool isopropílico, o etanol e a acetona. Os três solventes resultaram na produção de nanopartículas, percebendo-se que a afinidade entre a água e a fase orgânica (solvente + ácido hialurônico) controla o processo de formação das partículas. Concluiu-se que quanto maior a afinidade, maior difusão da água, permitindo uma maior taxa de nanoprecipitação de partículas ^[123]. Além disso, observou-se também a importância da concentração do ácido na obtenção das nanopartículas e das taxas de fluxos de cada fase. Da mesma maneira que já observado em outros trabalhos, quanto maior a concentração do precursor, maior o

tamanho das partículas e a relação entre as fases dispersa e contínua deve ser tal, que se obtenha a menor focalização hidrodinâmica, obtendo-se assim partículas menores ^[123].

Introduzindo múltiplas entradas para fluidos, em Koh et. al ^[124] mostrou-se a possibilidade de se encapsular ou revestir fármacos em lipossomas utilizando um único sistema microfluídico. Na Figura 4-6 é indicada a geometria utilizada. A etapa de encapsulamento de fármacos também é realizada mediante a focalização hidrodinâmica. Os lipossomas produzidos nos canais anteriores são focalizados em um canal central pelo fármaco desejado, que se difunde para dentro das partículas.

Figura 4-6. Geometria para dupla focalização de fluxo. Na primeira focalização há a formação de lipossomas e na segunda a inserção de fármaco dentro do lipossoma ^[124].

4.1.4 Rifampicina

A Rifampicina é um antibiótico comumente utilizado para tratamentos de Tuberculose ^[125] e Hanseníase. Possui uma estrutura complexa conforme indicada na Figura 4-7.

Figura 4-7. Estrutura Molecular da Rifampicina

Tem natureza cristalina, tendo duas formas polimórficas, forma I (estável) e forma II (metaestável), podendo-se apresentar também na forma amorfa ^[126,127]. Na Tabela 4.1 são indicadas outras propriedades relevantes da Rifampicina obtidas na base de dados Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos, disponível na Internet ^[128].

Tabela 4.1. Propriedades da Rifampicina	
Log P (octanol-água)	4,240
Solubilidade em água	1,4 mg/mL
Fórmula molecular	C ₄₃ H ₅₈ N ₄ O ₁₂
massa molecular	822,94 g

Por conta dessa característica cristalina a Rifampicina apresenta variação na biodisponibilidade na dosagem de sua forma oral, dificultando seu emprego na produção de remédios ^[129]. A biodisponibilidade, segundo conceitos publicados pela ANVISA ^[130], indica a velocidade e a taxa de absorção de um fármaco pelos sistemas do organismo (circulatório e excretor) em uma forma de dosagem (via respiratória, oral, etc). No Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), sistema que ajuda na avaliação da biodisponibilidade de uma droga, a rifampicina pertence à classe II, referente às drogas com baixa solubilidade em meio aquosa e alta permeabilidade no intestino. A Organização Mundial de Saúde exige que as formulações que envolvem a rifampicina tenham testes de biodisponibilidade comprovados antes de ser indicada.

Diversos esforços têm sido aplicados para melhorar a biodisponibilidade da Rifampicina. Em Son et. al. ^[131], a partir da modificação da estrutura cristalina da rifampicina de *rod* para *flake shape*, melhoraram a biodisponibilidade para aplicações do fármaco na forma aerossol. A estrutura cristalina foi modificada através de um processo de hidratação, sendo ainda processada em sistema de *Spray Dryer* para redução do tamanho. O tamanho das partículas foram reduzidos de 42 µm (rifampicina crua) para 2 µm (Rifampicina hidratada e processada).

No trabalho de Dias, S. T. ^[132] realizado no LPP-IPT, os cristais de Rifampicina foram reduzidos com a técnica de *Spray Dryer*. Além da redução de tamanho, foram testados o tensoativo *Tween 80* (polysorbato) e o polímero PVP K30 e PVP 90F (PVP – polivinilpirrolidona) que aceleraram a dissolução da rifampicina em cerca de 155 vezes mais, oferecendo mais uma alternativa para melhorar as características desse fármaco.

4.1.5 Objetivos

Diante das possibilidades discutidas criou-se a perspectiva de se explorar o fenômeno da nanoprecipitação em sistemas microfluídicos. Os dispositivos foram microfabricados com procedimentos já esclarecidos no Capítulo 2, e o objetivo dessa seção foi estudar o fenômeno da nanoprecipitação para o antibiótico Rifampicina.

Nos experimentos obtiveram-se as melhores condições para a produção das nanopartículas, estudando-se a influência de alguns parâmetros na formação da nanopartícula como: a concentração do fármaco precursor (rifampicina+solvente), as taxas de fluxo e a razão entre os fluxos (água e rifampicina), o uso ou não de emulsificantes. As nanopartículas produzidas foram caracterizadas em aspectos como tamanho da partícula, morfologia, composição química, comportamento térmico e perfil de dissolução. Além da redução do tamanho, a nanoprecipitação por antissolvente, permite a modificação do perfil cristalino da partícula para uma forma amorfa, mantendo, entretanto a composição química e por isso, mantendo a eficiência do ativo. Dentro desse contexto, se justificam as técnicas de

caracterização das nanopartículas utilizadas neste trabalho e apresentadas na sequência.

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a produção de nanocristais de Rifampicina por nanoprecipitação foram utilizados os seguintes materiais:

- Rifampicina (lote 39912) produto comercial cedido pela Farmanguinhos – Fundação Oswaldo Cruz;
- Solventes:
Acetona, Álcool Isopropílico, Etanol e Metanol (J.T.Baker)
- Emulsificante Tween 20 - Polisorbato 20 - Laurato de Sorbitan Etoxilado, Sigma-Aldrich;
- Água Purificada produzida por sistema Milli-Q (Millipore Corporation, USA).
- Solução Tampão fosfato salino (PBS) $7,2 \pm 0,1$ (Laborclin).

O processo de nanoprecipitação foi obtido utilizando um sistema microfluídico com geometria do tipo focalização hidrodinâmica indicada na Figura 4-8. Os canais de entrada de fluidos possuem uma angulação de entrada de 45°. O canal central possui largura de 100µm e os canais laterais, largura de 110µm. Este sistema possui ainda um comprimento de difusão de 45 mm e uma profundidade de 81,5 µm. Essas dimensões são explicitadas no desenho.

Figura 4-8. Dispositivo microfluidico fabricado em vidro para nanoprecipitação de Rifampicina

Conforme discutido na introdução, a nanoprecipitação é controlada não somente pela geometria como também pelos fluxos dos fluidos de entrada. Esses fluxos foram controlados com duas bombas de seringa programável PHD 4400, da Harvard Apparatus, da mesma forma que nos experimentos realizados com emulsão.

Para estudar a formação dos nanocristais foi proposto um planejamento experimental fatorial 2^4 resultando em 16 experimentos mais a tréplica do ponto central ^[133], combinando as seguintes condições: vazão total do fluxo de entrada, concentração da Rifampicina, percentual de emulsificante e razão entre os fluxos de Rifampicina e Água. Nestes experimentos o Metanol foi utilizado como solvente da Rifampicina. Os resultados, tamanho da partícula em nanômetros e o índice de polidispersão, foram tratados no programa *Statistica* 9.1 e são apresentados na sessão posterior. Na Tabela 4.2 são indicadas as variáveis do experimento e a sequência dos experimentos realizados:

Tabela 4.2. Planejamento experimental 2⁴.

Fatores	-1	0	+1	
1. Vazão de Água (µL/min)	100	150	200	
2. Razão entre Fases (QÁgua/ QRifamp)	10	30	50	
3. Tensoativo -Tween20 (%)	0	0,5	1	
4. Concentração de Rifampicina (mg/mL)	10	30	50	
Fatores	1	2	3	4
Experimentos				
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0

As nanopartículas foram analisadas em suas propriedades físico-químicas, sendo avaliados aspectos como tamanho, morfologia, perfil cristalino, comportamento térmico e perfil de dissolução. As nanopartículas foram extraídas do experimento onde a concentração da rifampicina era de 50 mg/mL de metanol, o fluxo de água 200 µL/min e da rifampicina de 10 µL/min. Excetuando a medida de tamanho, todas as análises envolveram a comparação da rifampicina processada em sistema microfluídico com a rifampicina pura, cujo tamanho é de 42 µm. Sendo assim, para caracterizar os nanocristais de rifampicina foram propostas as seguintes técnicas:

1. Obtenção do tamanho do cristal por espalhamento dinâmico de luz (DLS), equipamento DelsaTM Nano C Particle Analyzer da empresa Beckman

Coulter. O equipamento realiza medidas da amostra em fase líquida (nanosuspensão) inserida em uma cubeta de quartzo;

2. Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura com Canhão de Emissão por Efeito de Campo (MEV/FEG) de alta resolução, da empresa FEI, modelo Quanta 3D. Para estas e para as análises seguintes a nanosuspensão de Rifampicina é filtrada em membrana de éster de celulose de 47 mm de diâmetro e porosidade de 0,22 μm (MF-Millipore);
3. Análise da composição química pela técnica de FT-IR, utilizando equipamento NICOLET 6700 FT-IR, Thermo Scientific. Os espectros foram obtidos na região de 500 a 5000 cm^{-1} com resolução espectral de 2 cm^{-1} , utilizando o método com pastilha de brometo de potássio. Os espectros foram analisados em programa Omnic 5.1.
4. Análise da temperatura através da técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), utilizando equipamento DSC 822^o da Metler Toledo. Os parâmetros utilizados para análise foram: taxa de aquecimento 10^oC/min, range de temperatura 25^o a 300^oC com purga de Nitrogênio (100 mL/min).
5. Análise do perfil cristalográfico utilizando um difratômetro de raios-X modelo XRD-6000, Shimadzu. Os parâmetros utilizados para análise foram radiação CuK α (ângulo de varredura variando de 5 a 50^o), a uma velocidade de 2^o por segundo e com eixo dinâmico, rotação de 60^o. A tensão de varredura é de 40 kV e corrente de 30 mA.
6. Estudo da taxa de dissolução por espectrofotometria UV, equipamento marca GBC Cintra 10 e comprimento de onda fixado para leitura em 333 nm. Inicialmente uma solução mãe de rifampicina pura, sem processamento, foi diluída em solução tamponada com pH de 7,4 na concentração de 1mg/mL e a partir dessa solução, mais 10 diluições, para o levantamento da curva de calibração, uma curva que relaciona a concentração (mg/mL) com a absorbância medida no espectrofotômetro (%). Da curva de calibração extrai-

se a equação da reta que permite a avaliação das concentrações de rifampicina das soluções obtidas no ensaio de dissolução. No levantamento da curva de calibração são avaliados a linearidade, limites de detecção do equipamento e precisão.

Para o ensaio de dissolução foram pesadas três amostras de rifampicina amorfa nanoestruturada e uma amostra de rifampicina sem processamento (fármaco puro). As quatro amostras foram pesadas com massa de $6 \pm 0,1$ mg. As amostras de rifampicina foram adicionadas em dissolutor (Incubadora 430, Nova Etica), em 100 ml solução tamponada com pH de $7,4 \pm 0,1$ (Laborclin). Foram realizadas coletas de 3 mL cada, sendo feita a reposição da solução fosfato tamponada após cada coleta. As condições de ensaio foram temperatura de 37°C , rotação de 100 rpm e intervalos de tempo de coleta foram 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 90, 120 e 180 minutos.

A partir dos resultados obtidos para o metanol, foram também realizados ensaios com outros três solventes: acetona, etanol e álcool isopropílico também na concentração de 50 mg/mL. O intuito dos ensaios era observar o efeito de diferentes solventes na formação das nanopartículas, variando-se a relação entre os fluxos de água e da solução de rifampicina. Para estes ensaios foram realizadas análises de tamanho em DLS e morfologia em MEV-FEG.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Focalização Hidrodinâmica e Tamanho das Partículas

Conforme descrito na sessão de métodos experimentais foi selecionado três índices de razão entre fluxo de água e fluxo de Rifampicina. A idéia é utilizar uma relação entre os fluxos tal que o fluxo de Rifampicina seja o mais fino possível,

garantindo reação solvente/anti-solvente seja rápida e defina cristais de tamanhos bastante diminutos. Na Figura 4-9 são mostradas as imagens obtidas para focalizações com razão igual a 10 (a) onde o tamanho da partícula foi de 337,7 nm, 30 (b) com tamanho de partícula de 219,1 nm e 50 (c) com partícula de 171,2 nm.

Figura 4-9. Focalizações de fluxo para as diferentes razões e medidas de tamanho para cada experimento: (a) com razão igual a 10, (b) 30 e (c) 50.

Na Tabela 4.3 são apresentados os resultados de tamanho e índice de polidispersão para os experimentos propostos.

Tabela 4.3. Resultados do planejamento experimental 2⁴.

Fatores	-1	0	+1
1. Vazão de Água (μL/min)	100	150	200
2. Razão entre Fases (Q _{Água} / Q _{Rifamp})	10	30	50
3. Emulsificante (%)	0	0,5	1
4. Concentração de Rifampicina (mg/mL)	10	30	50

Fatores Experimentos	1	2	3	4	Tamanho (nm)	Polidispersão
1	-1	-1	-1	-1	259,63	0,16
2	+1	-1	-1	-1	240,77	0,13
3	-1	+1	-1	-1	209,03	0,12
4	+1	+1	-1	-1	365,60	0,27
5	-1	-1	+1	-1	456,07	0,30
6	+1	-1	+1	-1	368,40	0,26
7	-1	+1	+1	-1	187,93	0,26
8	+1	+1	+1	-1	328,77	0,15
9	-1	-1	-1	+1	386,93	0,21
10	+1	-1	-1	+1	497,57	0,26
11	-1	+1	-1	+1	386,93	0,21
12	+1	+1	-1	+1	768,63	0,26
13	-1	-1	+1	+1	661,57	0,29
14	+1	-1	+1	+1	2120,40	0,28
15	-1	+1	+1	+1	204,57	0,29
16	+1	+1	+1	+1	234,87	0,30
17	0	0	0	0	216,97	0,27
18	0	0	0	0	226,87	0,18
19	0	0	0	0	206,73	0,13

Com a combinação das variáveis propostas foi possível a obtenção de nanocristais de Rifampicina em uma faixa de 187 nm a 2120 nm. Os índices de polidispersão também apresentaram valores satisfatórios, sendo estes abaixo de 0,3. Na Figura 4-10 são mostradas soluções obtidas para cada uma das três concentrações de partida utilizadas.

Figura 4-10. Nanosuspensões de Rifampicina para cada uma das três concentrações de partida utilizadas.

Utilizando o programa *Statistica 9.1* foram avaliados os efeitos dos parâmetros propostos sobre o tamanho das partículas e sobre o índice de polidispersão. Na Figura 4-11 são mostrados os Gráficos de Pareto para os ensaios realizados, sendo (a) observada a influência dos parâmetros no tamanho das partículas e em (b) a influência dos mesmos no índice de polidispersão.

(a)

(b)

Figura 4-11. Gráficos de Pareto: (a) influência dos parâmetros no tamanho das partículas e em (b) influência no índice de polidispersão.

No gráfico de Pareto apresentado em (a) obteve-se que a concentração de tensoativo foi estatisticamente relevante no tamanho final das partículas em um nível de confiança de 95%. As outras variáveis e suas relações, não apresentaram

significância dentro da faixa estudada para os parâmetros observados como vazão, relação entre vazões e concentração de Rifampicina. Em (b) pode-se observar que nenhum dos parâmetros utilizados no estudo teve influência significativa nos valores do índice de polidispersão, nem a interação entre os parâmetros, em um nível de 95% de confiança.

Na Figura 4-12 são mostrados os gráficos de superfície resposta utilizando os parâmetros relacionados anteriormente. Observa-se nos gráficos que os menores tamanhos foram obtidos para maiores valores de vazão, concentração de colóide e relação entre as vazões. A concentração de Rifampicina operou de forma inversa, quanto maior a concentração maior o tamanho das partículas obtidas.

Figura 4-12. Gráficos de Superfície Resposta.

Nas Figuras 4-13 (a) e (b) são mostrados dois histogramas, considerando-se os resultados de tamanho de partículas para a concentração de Rifampicina em Metanol de 50 mg/mL com e sem o uso de emulsificante. Nestes gráficos pode-se observar que a alteração da vazão de fluxo de água de 100 para 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ não influi no tamanho das partículas de maneira relevante. No entanto, observa-se que a variação da relação entre os fluxos de água e Rifampicina de 10 para 50 interfere muito no tamanho das partículas.

Figura 4-13. Comparação dos tamanhos obtidos para uma concentração de Rifampicina de 50 mg/mL: (a) com 1% de emulsificante e (b) sem emulsificante.

Quanto maior a relação entre os dois fluxos, menor as partículas obtidas, resultado em acordo com os resultados de artigos consultados ^[108,109]. A vazão total de água maior, apenas garante maior volume final de suspensão em um dado período de tempo. Nota-se ainda que o uso de emulsificante reduza bastante o tamanho das partículas. Variando a concentração do emulsificante de 0 a 1 % em volume de água, tem-se uma redução no tamanho das partículas de 800 nm para 250 nm aproximadamente.

4.3.2 Análise MEV – Morfologia das Nanopartículas

Na Figura 4-14 são apresentadas as imagens feitas em MEV de alta resolução (MEV/FEG) comparando a morfologia da Rifampicina crua e da Rifampicina processada nos sistemas microfluídicos. Na Figura 4-14 (a) observa-se a imagem da Rifampicina crua podendo-se notar o perfil cristalino do fármaco. Na imagem apresentada na Figura 4-14 (b) observa-se a imagem da Rifampicina processada. A imagem mostra a mudança do perfil cristalino da Rifampicina para um perfil amorfo, com forma arredondada. O formato arredondado normalmente oferece uma melhor taxa de dissolução do fármaco no organismo, fato que deve ser averiguado em testes posteriores pelo levantamento da taxa de dissolução comparativa a Rifampicina pura.

Figura 4-14. Morfologia da Rifampicina crua e da Rifampicina processada nos sistemas microfluídicos: (a) observa-se a imagem da Rifampicina crua podendo-se notar o perfil cristalino do fármaco. (b) observa-se a imagem da Rifampicina processada. A rifampicina nano foi obtida com uso de Tween 20 a (1% v/v), mantendo-se o fluxo da fase contínua em 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ e $R = 50$, gerando partículas de 250nm.

4.3.3 Análise por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

Analisando a composição do material final obtido nos microcanais, são apresentadas na Figura 4-15 as curvas obtidas em análise de FTIR para a Rifampicina crua e para a Rifampicina processada. A curva para a Rifampicina processada possui pouca alteração comparada com a curva da Rifampicina crua. Em S. Agrawal et. al. ^[126, 127] comenta-se que a Rifampicina comercial é composta de uma mistura das formas cristalinas I e II, além da forma amorfa e são apresentadas as curvas de FTIR para cada uma das formas. A forma I apresenta um pico bem definido de absorção em 3480 cm^{-1} assim como o obtido nas análises deste trabalho. Este pico foi mantido para a Rifampicina crua indicando que as características químicas do material processado em microcanais permaneceu constante, sem grandes alterações. A presença de 1 % de emulsificante Tween 20 pode ser a causa das diferenças apresentadas.

Figura 4-15. Análise de FTIR para a Rifampicina crua e para a Rifampicina processada. A rifampicina nano foi obtida com uso de Tween 20 (1% v/v), mantendo-se o fluxo da fase contínua em $200\text{ }\mu\text{L/min}$ e $R = 20$, gerando partículas de 250nm .

4.3.4 Análise de Difração de Raios-X

Na Figura 4-16 são mostrados os difratogramas da rifampicina crua e da rifampicina processada em microcanal. A rifampicina crua utilizada apresenta picos característicos nos pontos 19.50, 14.35 e 13.65. Conforme apresentado no artigo de Agrawal et. al. ^[126,127] a Rifampicina comercializada costuma ser uma mistura das formas cristalinas I e II, além de forma amorfa. Comparando-se os gráficos apresentados no trabalho referenciado, podem-se visualizar picos característicos da forma cristalina I (14.35 e 13.65) e também o pico de 19.50 obtido no trabalho de Shirely Dias ^[132] (IPT, 2008). A Rifampicina processada apresenta um difratograma sem presença de picos, mais uma característica da forma amorfa obtida após processamento em sistema microfluídico.

Figura 4-16. Difratogramas da Rifampicina crua e da Rifampicina processada em microcanal. A rifampicina nano foi obtida sem uso de Tween 20, mantendo-se o fluxo da fase contínua em 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ e $R = 20$, gerando partículas de 700nm.

4.3.5 Análise Térmica (DSC)

Na Figura 4-17 são apresentadas as curvas de DSC para a Rifampicina crua e processada. Os cristais possuem pontos de fusão e decomposição bem definidos e muitas vezes bem altos, já os materiais amorfos não possuem pontos definidos, indicando que baixas temperaturas já podem fundir todo material, facilitando a dissolução das drogas no organismo. A rifampicina crua possui um pico de decomposição bem definido em 260, 31 °C e um ponto de fusão em 190°C, resultados muito próximos aos termogramas obtidos por S. Agrawal et. al. [126,127]. Para a rifampicina processada esses picos desaparecem indicando mais uma vez que as partículas produzidas possuem perfil amorfo.

Figura 4-17. Termogramas (DSC) para a Rifampicina crua e processada. A rifampicina nano foi obtida sem uso de Tween 20, mantendo-se o fluxo da fase contínua em 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ e $R = 20$, gerando partículas de 700nm.

4.3.6 Ensaio de Dissolução

Na Figura 4-18 é mostrado o gráfico da relação entre a concentração da solução de rifampicina pura diluída em tampão com a absorbância medida no espectrofotômetro. A equação da reta extraída serviu de curva de calibração para os ensaios com a rifampicina processada.

Figura 4-18. Gráfico da Absorbância pela concentração de rifampicina em solução tampão.

Na Figura 4-19 é mostrado o gráfico da dissolução ao longo do tempo para a rifampicina processada e para a rifampicina pura. Como foram tomadas três amostras de rifampicina processada o resultado apresentado contém a média das três amostras.

Figura 4-19. Gráfico do percentual de dissolução ao longo do tempo para a rifampicina comercial e rifampicina nano obtida em sistema microfluídico. A rifampicina nano foi obtida sem uso de Tween 20, mantendo-se o fluxo da fase contínua em 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ e $R = 20$, gerando partículas de 700nm.

Observa-se que a rifampicina processada possui uma dissolução mais rápida que a rifampicina pura, evidenciando a possibilidade de aumento da biodisponibilidade in vivo. Este resultado reforça o conceito de que os dispositivos microfluídicos fornecem uma importante ferramenta para a obtenção de nanopartículas. No caso do processamento da rifampicina, obteve-se não somente nanopartículas, mas também houve a modificação do perfil cristalino do fármaco, aumentando a dissolução do mesmo em meio aquoso.

4.3.7 Ensaios com diferentes solventes – cálculo da difusão

No trabalho de J. Trevisan ^[122] foi efetuado o cálculo da difusão do etanol ao longo dos canais, no processo de obtenção de lipossomas. A proposta do cálculo é obter a distância em que o etanol termina de se difundir por completo nos

microcanais. Seguindo a mesma proposta foram efetuados os cálculos da distância em que se completa a difusão do metanol em água para o sistema microfluídico utilizado para o processamento da rifampicina. A primeira etapa deste cálculo é utilizar a Equação da Continuidade (Equação 4.3), levando-se em consideração que o escoamento é laminar e somente na direção X, a difusão dá-se somente na direção Y da geometria dos canais e a que não há reação química entre os componentes ^[134].

$$\frac{\partial C_{met}}{\partial t} + \left[V_x \frac{\partial C_{met}}{\partial x} + V_y \frac{\partial C_{met}}{\partial y} + V_z \frac{\partial C_{met}}{\partial z} \right] = D_{MA} \left[\frac{\partial^2 C_{met}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C_{met}}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C_{met}}{\partial z^2} \right] + RE$$

Equação 4.3

Sendo C_{met} a concentração do metanol, D_{MA} difusão do metanol na água, RE reação química. O desenvolvimento da Equação 1 permite-se chegar à Equação 4.4 para se calcular o comprimento X em centímetros da difusão. A concentração do metanol é colocada em função da vazão de entrada (Q_{met}) e são consideradas as velocidades do metanol e da água (ΔV) na focalização.

$$X = \frac{Q_{met}^2 * \rho^2 * \pi}{Z^2 * MM_{met}^2 * 4 * D_{MA} * \Delta V * \Delta C^2}$$

Equação 4.4.

MM_{met} é a massa molecular do metanol, ρ é a densidade do metanol e Z a profundidade do canal. Todas as etapas deste desenvolvimento matemático encontram-se na dissertação de J. Trevisan e foram disponibilizadas no Anexo I deste trabalho, juntamente com os valores de X obtidos em cada situação proposta na sequência. Na Figura 4-20 é apresentado o gráfico do comprimento de difusão X

em função da relação entre as vazões R , sendo $R = Q_{\text{água}}/Q_{\text{Rif}}$. São apresentadas 3 curvas, uma para cada valor de vazão de água utilizado (100, 150 e 200 $\mu\text{L}/\text{min}$).

Nestes cálculos iniciais considerou-se a concentração do metanol simplesmente, sem a presença da concentração da rifampicina. Nas correções realizadas, considerando-se a presença do fármaco, as diferenças do comprimento da difusão se apresentaram na 3ª casa decimal, não sendo relevantes para as conclusões observadas, que pode não ser válido para outras partículas, como foi o caso dos lipossomas, onde há grandes diferenças de viscosidade entre o etanol somente e o etanol com fosfolípideo, alterando o resultado do cálculo por conta da dificuldade oferecida na transferência de massa.

Figura 4-20. Gráfico do Comprimento da Difusão do Metanol em função da relação entre vazões R , sendo $R = Q_{\text{água}}/Q_{\text{Rif}}$.

Em alguns testes, utilizou-se a razão R igual a 10, observando-se tamanhos maiores de partículas. No gráfico pode-se observar que para este valor a difusão completa do metanol não termina dentro do microcanal ocasionando um maior crescimento das partículas de rifampicina. Outra observação importante é que quanto mais baixas as vazões melhor se dá a difusão do metanol na água. Por exemplo, para uma razão entre fluxos (R) igual a 50, X foi igual a 0,37 cm para a vazão igual a 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 0,75 cm para 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, sendo que o comprimento da

região de difusão é de 4,5 cm. Esquema representando proporcionalmente os tamanhos obtidos é apresentado na Figura 4-21 para melhor compreensão. Conforme discutido anteriormente, os tamanhos das partículas obtidas nas duas vazões não foram muito diferentes do ponto de vista estatístico, sendo possível se obter o mesmo tamanho de partícula em qualquer uma das condições de vazão. O resultado acima se mostra interessante no projeto dos próximos sistemas microfluídicos, sendo possível a produção de sistemas com regiões de difusão mais curtas.

Figura 4-21. (a) Esquema indicando a região de difusão do microreator (4,5 cm). (b) Comprimentos de difusão nas três vazões de água utilizadas com $R=50$ e (c) Sistema em funcionamento para $R=50$ e vazão de água igual a $200 \mu\text{L}/\text{min}$.

Utilizando a mesma equação, mas fixando agora os valores de R conforme utilizados no planejamento experimental (10, 30 e 50) obtivemos também os valores para X em cm mostrados na Figura 4-22. Da mesma maneira, pode-se concluir que quanto maior é o valor de R , mais rápido se dá a difusão do metanol na água proporcionando assim menores tamanhos de partículas. Para valores de vazões

mais altos, fazem-se necessários canais mais compridos, conforme já discutido anteriormente.

Figura 4-22. Gráfico do Comprimento da Difusão em função da Vazão de Metanol para diferentes R (10, 30 e 50).

Na Figura 4-23 observa-se o gráfico da relação entre o comprimento da difusão no microcanal e o fluxo de solvente para os diferentes solventes testados. Observa-se que o metanol possui comprimentos de difusão menores, ou seja, a nanoprecipitação ocorre de maneira mais veloz por conta da difusividade do metanol em água. O resultado mais lento é observado para o álcool isopropílico, com maiores comprimentos de difusão para diferentes relações entre os fluxos de água e solvente.

Figura 4-23. Gráfico do Comprimento da Difusão em função R para diferentes solventes, mantendo-se o fluxo da fase contínua em 200 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Na Figura 4-24 pode-se observar o gráfico da medida de tamanho da partícula de rifampicina obtida para diferentes valores de R com os diferentes solventes utilizados. Os melhores resultados, ou seja, com menores partículas, foram obtidos para a solução de rifampicina diluída em metanol, concordando com as estimativas obtidas nos cálculos realizados anteriormente. No caso do álcool isopropílico a estimativa não concordou com a hipótese levantada a partir dos cálculos do comprimento de difusão, e os experimentos com a acetona não foram concretizados por interferir na soldagem dos sistemas microfluídicos. A cola utilizada dissolve em acetona e percebeu-se que ao longo dos experimentos havia resíduos bloqueando os canais.

Figura 4-24. Gráfico do tamanho das partículas de rifampicina em função de R, para diferentes solventes, mantendo-se o fluxo da fase contínua em 200 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Na Figura 4-25 é mostrada uma sequência de imagens, relacionando a focalização de fluxo para os diferentes solventes e as micrografias das nanopartículas obtidas, sendo (a) para o uso do metanol, (b) do álcool isopropílico e (c) uso do etanol. Para esta análise, a relação entre os fluxos foi mantida em 50 e o fluxo de água em 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. As partículas obtidas possuem forma amorfa e no caso do uso do etanol observou-se que as partículas obtidas coalesceram, formando uma espécie de filme. Observa-se ainda que no caso do etanol, há a formação de bolhas de ar no sistema, podendo interferir na focalização do fluxo da rifampicina.

(a)

(b)

(c)

Figura 4-25. Focalização de fluxo com diferentes solventes: (a) metanol, (b) isopropílico e (c) etanol. A fase contínua foi mantida em 200 μ L/min e a relação entre fases R igual a 50.

4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

O uso dos sistemas microfluídicos com geometria do tipo focalização hidrodinâmica com ângulo de 45° se mostrou muito eficiente para a produção de nanopartículas de Rifampicina. Variáveis como taxa de fluxo total, relação entre os fluxos, concentração do fármaco precursor são características importantes para o controle dos tamanhos das nanopartículas. A rifampicina processada em sistema microfluídico, além da redução de tamanho, adquiriu perfil amorfo no processamento, garantindo uma melhor dissolução em meio aquoso. A maioria dos ensaios foi realizada com o uso da rifampicina diluída em metanol, mas outros solventes podem ser utilizados conforme foi mostrado e assim oferecer menos riscos à saúde. O uso de emulsificante não foi determinante na redução das partículas, sendo possível o uso de concentrações baixas ou mesmo o processamento na ausência dos emulsificantes, também obtendo-se nanopartículas.

Os sistemas podem ser utilizados para o processamento de outros fármacos de característica semelhante a rifampicina, que possuem baixa solubilidade e biodisponibilidade. Itens como aprimoramento das geometrias, uso de solventes menos nocivos, escalonamento do processo e melhorias nos processos de fabricação são temas que podem ser mais bem explorados. A partir desses resultados pode-se concluir que os sistemas microfluídicos se apresentam como excelente ferramenta no processamento de fármacos transformando-os em nanopartículas.

5. FOCALIZAÇÃO DE FLUXO EM 3 DIMENSÕES

5.1 ESTADO DA ARTE

No capítulo 3, a respeito da produção de Emulsões, foram apresentados os tipos de corte das gotas, sendo uma delas a de fluxo confluyente. O corte por fluxo confluyente indica uso de geometrias que promovem a focalização em 3 dimensões, onde o fluxo a ser disperso está envolvido radialmente pelo fluxo contínuo. Isso indica que o fluxo disperso não entra em contato com as paredes do substrato do dispositivo, pelo menos não no momento do corte das gotas. Os dispositivos microfabricados e testados em boa parte deste trabalho apresentam geometrias planares, dessa forma, o fluido a ser disperso sempre está em contato com uma das paredes do substrato utilizado.

Diversos exemplos de produção de emulsão por fluxo confluyente são encontrados, onde para a produção dos dispositivos microfluídicos são utilizados tubos capilares de vidro. O método de microfabricação é simples, no entanto fica limitado pelo diâmetro dos tubos capilares. Há também exemplos utilizando processos de microfabricação em polímeros, onde pela superposição de diversas camadas é possível se obter um sistema 3D para a produção de emulsão simples [135, 136]. Também são encontrados dispositivos em 3D para a produção de emulsão dupla, tal como na Figura 5-1, onde é mostrado um sistema 3D em PDMS para a produção de lipossomas a partir da produção de emulsão dupla [137].

Figura 5-1. Sistema Microfluídico com focalização em 3D para a produção de lipossomas. Adaptado de Davis et.al.¹³⁷

Os sistemas em 3D também podem ser utilizados para o processo de nanoprecipitação. Na Figura 5.1 é mostrado um exemplo de nanoprecipitação do polímero PLGA (poly(lactide-*co*-glycolide)- *b* -polyethyleneglycol) adaptado do trabalho de Ree et.al.^[138]. A produção de PLGA em sistema microfluídico 3D foi comparado com a produção das partículas em sistema 2D e batelada. Os resultados obtidos mostraram que com o sistema 3D as partículas são menores, o difusão do solvente para água é melhor e há menor agregação de partículas do que nos sistemas 2D. Nos sistemas microfluídicos 2D há maior risco de entupimento do sistema quando se utiliza maiores concentração de solução precursora para a formação das nanopartículas.

Além da adaptação nas geometrias para um sistema com focalização 3D, atualmente, tem-se introduzido eletrodos nos sistemas microfluídicos para aplicação de altas tensões, rendendo também partículas submicrométricas e nanométricas pela técnica chamada eletrospray. O eletrospray é uma técnica conhecida para a produção de aerossol.

Figura 5-2. Sistema de Focalização 3D para processo de nanoprecipitação de PLGA, adaptado de REE et. al. ^[138]

Em Kim et. al. ^[139] um sistema microfluídico microfabricado em PDMS é utilizado para produzir gotas na escala nanométrica através da aplicação de tensão elétrica. Da mesma maneira que nos sistemas já discutidos, quanto maior a razão entre o fluxo disperso e contínuo menor são as gotas produzidas. Com a aplicação da tensão, as gotas vão diminuindo de tamanho podendo chegar a gotas na nanoescala. Característica como condutividade dos fluidos, distância entre os eletrodos e tamanho dos canais são relevantes no projeto desses microssistemas. Na Figura 5-3 é mostrada a formação das gotas conforme o aumento da tensão elétrica de 0 a 2000 volts.

Figura 5-3. Geração de gotas variando tensão elétrica (0 - 2000V). ^[139]

5.1.1 Cone de Taylor na produção de nanopartículas

No trabalho de Kim et. al ^[139] o uso de alta tensão contribuiu para o confinamento do fluxo central de água, produzindo uma espécie de jato, rendendo partículas de tamanho nanométrico. Esse jato é oriundo da formação do cone de Taylor dentro da junção do sistema microfluídico. O cone de Taylor é formado a partir da focalização de um fluido, juntamente com a aplicação de altas tensões e é amplamente utilizado para produção de partículas, nanofibras, e para análises por espectrometria de massas. Possui aplicações em sistemas com agulhas, tubos capilares ou em sistemas microfluídicos ^[140, 141, 142].

O cone de Taylor é uma deformação causada na tensão superficial de uma gota que sai de um orifício ou uma constrição, por conta do campo elétrico aplicado. A deformação é simétrica, com ângulo típico de 49.3° . Dependendo do campo aplicado, o corte das gotas passa por uma simples aceleração até a formação do cone em si, onde se forma uma espécie de esguicho ou jato do fluido sob a ação do campo. O jato formado após o cone de Taylor pode gerar partículas na escala nanométrica ^[143, 144]. Na Figura 5-4 é mostrado uma simulação da formação do cone de Taylor. Inicialmente tem-se a polarização da gota do fluido, gerando uma carga elétrica superficial sobre a gota. A somatória das forças presentes em ação, tensão superficial, cisalhamento, pressão e tensão elétrica, vão gerar o afunilamento do fluxo, formando o cone de Taylor ^[145].

Figura 5-4. Sequência de formação do Cone de Taylor, extraído de ZENG, J. ^[145]

O diâmetro das gotas obtidas depende do diâmetro do jato formado após o cone de Taylor. Para a formação do cone de Taylor é importante considerar fatores como: vazão do fluido, densidade do fluido, campo elétrico aplicado e condutividade elétrica do fluido em questão. O diâmetro da agulha ou do microcanal, a distância entre os eletrodos, a concentração do fluido, bem como a tensão superficial são fatores importantes e que influem na formação do cone, e por isso no tamanho das partículas obtidas.

Nesta etapa do trabalho foi proposta a microfabricação de um sistema com focalização 3D, juntamente com eletrodos para aplicação de tensão elétrica, com o intuito de se observar o comportamento da formação das partículas, utilizando os processos de emulsão simples e também o processo de nanoprecipitação.

Nos ensaios de nanoprecipitação utilizou-se novamente o fármaco rifampicina e também a benzofenona-3, princípio ativo de protetores solares com alta toxicidade. Já para a produção de gotas, testou-se o processo de gelificação iônica do alginato de sódio. O processo de gelificação iônica é uma técnica onde uma solução polimérica com íons de baixo peso molecular, no caso o alginato de sódio, torna-se gel na presença de íons, normalmente cátions divalentes como o Ca^{2+} . A primeira fase consiste em fazer uma emulsão simples da solução polimérica cortada pelo óleo com emulsificante, e direcionar essas gotas produzidas para a solução com cloreto de cálcio para a formação do gel. Esses processos de nanoprecipitação e o de gelificação iônica são passíveis de serem testados em sistemas microfluídicos e foram escolhidos para a caracterização do sistema com geometria 3D.

5.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O processo de nanoprecipitação de rifampicina foi também testado em dispositivo microfluídico com focalização hidrodinâmica em 3-D, conforme processo de microfabricação descrito no Capítulo 2 (Figura 2-9). Nesta etapa, observou-se a influência de tensão elétrica aplicada no tamanho das partículas ao longo do

processo de nanoprecipitação. Outro exemplo de fármaco, a Benzophenona – 3, também foi utilizada neste estudo. Nesses estudos foi observada a variação do tamanho das partículas e a morfologia a partir de análise de MEV.

5.2.1 Ensaios com Rifampicina – Nanoprecipitação

Os ensaios foram realizados utilizando rifampicina diluída em metanol na concentração de 50 mg/mL. Não foi utilizado nenhum emulsificante. Foram realizados ensaios com 4 diferentes valores de fluxo de água, sendo eles: 50, 200, 500 μ L/min e 1 mL/min. A relação entre fluxos de água e rifampicina ($Q_{\text{água}}/Q_{\text{Rifampin}}$) foi mantida em 20 ao longo de todos os ensaios. Nesta etapa, uma fonte de alta tensão foi utilizada e as tensões aplicadas variaram de 0 a 5 KV.

5.2.2 Ensaios com Benzofenona-3 – Nanoprecipitação

Para os ensaios com a benzophenona-3 foram testadas 3 fluxos de água, sendo eles 500, 700 e 1000 μ L/min. A benzophenona-3 foi diluída em metanol e em isopropílico, sendo observado o tamanho das partículas conforme a variação da relação entre o fluxo de água e o fluxo de benzophenona-3. A concentração da benzophenona-3 utilizada foi de 7,5 mg/ml. Da mesma maneira que nos ensaios com a rifampicina, testou-se a influência da tensão elétrica na formação das nanopartículas, variando-se o valor da tensão entre 0 até 10 kV.

5.2.3 Ensaios com Alginato – Emulsão Simples e Gelificação Iônica

Para os ensaios de gelificação iônica foram utilizados os seguintes materiais:

- Alginato de Sódio dissolvido em água, concentração de 1,5 % em volume – fase dispersa. Condutividade Elétrica da Solução de Alginato de Sódio: 3,67 mS/cm a 22,5° C.
- Óleo Mineral com emulsificante Sorbitan Monooleate 80 (DHAYTAN S80) na concentração de 6 % em volume – fase contínua.
- Cloreto de Cálcio dissolvido em água, na concentração de 4% em volume – meio para gelificação.

O fluxo da fase contínua foi variada entre 200µL/min a 3 mL/min. A relação entre fase contínua (Q_c) e fase dispersa (Q_d), $R = Q_c/Q_d$, foi variada de 10 até 100. Neste estudo também foi testado o uso de tensão elétrica, tendo variado de 0 a 6 kV. O tamanho das partículas foi medido por microscopia óptica.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 *Ensaio com Rifampicina*

Na Figura 5-5 é mostrado o sistema microfluídico 3-D em LTCC operando para a nanoprecipitação de rifampicina (geometria mostrada na Figura 2-9). Na imagem pode-se observar que o fluxo de rifampicina sai para o tubo de saída ainda focalizado, mesmo não sendo possível acompanhar o fenômeno internamente, dentro do sistema microfluídico.

Figura 5-5. Dispositivo Microfluídico em 3-D operando para nanoprecipitação de rifampicina

Na Figura 5-6 é mostrado o gráfico do tamanho da partícula de rifampicina obtida versus a tensão aplicada, utilizando-se 4 diferentes taxas de fluxo.

Figura 5-6. Gráfico do tamanho de partícula pela variação de tensão para diferentes taxas de fluxo. No experimento foram testados 4 valores de fluxo da fase contínua (Q_c), sendo mantida a relação entre fases R igual a 20.

Para todos os fluxos utilizados, conforme o aumento da tensão aplicada obteve-se um aumento significativo no tamanho das partículas variando, por exemplo, dos 650 nm até 8 μ m. De maneira geral, conforme aumentamos o fluxo total de água, temos também um aumento no tamanho das partículas. Na Figura 5-7

são mostradas imagens de MEV da rifampicina processada em sistema microfluídico 3D.

Figura 5-7. Rifampicina processada em sistema microfluídico 3D com uso de alta tensão.

Através das imagens de MEV, observa-se que há partículas bastante pequenas, mas que estão aglomeradas. O índice de polidispersidade variou bastante, ficando sempre em valores maiores que 0.3.

5.3.2 Ensaios com Benzofenona-3

Na Figura 5-8 é mostrado o gráfico do tamanho da partícula de Benzofenona-3 dois distintos solventes, o álcool isopropílico (IPA) e o metanol (MTH). Novamente, o tamanho da partícula foi observado variando-se a razão entre os fluxos de água e benzofenona-3 ($R = Q_{\text{água}}/Q_{\text{B3}}$). Estes ensaios foram efetuados sem tensão elétrica.

Figura 5-8. Gráfico do tamanho das partículas pela variação de R, para dois distintos solventes: Isopropílico e Metanol.

Observa-se no gráfico o mesmo comportamento já esperado para o sistema, conforme o valor de R aumenta menor é o tamanho da partícula. O tamanho das partículas ficou entre 700 e 200 nm. A diferença de tamanhos entre os ensaios com isopropílico e com metanol não é significativa, portanto pode-se, em termos de tamanho de partículas de B-3, utilizar tanto um como o outro. Na Figura 5-9 é mostrada a imagem de MEV da Benzofenona-3 processada em sistema 3D.

Figura 5-9. Micrografia da Benzofenona-3 processada em sistema microfluídico utilizando um fluxo de fase contínua de 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ e uma relação entre fase R de 50.

Na Figura 5-10 observa-se o gráfico de tamanho da partícula versus tensão aplicada em kV. Da mesma maneira que no processo efetuado com a rifampicina, a benzofenona aumenta de tamanho com o aumento da tensão aplicada.

Figura 5-10. Gráfico do tamanho das partículas de Benzophenona-3 pela tensão elétrica aplicada em kV. A fase contínua (Q_c) utilizada foi de 500 e 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$, com relação entre fases R igual a 20.

5.3.3 Ensaios com Alginato de Sódio

O primeiro ensaio realizado com o alginato de sódio foi um processo semelhante à produção de emulsão simples, sem a aplicação de tensão. Na Figura 5-11 é mostrado o sistema em operação para a produção das partículas de alginato.

Figura 5-11. Sistema microfluídico 3D em operação para produção de partículas de alginato de sódio.

Na Figura 5-12 são mostradas as gotas de alginato de sódio após o processo em sistema microfluídico em (a) e em (b) após etapa de gelificação iônica. As imagens foram obtidas em microscópio óptico, com amostra gotejada em lamínula de microscopia. Em ambas as imagens pode-se observar a homogeneidade de tamanhos, cujo índice de polidispersão permaneceu em torno de 1,5%.

Figura 5-12. Partículas de Alginato observadas por microscopia ótica: (a) após processo microfluídico e (b) após etapa de gelificação.

Na Figura 5-13 é apresentada o gráfico do tamanho da partícula obtida versus a relação entre as fases para dois fluxos de água, 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 3 mL/min .

Figura 5-13. Gráfico do tamanho da partícula de alginato de sódio pela variação da relação entre as fases R. O fluxo da fase contínua foi fixado com os valores da legenda. O fluxo da fase dispersa é determinado por R.

Observa-se no gráfico, conforme esperado, a diminuição do tamanho das partículas quando o valor de R aumenta. Com valores de taxa de fluxo mais alta porém, as partículas foram menores do que as obtidas em taxa de fluxo de 300 µL/min. Para um fluxo contínuo de 3 ml/min, obteve-se partículas que variaram de 400 a 115 µm de tamanho, com polidispersidade menor que 1,5 %.

Esse comportamento pode ser explicado levando-se em consideração às dimensões do sistema microfluídico produzido. Canais mais estreitos produzem partículas condizentes com suas dimensões, e neste caso, o diâmetro do tubo Kovar utilizado está na faixa de 500 µm. Sendo assim, em taxas de fluxo mais lentas o corte da gota também fora mais lento, permitindo a formação de gotas maiores. Na situação de maior velocidade, a instabilidade causada no fluxo do alginato permitiu a formação de gotas menores. Em outro trabalho produzido no LPP-IPT ^[146] foram utilizadas taxas de fluxo de até 120 mL/min em sistema microfluídico para produção e partículas de alginato, rendendo tamanhos de 50 µm. No sistema utilizado neste trabalho não foi possível o uso desses valores de fluxo, mas otimizando-se as

dimensões do sistema, mais especificamente aumentando o diâmetro do tubo de aço inox é possível se obter partículas menores e de baixa polidispersidade.

O ensaio seguinte foi a reprodução das condições utilizadas no primeiro ensaio, ou seja, uso de duas diferentes taxas de fluxo (3 mL/min e 300 μ L/min) e variação da relação R (de 10 até 100), porém com o uso de alta tensão (3 e 6 kV). Os resultados estão expressos no gráfico da Figura 5-14, onde se relacionou o tamanho da partícula com a relação R, para as diferentes tensões elétricas.

Figura 5-14. Gráfico do Tamanho da Partícula de Alginato pela variação de R para diferentes tensões e valores de fluxo da fase contínua (Qc) fixados com os valores da legenda. O fluxo da fase dispersa é determinado por R.

Observa-se no gráfico que o tamanho das partículas aumentou com relação ao ensaio anterior, onde não se utilizou tensão elétrica. Os resultados de tamanho de partículas chegaram à escala do milímetro, com partículas em torno de 1 à 2 milímetros, extremamente grandes. Ao longo do processo, o uso de tensão permitiu que as partículas obtidas coalescessem formando partículas maiores. Esse fato explica-se pela condutividade do alginato (3,67 mS/cm), bastante alta comparada com exemplos utilizados na literatura, onde se obteve nanopartículas, mas

utilizando-se fluidos com condutividade de poucos $\mu\text{S}/\text{cm}$. Ainda assim, com velocidades maiores, o dispositivo com a focalização 3D oferece tamanhos menores, e com o aumento da relação entre as fases percebe-se uma diminuição de tamanho.

5.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

O sistema microfluídico com focalização em 3D foi projetado com o objetivo de se aperfeiçoar a produção de partículas e avaliar as consequências do uso de tensão elétrica sobre o tamanho das partículas. Os resultados mostraram que o sistema também produz nanopartículas, da mesma maneira que o sistema planar, sendo maior o fluxo dos fluidos. No sistema foi possível alcançar taxas de fluxo de 3 ml/min, taxa muito superior à obtida nos sistemas planares.

A aplicação de tensão produziu o aumento do tamanho das partículas. Observou-se inclusive o aumento da temperatura do sistema ao longo dos ensaios. O aumento do tamanho das partículas foi creditado ao valor da condutividade dos fluidos utilizados. O uso da tensão colaborou para que as partículas agregassem.

6. AUMENTO DE ESCALA DE PRODUÇÃO

6.1 ESTADO DA ARTE

6.1.1 *Sistemas Microfluídicos com Microcanais em Paralelo*

Os sistemas microfluídicos têm sido utilizados para diversas aplicações, como a produção de emulsões simples e duplas e as nanopartículas com inúmeras vantagens em itens como controle de tamanho, economia de reagentes, entre outras. Uma questão relevante, entretanto, é que esses sistemas operam com taxa de fluxos da ordem de $\mu\text{L}/\text{min}$ levando muitas vezes horas para produzir poucos mililitros de solução. Dessa maneira, se por um lado têm-se sistemas precisos com obtenção de partículas homogêneas, com baixo consumo de reagentes e processo contínuo, por outro, tem-se uma baixa produtividade. A solução desse problema tem sido buscada produzindo a amplificação do sistema, com a microfabricação de microcanais em paralelo. ^[149]

Multiplicar o número de canais em um único sistema mantendo as mesmas características de transporte obtidas em um sistema microfluídico de um único canal é uma questão crítica. Além disso, a distribuição de fluxos deve ser projetada de maneira a não exigir um maior número de entrada de fluidos, conectores e bombas para manutenção do fluxo. Algumas soluções são encontradas para distribuição dos fluxos como uso de reservatórios, uso de membranas porosas, uso de sistemas com canais em diversas camadas e uso da Lei de Murray, com canais projetados respeitando as leis de vascularização que são explicitadas na sequência.

Os primeiros projetos de sistemas de microcanais em paralelo envolviam o escalonamento de reações de troca de calor e resfriamento de soluções, transferência de massa, todos com uso de gases. No trabalho de Yue et al. ^[147] foi desenvolvido um sistema microfluídico em acrílico para observar a incorporação de

gás CO_2 na água, utilizando uma distribuição vascular. O sistema continha 16 canais e as entradas dos fluxos se deram em camadas distintas como mostrado na Figura 6-1. Observou-se, no entanto, que para algumas condições de mais alta velocidade, havia uma má distribuição dos fluidos nas entradas e a transferência de massa ficou comprometida ao longo do processo, pois havia somente água nos canais, sem a entrada do gás.

Figura 6-1. Sistema em paralelo com distribuição de fluxos por ramificação, microfabricado em acrílico, para incorporação de gás CO_2 na água. Adaptado de Yue et.al.^[147]

A cerâmica verde LTCC foi utilizada para testar um sistema de multicanais para troca de calor entre gases ^[148]. Foram projetadas a partir do COMSOL duas geometrias triangulares, uma com entrada lateral e outra com entrada central, e duas geometrias circulares, sendo que uma delas terminava com quinas e a outra, ao invés das quinas, mais dois canais. A geometria com melhor desempenho e de distribuição uniforme de fluxos foi a de formato circular como indicado na Figura 6-2. A microfabricação dos sistemas também é um ponto crítico, pois são relatadas dificuldades nos processos de corte e laminação, já que a presença de maior número de canais dificulta o processamento facilitando quebras da lâmina ou mesmo perda de um dos canais na etapa de laminação.

Figura 6-2. Sistema microfluídico com canais em paralelo para troca de calor entre gases. (a) imagem da distribuição dos campos de velocidade e imagem da microfabricação em LTCC. Extraído de Vázquez –Alvarez et. al. ^[148]

Sistemas microfluídicos para produção de partículas em maior escala já existem na literatura. No trabalho de Nisisako et. al. ^[149] uma plataforma com 128 microcanais foi microfabricada em vidro sílica sintética de 4 cm x 4 cm para produção de gotas Janus, conforme ilustrado na Figura 6-3. O dispositivo contava com 128 furos de acesso para a fase dispersa e 64 furos para fase contínua, somando 192 entradas no vidro. Para a distribuição dos fluidos foi projetado um cabeçote de aço inox, em diversas camadas, com reservatórios para os fluidos de entrada e um rebaixo onde o sistema microfluídico foi encaixado. O sistema obteve uma saída de 320 ml/h com gotas de 96 μm e variação de tamanhos de apenas 1,3%.

Figura 6-3. Sistema Microfluídico em Paralelo para Produção de Gotas Janus. (a) esquema de interconexão do sistema, (b) sistema microfluídico e (c) sistema em operação, para geração de gotas. Adaptado de Nisisako et. al. ^[149]

No trabalho de Mulligan e Rothstein ^[150] foi desenvolvido um sistema em PDMS com reservatórios para a distribuição dos fluxos da fase contínua e dispersa para a produção de emulsão. O sistema contava com seis saídas independentes e os ensaios indicaram pouca variação entre as saídas, obtendo-se gotas de 100 até 180 μm e variação de 5% entre cada saída. A frequência de produção de gotas em cada saída para o menor fluxo testado foi de 1,2 Hz, o que corresponde a 21600 gotas em uma hora somando-se a produção das seis saídas. Na Figura 6-4 é mostrado o desenho do projeto.

Figura 6-4. Sistema microfluidico com canais seis em paralelo e reservatórios para a distribuição dos fluxos de entrada. (a) desenho do sistema e (b) sistema em operação. Extraído de Mulligan e Rothstein ^[150].

Já no trabalho de Li et. al. ^[151] um sistema com quatro microcanais, indicado na Figura 6-5, foi microfabricado em PDMS por litografia macia. Neste trabalho simulações foram feitas, baseadas nas resistências hidráulicas buscando garantir as melhores condições para produção de gotas monodispersas. Neste exemplo, o desenho envolveu a distribuição dos fluxos respeitando leis de vascularização e a distribuição da fase dispersa foi realizada em uma camada extra.

Figura 6-5. Sistema Microfluídico em Paralelo para Produção de Emulsão Simples. Extraído de Li et. al. ^[151]

6.1.2 Sistemas Microfluídicos baseados na Lei de Murray

Uma das maneiras de se realizar a distribuição de fluxos é utilizando as regras do princípio de mínimo esforço, estabelecidas pela Lei de Murray. Na Figura 6-6 é indicada uma ilustração das ramificações a partir da lei de Murray. A lei de Murray surgiu a partir de estudos dos vasos sanguíneos e o processo de vascularização, onde vasos maiores se ramificam em menores distribuindo sangue no organismo ^[152,153].

Figura 6-6. Esquema de Ramificação de Canais. Extraído de Emerson et. al. ^[152].

A lei estabelece que o cubo do diâmetro do vaso maior ou vaso mãe (d_0), deve ser igual a soma dos cubos dos vasos menores ou vasos filhos (d_1 e d_2), indicada na Equação 6.1. O uso das dimensões calculadas pela lei, garante uma distribuição uniforme das velocidades e uma taxa de cisalhamento nas paredes mantida constante.

$$d_0^3 = d_1^3 + d_2^3$$

Equação 6.1

A Equação 6.1 pode ser adaptada para ramificações em mais gerações, sendo X um número chamado parâmetro de ramificação e d_n o diâmetro da n-ésima geração de canais conforme indicado na Equação 6.2.

$$d_n = \frac{d_0}{(2X)^{\frac{n}{3}}}$$

Equação 6.2

Quando o parâmetro de ramificação X é igual a 1 o sistema obedece a hipótese original da Lei de Murray, estabelecida para vasos sanguíneos, ou seja com secção transversal circular. No caso dos microcanais, as secções transversais podem ter outros perfis e ainda sim, obedecerem a Lei de mínimo esforço, adaptando-se o parâmetro de ramificação X. Observou-se ainda, que quando X é igual a 1 a tensão de cisalhamento permanece a mesma a cada geração. Quando X é igual a 0.75 a tensão de cisalhamento diminui a cada geração e quando X é maior que 1, no caso 1,25, a tensão aumenta conforme se passa para as gerações com menor largura. O mesmo ocorre para a resistência hidráulica e para a pressão, para valores de $X < 1$, a resistência e a pressão diminuem a cada geração e o inverso ocorre para $X > 1$.

A lei de Murray foi estabelecida levando-se em consideração dutos circulares onde a tensão de cisalhamento nas paredes é uniforme em todas as gerações de dutos. A lei também é válida para canais com secções transversais retangulares ou quadradas, entretanto a tensão de cisalhamento varia em torno do perímetro molhado do canal (Dh). O projeto das dimensões dos canais pode ser feito utilizando-se outra adaptação da lei de Murray indicada na Equação 6.3, utilizando-se propriedades como o número de Poiseuille, a velocidade média e o número de Reynolds.

$$\frac{V_n * Po_n}{Dh_n} = \frac{V_0 * Po_0 * X^n}{Dh_0}$$

Equação 6.3

Na Equação 6.3, V é a velocidade média, D_h o diâmetro hidráulico, X o número de gerações, Po o número de Poiseuille definido como $Po = f \cdot Re$, sendo f o fator de Fricção e Re o número de Reynolds ($Re = \frac{\mu VD}{\rho}$).

A partir dos resultados preliminares obtidos nesse trabalho para o processo de nanoprecipitação de rifampicina, realizou-se o escalonamento do sistema microfluídico de nanoprecipitação de partículas. Conforme já visto anteriormente, as geometrias FFD podem tanto ser utilizadas para produção de gotas como para os processos de nanoprecipitação. A proposta dessa etapa foi fabricar um sistema com microcanais em paralelo para a produção de nanopartículas de rifampicina, buscando as condições corretas de operação para que se mantenham as características obtidas na fase preliminar.

Apesar de já existirem exemplos da produção em maior escala de emulsões, exemplos da nanoprecipitação em paralelo ainda não foram publicados.

6.2 EXPERIMENTAL

Utilizando os processos de microfabricação descritos no Capítulo 2 foram projetadas duas distintas geometrias para o escalonamento da produção de partículas. Os dispositivos contêm 4 saídas independentes e a distribuição dos fluxos foi feita com uma geometria com reservatório e uma geometria seguindo a Lei de Murray. Os dispositivos foram microfabricados em vidro com o intuito de acompanhar o desempenho da focalização hidrodinâmica. Na Figura 6-7 é apresentada a geometria utilizando reservatório com formato circular e as dimensões são descritas na Tabela 6.1.

Figura 6-7. Sistema em paralelo com distribuição de fluxos por reservatório

Tabela 6.1 – Dimensões do sistema paralelo com distribuição por reservatório

Dimensões dos canais	
Largura 1 (entrada água)	$110 \pm 1 \text{ um}$
Largura 2 (entrada Rifampicina)	$100 \pm 1 \text{ um}$
Profundidade	$85 \pm 1 \text{ um}$
Reservatório Rifampicina (área)	$683 \pm 1 \text{ mm}^2$ (volume: 58 mm^3)
Reservatório água (área)	$723 \pm 1 \text{ mm}^2$ (volume: 61 mm^3)

Na Figura 6-8 é apresentado o esquema do sistema microfluídico em paralelo com distribuição por ramificação. O sistema foi projetado em 3 camadas, sendo (a) a base com canais para a distribuição de água e também a focalização da rifampicina; em (b) uma camada de vidro intermediária que serve de tampa e interconexão para as duas bases com canais e (c) a base com canais para a distribuição da rifampicina e também conexão final com o meio externo.

Figura 6-8. Sistema em paralelo com distribuição de fluxos por ramificação: (a) base com canais para distribuição de água e focalização; (b) camada intermediária com furos e (c) camada com canais para distribuição da rifampicina.

Para a distribuição de fluxo por ramificação, foi utilizada a equação da Lei de Murray. A proposta de testar esse tipo de configuração partiu com o intuito de se reproduzir o sistema de nanoprecipitação da rifampicina, dessa forma, tomou-se o caminho inverso para o cálculo das dimensões de cada geração. Iniciou-se o projeto, partindo da ideia de se ter canais com o mesmo tamanho dos já utilizados anteriormente de cerca de 110 e 100 μm de largura. Na Figura 6-9 é mostrado o esquema de distribuição por ramificação indicando com um número cada geração e na Tabela 6.2 são especificados os valores calculados de cada uma das gerações. Optou-se ainda pelo uso do parâmetro de distribuição X igual a 0,75, que rende menor resistência hidráulica e pressão ao processo conforme apresentado no trabalho de Emerson et. al. ^[152].

Figura 6-9. Esquema de distribuição por ramificação com 3 gerações.

Tabela 6.2. Larguras calculadas para as gerações no sistema de distribuição de fluxos.

Gerações	X	Largura (μm)
<i>Água</i>		
1	0,75	145
2	0,75	126
3	0,75	110
<i>Rifampicina</i>		
1	0,75	115
2	0,75	100

Os sistemas projetados foram testados para o processo de nanoprecipitação, utilizando Rifampicina dissolvida em Metanol, na concentração de 50 mg/mL. Da mesma maneira que nos experimentos anteriores, bombas de seringa controlaram os fluxos de água e rifampicina, tendo a focalização de fluxo observada por microscopia óptica. As nanopartículas produzidas foram observadas no quesito tamanho e índice de polidispersidade (DLS) e também morfologia, por análise de MEV-FEG. As variações de tamanho foram observadas para cada saída do sistema microfluídico a partir do controle de fluxos e das relações entre os fluxos de água e rifampicina.

O primeiro ensaio tinha como objetivo observar o tamanho das partículas de rifampicina variando-se a razão entre os fluxos de água e rifampicina (R). Foram testadas três para diferentes vazões de fluxo de água 600, 1400, 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$ para o sistema com distribuição por reservatório. Estes valores correspondem respectivamente 3, 7 e 10 vezes a vazão utilizada para o processo em sistema de

um único canal. Para o sistema com distribuição por ramificação foram testadas as taxas de fluxo de água de 500 e 800 $\mu\text{L}/\text{min}$. Não foi possível o uso de fluxos maiores para este modelo de dispositivo, com as dimensões apresentadas. No segundo ensaio, observou-se se as 4 saídas independentes de cada sistema projetado geravam partículas com o mesmo tamanho.

6.3 RESULTADOS

O sistema microfluídico com canais em paralelo e distribuição de fluxos por meio de reservatório é mostrado na Figura 6-9. Na sequência são apresentadas as primeiras imagens da produção de nanopartículas de rifampicina em sistema com canais em paralelo e distribuição de fluxos por reservatório. A razão entre as taxas de fluxo de água e rifampicina foi variada e retirada imagens da focalização obtida no dispositivo.

Figura 6-10. Sistema microfluídico com canais em paralelo e distribuição de fluxos por reservatório.

Na Figura 6-11 (a) é mostrada a focalização para R igual a 5, onde os resultados de tamanho das partículas variam mais, tendo como tamanho de

partícula 850 nm. Em (b) a maior focalização para o sistema em paralelo, com R igual a 20, rendendo partículas de 250 nm.

Figura 6-11. Focalização de Fluxo para o sistema com distribuição por reservatório: (a) para $R = 5$, rendendo partícula de 950 nm e (b) para $R = 20$ rendendo partícula de 250 nm.

Na Figura 6-12 é apresentado o sistema em paralelo com distribuição de fluxos por ramificação em operação. Os mesmo ensaios realizados para o outro sistema em paralelo foram efetuados neste sistema, buscando variar a taxa de fluxo (R) e observar o processo de focalização hidrodinâmica através de imagens de microscopia.

Figura 6-12. Sistema em Paralelo com distribuição de Fluxos por Ramificação

Na Figura 6-13 (a) é mostrada a focalização para R igual a 5, onde os resultados de tamanho das partículas variam mais, tendo como tamanho de partícula 950 nm. Em (b) a maior focalização para o sistema em paralelo, com R igual a 17,5, rendendo partículas de 350 nm.

(a)

(b)

Figura 6-13. Focalização de Fluxo para o sistema com distribuição por ramificação: (a) para $R = 5$, rendendo partícula de 950 nm e (b) para $R = 17.5$ rendendo partícula de 350 nm.

O primeiro ensaio com o sistema microfluídico em paralelo com distribuição por reservatório tinha como objetivo observar o escalonamento do sistema, testando três diferentes taxas de fluxo de água, que correspondiam à 3, 7 e 10 vezes o valor da taxa de fluxo utilizada no sistema de único canal. Na Figura 6-14 é mostrado o gráfico do tamanho das partículas pela variação da relação entre as fases de água e rifampicina para três diferentes taxas de fluxo, para o sistema com distribuição de fluxos por reservatório.

Figura 6-14. Gráfico da relação do tamanho das partículas pela variação da razão entre fluxos (R) para diferentes valores de taxa de fluxo de água aplicados no sistema em paralelo com distribuição de fluxos por reservatório.

Pelo gráfico observa-se que as partículas adquirem menor tamanho quando o sistema em paralelo operou em fluxos mais altos, como 1400 e 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$. Comparando-se com os ensaios realizados anteriormente o sistema em paralelo não permitiu um ajuste maior de R. Nos dispositivos em paralelo foi possível trabalhar com valores de R de no máximo 20, enquanto que nos sistemas de um único canal foi possível ajustar o R até 50. Dessa forma, com menor ajuste de R, as menores partículas obtidas chegaram a 300 nm, enquanto que no sistema de um único canal, partículas de 100 nm foram obtidas. Além disso, o maior fluxo permitia para o sistema foi de 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$. Fluxos maiores impediam a entrada do fluxo de rifampicina. Os próximos projetos deverão considerar de maneira mais cuidadosa a questão da perda de carga do conjunto, para resolver o problema do ajuste de R.

O mesmo ensaio foi produzido no sistema microfluídico com distribuição por ramificação, operando com taxas de fluxo de 500 e 800 $\mu\text{L}/\text{min}$. A taxa de fluxo de 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ foi o maior valor possível utilizado neste sistema, o que corresponde a 4 vezes o valor da taxa utilizada no sistema em único canal. Na Figura 6-15 é

apresentado o gráfico do tamanho das partículas obtidas nos ensaios com os fluxos descritos, variando-se o valor de R, ajustando a focalização tão fina quanto possível.

Figura 6-15. Gráfico da relação do tamanho das partículas pela variação da razão entre fluxos (R) para diferentes valores de taxa de fluxo de água aplicados no sistema em paralelo com distribuição de fluxos por ramificação.

Observa-se no gráfico o mesmo comportamento obtido anteriormente, tanto no sistema com único canal como no sistema com distribuição por reservatório, onde o tamanho da partícula diminui com o aumento de R. No caso do sistema com distribuição por ramificação, a maior taxa de fluxo possível ficou limitada em 800 $\mu\text{L}/\text{min}$, enquanto que no sistema de distribuição por reservatórios foi possível operar o sistema em 2 mL/min. O ajuste de R no sistema por ramificação ficou ainda mais comprometido, chegando no máximo a 17.5. Para valores de R maiores havia o domínio do fluxo de água, perdendo-se a focalização do fluxo de rifampicina. No sistema por ramificação o menor tamanho das partículas possível ficou em torno de 300 nm.

No segundo ensaio foi observado se as quatro saídas disponíveis no sistema geravam o mesmo tamanho de partícula. Na Figura 6-16 é mostrado o gráfico do

tamanho das partículas pela variação da relação entre fases (R) para as quatro diferentes saídas do sistema em paralelo com distribuição por reservatório. Este ensaio foi realizado considerando um fluxo de água de 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Figura 6-16. Gráfico da relação do tamanho das partículas pela variação da razão entre fluxos (R) para as 4 saídas do sistema em paralelo com distribuição de fluxos por reservatório.

Observando-se o gráfico, quando R possui um valor baixo, a diferença de tamanhos obtidos em cada saída é maior, sendo cerca de 300 nm a variação. Na situação de R baixo, o fluxo de Rifampicina é bem maior, a focalização do fluxo não é muito estreita, permitindo o crescimento das partículas. Os canais 1 e 4, que são os mais próximos as bordas apresentaram tamanhos de partículas que diferiram cerca 100 nm, já as duas saídas 2 e 3 (centrais) obtiveram diferenças muito pequenas, cerca de 40 nm em cada ensaio. Aumentando-se o R, percebeu-se que a tendência é que os tamanhos das partículas possuam uma diferença muito pequena, inferior a 100 nm. No máximo, a diferença entre os tamanhos para cada saída independente foi de cerca de 30%.

Na Figura 6-17 é apresentado o gráfico correspondente ao segundo ensaio, agora para o sistema por ramificação. Neste caso, utilizou o fluxo de 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ para observação dos tamanhos em cada saída. As saídas tiveram comportamento semelhante sendo a maior diferença apresentada para a condição de R mais baixo. No caso deste experimento, $R=5$ rendeu uma diferença entre as saídas de 22%.

Figura 6-17. Gráfico da relação do tamanho das partículas pela variação da razão entre fluxos (R) para as 4 saídas do sistema em paralelo com distribuição de fluxos por ramificação.

Analisando os resultados obtidos para ambos os sistemas, por reservatório e por ramificação, observa-se que há limitações no controle de tamanho das partículas, já que nos sistemas com um único canal foi possível obter-se partículas com cerca de 100 nm. No sistema por distribuição por ramificação houve ainda a presença de bolhas de ar, atrapalhando a focalização e rendendo partículas grandes com grande variação de tamanhos. A microfabricação do sistema em vidro, com 3 camadas, facilitou a formação das bolhas. O selamento dessas camadas pode ser melhorado para diminuir este problema, ou mesmo, modificar o substrato para o LTCC, onde o processo de encapsulamento do microssistema pode ser mais

eficiente por conta da etapa de laminação. Entretanto, mesmo com as limitações apresentadas, o escalonamento do processo de nanoprecipitação é viável e passível de ser aprimorado.

Além da análise de tamanhos, as partículas foram observadas em sua morfologia a partir de imagens de MEV-FEG para verificar se correspondiam ao mesmo perfil obtido anteriormente em sistema com um único canal. Na Figura 6-18 são mostradas as imagens analisadas.

Figura 6-18. Micrografia Eletrônica de Varredura das nanopartículas de rifampicina obtida em sistema de microcanais em paralelo com distribuição por reservatório.

Observando as imagens as partículas adquirem perfil amorfo em sistema com canais paralelo tal como obtido no sistema microfluídico com uma focalização. As imagens foram obtidas na condição de taxa de fluxo de água de 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$ e $R = 20$, rendendo partículas com cerca de 250 nm e polidispersão de 0.3. Diante dessas imagens, confirmando o comportamento obtido anteriormente, conclui-se que as outras análises como FT-IR, DSC, XRD sejam semelhantes aos já obtidos, tal como o perfil de dissolução, cujo resultado mostrava que as nanopartículas diluem mais rapidamente que as partículas de rifampicina sem processamento.

6.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Através dos estudos realizados foi concluído que a amplificação do sistema microfluídico para nanoprecipitação é viável, oferecendo o mesmo tipo de produto no final do processo, ou seja, nanopartículas do fármaco rifampicina, com baixa polidispersidade (inferior à 0.3) e perfil amorfo.

Com os sistemas produzidos houve um aumento de produção de cerca de 4 vezes para o sistema com distribuição por ramificação e 10 vezes para o sistema por reservatório, chegando a operar com uma taxa de fluxo de 2 mL/min. Pode-se fazer uma estimativa simples da eficiência de produção nessas condições, considerando-se a concentração inicial de Rifampicina de 50 mg/mL e uma relação entre fluxos (R) igual a 20, tem-se uma produção de nanopartículas de 300 mg/h no sistema com 4 canais.

Os sistemas em paralelo microfabricados apresentam limitações e deverão ser aprimorados nos próximos trabalhos. A ideia é ampliar ainda mais o número de canais no mesmo sistema, de forma que os sistemas microfluídicos se apresentem como uma alternativa viável para processos industriais.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho foram desenvolvidos sistemas microfluídicos em vidros e cerâmica LTCC para produção de micro e nanopartículas. O trabalho alcançou metas propostas do ponto de vista tecnológico e do setor de aplicações em Processos Químicos.

Do ponto de vista tecnológico este trabalho ofereceu as seguintes contribuições:

- Uso de técnicas tradicionais para produção de sistemas em vidro combinadas com recursos de baixo custo como uso de fotolitos e cola UV para a produção de sistemas microfluídicos planares e com canais em paralelo, inclusive com o uso de mais camadas de vidro.
- A apresentação dos Polímeros BCB e Parylene-C como ferramentas para o tratamento de superfície, modificando a superfície hidrofílica do vidro para hidrofóbica. O tratamento de superfície é importante para a produção de emulsões duplas e pode ser utilizado para outras aplicações.
- A produção de sistemas de focalização hidrodinâmica em 3D utilizando a cerâmica LTCC. Os sistemas contaram com a presença de eletrodos para a aplicação de tensão e os tubos de aço inox para a correta focalização de fluxos.

No setor de aplicações em Processos Químicos, o presente trabalho apresentou as seguintes contribuições:

- Estudo da produção de emulsões simples testando diferentes geometrias e alguns emulsificantes conhecidos. Observou-se a influência de parâmetros como fluxo total, relação entre fluxos contínuo e disperso, tipos de emulsificantes sobre o tamanho das partículas produzidas.
- Estudo da produção de emulsões duplas, onde foram testados os tratamentos de superfície propostos na área tecnológica.
- A produção de nanopartículas de Rifampicina utilizando-se os sistemas microfluídicos planares, os sistemas em paralelo e também o sistema de

focalização 3D. Observaram-se partículas de perfil amorfo com maior taxa de dissolução comparada a rifampicina comercial.

- Os sistemas com canais em paralelo ofereceram produtos semelhantes em cada canal do microssistema, com taxas de produção na escala de mL/min.
- Os sistemas com focalização 3D também permitiram a produção de micro e nanopartículas. O uso de tensão elétrica na produção das partículas não rendeu o esperado, mas deverá ser mais bem estudado.

TRABALHOS FUTUROS

Continuar os estudos referente a produção de emulsão dupla utilizando-se sistemas microfluídicos tratados com os polímeros BCB e Parylene-C. Inverter as regiões hidrofílicas e hidrofóbicas para geração de emulsões do tipo O/A/O.

Aprofundar os estudos dos processos de nanoprecipitação em sistemas microfluídicos utilizando programas como o COMSOL para simulação de outras geometrias possíveis para otimização dos sistemas. Fabricação de novas geometrias para o processo.

Aprimorar os sistemas em paralelo, aumentando o número de canais para melhorar a eficiência de produção das partículas. O desenvolvimento de cabeçotes de aço inox para a distribuição dos fluxos nos sistemas em paralelo.

Melhorar os sistemas de focalização em 3D introduzindo tubos de aço inox com diâmetros menores e também o uso de janelas de vidro no LTCC para acompanhar a formação do cone de Taylor.

Geração de sistemas microfluídicos para a separação ou filtração das nanopartículas, também em processo contínuo, eliminando o solvente utilizado do produto final.

PUBLICAÇÕES E PATENTES

Registro de Patente

Processo de obtenção de ativos amorfos nanoestruturados produzidos por sistemas microfluídicos em meio aquoso livre de emulsificantes e produto. Gongora-Rubio, M. R., Schianti, J. N., Cerize, N. P. N., Oliveira, A. M., Derenzo, S., Seabra, A. C., Ré, M. I. Número de Depósito: BR 10 2012 025445-0 - Outubro de 2012.

Em Revista

Production process for obtaining Rifampicin nanosuspension using glass microfluidic device. Schianti, J. N., Cerize, N. P. N., Oliveira, A. M., Derenzo, S., Seabra, A. C., Gongora-Rubio, M. R. – Artigo submetido à revista Microfluidic and Nanofluidic Journal – Outubro de 2012

3-D Microfluidic device as a tool for studying nanoprecipitation. Schianti, J. N., Cerize, N. P. N., Oliveira, A. M., Derenzo, S., Seabra, A. C., Gongora-Rubio, M. R. – Artigo submetido à revista Journal of Physics: Conferences Series – Novembro de 2012.

Em Congresso

Emulsion production using glass microfluidic devices. Schianti, J. N., Cerize, N. P. N., Oliveira, A. M., Góngora-Rubio, M. R. IBERSENSOR – Lisboa - 2010

Glass flow focusing microfluidic device for nanolipids production. Schianti, J. N.; Trevisan, J. E.; Gongora-Rubio, M. R.; Seabra, A.C., Torre, L. G. IBERSENSOR – Lisboa - 2010

Development of a Microfluidic pH control system using LTCC technology integrated with an ISFET sensor. Schianti, J. N.; Igarashi, M. O.; Gongora-Rubio, M. R.; Seabra, A. C.; Jorquera, C. J. IBERSENSOR – Lisboa - 2010

Rifampicin nanosuspension production using microfluidic device. Schianti, J. N., Cerize, N. P. N., Oliveira, A. M., Derenzo, S., Góngora-Rubio, M. R. NANOTECH – Boston- 2011.

Fab in a Package: LTCC Microfluidic Devices for Micro and Nanoparticle Fabrication. Gongora-Rubio, M. R., Freitas, K. H. G., Schianti, J. N., Oliveira, A. M., Cerize, N.P.N., Zanin, M. H. A. CIMCT – Alemanha – 2012.

3-D Microfluidic Device as a Tool for Nanostructuring of Particles of Hydrophobic Materials. Schianti, J. N. , Cerize, N. P. N., Oliveira, A. M. , Derenzo, S., Góngora-Rubio, M. R. South American Symposium on Microencapsulation – Limeira – Maio 2012.

Escalonamento de sistemas microfluídicos para intensificação de processo de Nanoprecipitação. Schianti, J. N. , Cerize, N. P. N., Oliveira, A. M. , Derenzo, S., Góngora-Rubio, M. R. – Workshop Microfluídica – Campinas - Julho 2012

3-D LTCC Microfluidic device as a tool for studying nanoprecipitation. Schianti, J. N., Cerize, N. P. N., Oliveira, A. M. , Derenzo, S., Góngora-Rubio, M. R. IBERSENSOR – Porto Rico – Outubro 2012.

Anexo I – Desenvolvimento da Equação da Continuidade

No trabalho de Trevisan J. há o desenvolvimento da Equação da Continuidade para o processo de formação de lipossomas. Nos sistemas microfluidicos utilizados considera-se que ocorre escoamento somente no eixo x e a difusão ocorre somente no eixo y. Além disso, nos processos realizados não há a presença de reação química ou variação da concentração ao longo do tempo, simplificando a equação 1 na equação 2. Lembrando que C_{met} é a concentração de metanol e DMA a difusividade do Metanol na água.

$$\frac{\partial C_{met}}{\partial t} + \left[V_x \frac{\partial C_{met}}{\partial x} + V_y \frac{\partial C_{met}}{\partial y} + V_z \frac{\partial C_{met}}{\partial z} \right] = D_{MA} \left[\frac{\partial^2 C_{met}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C_{met}}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C_{met}}{\partial z^2} \right] + RE$$

Equação 1

$$V_x * \frac{\partial C_{met}}{\partial x} = DMA * \frac{\partial^2 C_{met}}{\partial y^2}$$

Equação 2

Considerando o modelo de penetração de Higbie (1935) o coeficiente de transferência de massa é dado pela Equação 3, onde o tempo (t) é determinado pela variação de velocidade (ΔV) na distância x. A massa total de metanol transferida, pode ainda ser escrita em termos da vazão de metanol (Q_{met}) multiplicada pela densidade do metanol (ρ), resultando na Equação 4. Lembrando ainda que M_{me} é a massa molar do metanol e z a profundidade do microcanal.

$$NE = \sqrt[2]{\frac{4 * DMA}{\pi * t}} * (C_{met0} - C_{met\infty})$$

Equação 3

$$\frac{Q_{met} * \rho}{x * z * M_{me}} = \sqrt{\frac{4 * DMA * \Delta V}{\pi * x}} * (C_{met0} - C_{met\infty})$$

Equação 4

Por fim, explicitando X teremos a equação 5 que define em que distância termina a completa difusão do metanol na água dentro dos canais microfluidicos.

$$X = \frac{Q_{met}^2 * \rho^2 * \pi}{Z^2 * M_{met}^2 * 4 * DMA * \Delta V * \Delta C^2}$$

Equação 5

Os valores da variação da velocidade ΔV e da variação da concentração ΔC são colocados em função das vazões de alimentação de água e metanol, sendo :

$$\Delta V = \frac{Q_{água} - Q_{metanol}}{Area\ do\ canal}$$

e a variação de concentração :

$$\Delta C = \left(\frac{\rho_{met}}{M_{met}} - \frac{\rho_{água}}{M_{água}} * \left(\frac{\frac{\rho}{M_{met}} * Q_{met}}{\frac{\rho}{M_{met}} * Q_{met} + \frac{2 * \rho * Q_{água}}{M_{água}}} \right) \right)$$

No caso deste trabalho, a mistura da Rifampicina com o metanol não produz mudança de viscosidade, não havendo necessidade da correção dos valores na equação da variação da concentração molar.

Dados utilizados:

	<i>Densidade</i> <i>g/cm³</i>	<i>Massa Molar</i> <i>g/mol</i>	<i>Difusividade</i> <i>cm²/s</i>
<i>Metanol</i>	0,79	32,04	1,65E-5
<i>Acetona</i>	0,79	58,08	1,14E-5
<i>Álcool Isopropílico</i>	0,789	60,18	1,03E-5
<i>Etanol</i>	0,789	46,06	1,22E-5
<i>Água</i>	1		

Segue na Tabela 1 os valores calculados da distância X em função da razão de fluxo R, sendo $R = Q_{\text{Água}}/Q_{\text{Rif}}$ para os três valores de vazão de água utilizados (100, 150 e 200 $\mu\text{L}/\text{min}$).

Tabela 1. Valores da distância X em função da razão de Fluxo R.

R $Q_{\text{Água}}/Q_{\text{Rif}}$	X₁ (cm) 100 $\mu\text{L}/\text{min}$	X₂ (cm) 150 $\mu\text{L}/\text{min}$	X₃ (cm) 200 $\mu\text{L}/\text{min}$
10	11,05931	16,58898	22,11864
11	8,96616	13,44925	17,93233
12	7,41511	11,12267	14,83022
13	6,23404	9,35106	12,46808
14	5,31405	7,97108	10,6281
15	4,58354	6,87531	9,16708
16	3,99386	5,99079	7,98772
17	3,51101	5,26652	7,02203
18	3,11068	4,66603	6,22137
19	2,77509	4,16264	5,55018
20	2,49121	3,7365	4,98205
21	2,24839	3,37258	4,49677
22	2,03955	3,05933	4,07911
23	1,85852	2,78777	3,71703
24	1,70055	2,55082	3,40110
25	1,56189	2,34284	3,12379
26	1,43953	2,15929	2,87905
27	1,33099	1,99649	2,66199
28	1,23428	1,85143	2,46857
29	1,14774	1,72162	2,29549
30	1,07665	1,60499	2,13999
31	0,99989	1,49983	1,99977
32	0,93645	1,40467	1,87289
33	0,87886	1,31829	1,75772
34	0,82642	1,23963	1,65284
35	0,77854	1,16781	1,55709
36	0,73471	1,10206	1,46941
37	0,69447	1,0417	1,38894
38	0,65745	0,98618	1,31490
39	0,62331	0,93497	1,24663
40	0,59177	0,88765	1,18354
41	0,56256	0,84384	1,12511

42	0,53546	0,80319	1,07091
43	0,51027	0,7654	1,02054
44	0,48682	0,73023	0,97364
45	0,46495	0,69742	0,92989
46	0,44452	0,66677	0,88903
47	0,42541	0,63811	0,85081
48	0,40751	0,61125	0,81499
49	0,39070	0,58605	0,78140
50	0,37492	0,56238	0,74983

Na Tabela 2, seguem os resultados calculados da distância X em função da Vazão de Rifmapicina/Metanol (Q_{Rif}) para os três valores de razão de fluxos considerados nos experimentos (10, 20 e 30).

Qmet uL/min	X₁ (cm) R=50	X₂ (cm) R=30	X₃ (cm) R=10
1	0,18746	0,321	1,10593
2	0,37492	0,642	2,21186
3	0,56238	0,963	3,3178
4	0,74983	1,28399	4,42373
5	0,93729	1,60499	5,52966
6	1,12475	1,92599	6,63559
7	1,31221	2,24699	7,74152
8	1,49967	2,56799	8,84746
9	1,68713	2,88899	9,95339
10	1,87459	3,20999	11,05932
20	3,74917	6,41997	22,11864

Anexo II – Especificações dos Materiais Utilizados na Microfabricação

- **Laminas de Microscopia – Knittel Gläser** (<http://www.knittelglass.com/>)

Coeficiente de Expansão Térmica: $\alpha = 9 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$

Annealing Point: $T \sim 557^\circ \text{C}$

Softening Point: $T \sim 726^\circ \text{C}$

Composição Típica (% por peso)	
SiO ₂	72 - 73
Al ₂ O ₃	0,5 - 0,7
Fe ₂ O ₃	0,10 - 0,13
CaO + MgO	12,7 - 13,1
Na ₂ O + K ₂ O	13,2 - 13,6

- **LTCC – 951 Green Tape™ – Empresa DuPont** (www.dupont.com)

LTCC 951	
Espessura s/sinterização (μm)	165 ± 11 (951P2/951A2) 114 ± 8 (951PT/951AT)
Encolhimento x,y (%)	12.3 ± 0.3
Encolhimento z (%)	15 ± 0.5
Constante Dielétrica	7.8 a 3 GHz

- **BCB, 3022-46 – Empresa Dow Corning** (www.dowcorning.com/cyclotene)

B-staged Bisbenzocyclobutene – CYCLOTENE 3000 Advanced Electronic Resins

BCB, produto 3022-46	
Solvente	Mesitylene
Viscosidade (cSt @ 25°)	52
Range de espessuras (μm)	2,4 – 5,8
Tg (°C)	> 350°
Constante Dielétrica	2,65-2,50 a 1-20GHz

- **Parylene-C – Empresa Specialty Coatings Systems**

(<http://scscoatings.com/>)

Parylene-C - Poly-para-xylylene	
Densidade (g/cm³)	1,298
Índice de Refração	1,639
Tg (°C)	290
Constante Dielétrica	3,15 a 1-20GHz

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- 1 WHITESIDES, G. M. **The origins and future of microfluidic.** Nature, Vol. 447, n. 27, 2006, 368-373.
 - 2 NGUYEN, N. T., WERELEY, S. T., **Fluid Mechanics Theory.** Fundamentals and Applications of Microfluidics. Boston. Artech House. 2002, 11-65.
 - 3 MADOU, M. J. **Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization.** CRC PRESS. Washington, USA. 2002. 2ª edição.
 - 4 SKURTYS, O. e AGUILERA, J. M. **Applications of Microfluidic Devices in Food Engineering.** Food Biophysics. 3, 2008, 1–15.
 - 5 ABGRALL, P. e GUE, A. M. **Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem - A review.** J. Micromech. Microeng., n.17, 2007, R15–R49.
 - 6 TAM, M. e LEE, A. **Micro/Nanodroplets in Microfluidic Devices.** Springer Handbook of Nanotechnology. Part B, 2007, 571-590.
 - 7 ENGL, W., BACKOV, R., PANIZZA, P. **Controlled production of emulsions and particles by milli and microfluidic techniques.** Current Opinion in Colloid & Interface Science, n. 13, 2008, 206–216.
 - 8 KOBAYASHI, I. NAKAJIMA, M. **Generation and Multiphase Flow of Emulsions in Microchannels.** Advanced Micro and Nanosystems. Vol. 5., 2006, Micro Process Engineering. WILEY-VCH Verla GmbH.
 - 9 ZHAO, C. X., MIDDELBERG, A. P. J. **Two-phase microfluidic flows.** Chemical Engineering Science, n. 66, 2011, 1394–1411.

-
- 10 WANG, J. T., WANG, J., e HAN, J. J. **Recent Fabrication of Advanced Particles and Particle-Based Materials Assisted by Droplet-Based Microfluidics.** *Small*, 7, No. 13, 2011, 1728–1754.
- 11 SHUI, L., EIJKEL, J.C.T., BERG, A. V. D. **Multiphase flow in microfluidic systems – Control and applications of droplets and interfaces.** *Advances in Colloid and Interface Science*, 133, 2007, 35–49.
- 12 GUNTHER, A. e JENSEN, K. F. **Multiphase microfluidics: from flow characteristics to chemical and materials synthesis.** *Lab Chip*, 6, 2006, 1487–1503.
- 13 ZHAO, C. X., HE, L., QIAO, S., MIDDELBERG, A. P. J. **Nanoparticle synthesis in microreactors.** *Chemical Engineering Science*, 66, 2011, 1463–1479.
- 14 AHN, C. H., CHOI, J. W. **Microfluidics and Their Applications to Lab-on-a-Chip.** *Springer Handbook of Nanotechnology*. 2006, 523-545.
- 15 JANASEK, D., FRANZKE, J., MANZ, A. **Scaling and the design of miniaturized chemical analyses systems.** *Nature*, v. 447, n. 27, 2006, 374-380.
- 16 TERRY, S. C., HERMANN, J.H. and ANGEL, J. B. **A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer.** *IEEE Trans. Electron Devices*, 26, 1979, 1880-1886.
- 17 ILIESCU, C., TAY, E.H.F., XU, G., YU, L. M., SAMPER, V. **A dielectrophoretic chip packaged at wafer level.** *Microsystem Technologies*. Vol. 12, n. 11-12, 2006, 987-992.
- 18 BECKER, H., LOCASCIO, L.E. **Polymer microfluidic device.** *Talanta*, v. 56, n.2, 2002, 267-287.
- 19 GONGORA-RUBIO, M.R., ESPINOZA-VALLEJOS, P., SOLA-LAGUNA, L., SANTIAGO-AVILE, J.J. **Overview of low temperature co-fired ceramics tape technology for meso-system technology (MsST).** *Sensors and Actuators A: Physical*, 89, 2001, 222-241.

-
- 20 GIRIDHAR, M. S., SEONG, K., SCHULZGEN, A., KHULBE, P., PEYGHAMBARIAM, N., MANSURIPUR, M. **Femtosecond pulsed laser micromachining of glass substrates with application to microfluidic devices.** APPLIED OPTICS, Vol. 43, No. 23, 2004, 4584-4589.
- 21 SUGIOKA, K., CHENG, Y., MIDORIKAWA, K. **Three-dimensional micromachining of glass using femtosecond laser for lab-on-a-chip device manufacture.** Appl. Phys. A, 81, 2005, 1–10.
- 22 SZÉKELY, L., GUTTMAN, A. **New advances in microchip fabrication for electrochromatography.** Electrophoresis, 26, 2005, 4590–4604.
- 23 ILIESCU, C., TAY, F.E.H., MIAO, J. **Strategies in deep wet etching of Pyrex glass.** Sensors and Actuators A: Physical , 133, 2007, 395–400.
- 24 ILIESCU, C., CHEN, B., MIAO, J. **On the wet etching of Pyrex glass.** Sensors and Actuators A: Physical , Vol. 143, 2008, 154-161.
- 25 BU, M., MELVIN, T., ENSELL, G. J., WILKINSON, J. S., EVANS, A. G. **A new masking technology for deep glass etching and its microfluidic application.** Sensors and Actuators A: Physical, 115, 2004, 476– 482.
- 26 ILIESCU, C., TAY, F.E.H., MIAO, J. **Characterization of masking layers for deep wet etching of glass in an improved HF/HCl solution.** Surface and Coatings Technology, Vol. 198, Issues 1-3, 2005, 314-318.
- 27 CHIKI, T., SUGIYAMA, Y., UJIIE, T., HORIIKE, Y., **Deep dry etching of borosilicate glass using fluorine-based high density plasmas for microelectromechanical system fabrication.** Journal of Vacuum Science and Technology B, Vol. 21, n.5, 2003, 2188-2192.
- 28 ÁLVAREZ-CASTANHO, M., AYUSO, D. F. P., GRANDA, M. G., FERNÁNDEZ-ABEDUL, M. T., GARCIA, J. R., COSTA-GARCÍA, A. **Critical points in the fabrication of microfluidic devices on glass substrates.** Sensors and Actuators B: Chemical, 130, 2008, 436–448.
- 29 SUNI, T. **Direct wafer bonding for MEMS and Microeletronics.** Tese (Doutorado), 2006. 94 p. Helsinky University of Technology, Espoo, Finland, 2006.

-
- 30 BERTHOLD, A., NICOLA, L., SARRO, P.M., VELLEKOOP, M.J. **Glass-to-Glass anodic bonding with standard IC technology thin films as intermediate layers.** Sensors and Actuators A: Physical, Vol. A82, n. 1-3, 2000, 224-228.
- 31 SOUZA, S. G. **Estudo da Viabilidade Técnica da Utilização de Microcanais para a Concentração de Produtos Químicos.** Tese (Doutorado), 2002.154.p. Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- 32 HOWLADER, M. M. R., SUEHARA, S., TAKAGI, H., KIM, T. H., MAEDA, R. and SUGA, T. **Room-Temperature Microfluidics Packaging Using Sequential Plasma Activation Process.** IEEE Transactions on Advanced Packaging, Vol. 29, n.3, 2006.
- 33 CHEN, L., LUO, G., LIU, K., MA, J., YAO, B., YAN, Y., WANG, Y. **Bonding of glass-based microfluidic chips at low- or room-temperature in routine laboratory.** Sensors and Actuators B: Chemical, 119, 2006, 335–344.
- 34 BILENBERG, B. NIELSEN, T., CLAUSEN, B., KRISTENSEN, A. **PMMA to SU -8 bonding for polymer based lab-on-a-chip systems with integrated optics.** Journal of Micromechanics and Microengineering. Vol. 14, , 2004, 814-818.
- 35 CHEN, Y. T., e LEE, D. **A bonding technique using hydrophilic SU-8.** J. Micromech. Microeng., 17, 2007, 1978–1984.
- 36 ZHOU, X., VIRASAWMY, S., QUAN, C. **Wafer-level BCB bonding using a thermal press for microfluidics.** Microsyst. Technol., 15, 2009, 573–580.
- 37 POENAR, D. P., ILIESCU, C., CARP, M., PANG, A. J., LECK, K. J. **Glass-based microfluidic device fabricated by parylene wafer-to-wafer bonding for impedance spectroscopy.** Sensors and Actuators A: Physical, 139, 2007, 162–171.
- 38 SCHLAUTMANN, S., BESSELINK, G. A. J., PRABHU, R. G., SCHASFOORT, R.B.M., **Fabrication of a microfluidic chip by UV bonding at room temperature for integration of temperature-sensitive layers.** J. Micromech. Microeng., 13, 2003, S81–S84.

-
- 39 PSALTIS, D., QUAKE, S.R., YANG, C. **Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics.** Nature. Vol. 442, n.27, 2006, 394-402.
- 40 YAMAMOTO, T., NOJIMA, T., and FUJII, T. **PDMS-glass hybrid microreactor array with embedded temperature control device. Application to cell-free protein synthesis.** Lab Chip, vol. 2, 2002, pp. 197–202.
- 41 SHAW, K. J., DOCKER, P. T., YELLAND, J. V., DYER, C. E., GREENMAN, J., GREENWAY, G. M., and HASWELL, S. **Rapid PCR amplification using a microfluidic device with integrated microwave heating and air impingement cooling.** Lab Chip, 10, 2010, 1725–1728.
- 42 VULTO, P., HUESGEN, T., ALBRECHT, B. and URBAN, G. A. **A full-wafer fabrication process for glass microfluidic chips with integrated electroplated electrodes by direct bonding of dry film resist.** J. Micromech. Microeng., 19, 2009, 077001 (5pp).
- 43 MARRE, S., ADAMO, A., BASAK, S., AYMONIER, C., and JENSEN, K. F. **Design and Packaging of Microreactors for High Pressure and High Temperature Applications.** Ind. Eng. Chem. Res. 49, 2010, 11310–11320.
- 44 MURPHY, E. R., INOUE, T., SAHOO, H. R., ZABORENKO, N. and JENSEN, K. F. **Solder-based chip-to-tube and chip-to-chip packaging for microfluidic devices.** Lab Chip, 2007, 7, 1309–1314.
- 45 SCHIANTI, J. N. **Sistemas de microcanais em vidro para aplicações em Microfluídica.** Dissertação (Mestrado) 2008. Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 121p, 2008.
- 46 BECHTOLD, F. A **Comprehensive Overview on Today's Ceramic Substrate Technologies.** European Microelectronics and Packaging Conference, EMPC 2009, 1-12.
- 47 L.J. GOLONKA. **Technology and applications of Low Temperature Cofired Ceramic (LTCC) based sensors and microsystems.** Bulletin of the Polish Academy of Sciences Technical Sciences. Vol. 54, n. 2, 2006.

48 GONGORA-RUBIO, M. R., ESPINOZA-VALLEJOS, P., SOLA-LAGUNA, L. and SANTIAGO-AVILES, J. J. **Overview of Low Temperature Co-Fired Ceramics Tape Technology for Meso-System Technology.** Sensors & Actuators A: Physical; v. 89, 2001, pp. 222 - 241.

49 IBANEZ-GARCIA, N., MERCADER, M. B., ROCHA, Z. M., SEABRA, C. A., GONGORA-RUBIO, M. R. and CHAMARRO, J. A. **Continuous Flow Analytical Microsystems Based on Low-Temperature Co-Fired Ceramic Technology. Integrated Potentiometric Detection Based on Solvent Polymeric Ion-Selective Electrodes.** Anal. Chem. 2006, 78, 2985-2992.

50 BEMBNOWICZ, P., GOLONKA, L.J. **Integration of transparent glass window with LTCC technology for μ TAS application.** Journal of the European Ceramic Society, v. 30, n. 3, 2010, 743-749.

51 GOLONKA, L.J., ROGUSZCZAK, H., ZAWADA, T., RADOJEWSKI, J., GRABOWSKA, I., CHUDY, M., DYBKO, A., BRZOZKA, Z., STADNIK, D. **LTCC based microfluidic system with optical detection.** Sensors and Actuators B: Chemical, 111–112, 2005, 396–402.

52 CUNHA, M. R., VÁSQUEZ-ALVAREZ, E., GONGORA-RUBIO, M.R. **Utilização de um Laser de CO₂ de Baixo Custo para Microusinagem de Cerâmicas Verdes LTCC.** IBERSENSOR 2008, Revista Eletrônica IBERSENSOR, Vol. 6, n. 3, 2008, IB08-134.

53 RIBEIRO-COSTA, R. M. CUNHA, M. R., GONGORA-RUBIO, M.R., MICHAULUART-JUNIOR, P., RÉ, M. T., **Preparation of protein-loaded-PLGA microspheres by na emulsion/solvent evaporation process employing LTCC micromixers.** Powder Technology, 190, 2009, 107-111.

54 VÁSQUEZ-ALVAREZ, E., DEGASPERI, F. T., MORITA, L. G., GONGORA-RUBIO, M.R and GIUDICI, R. **Development of a micro-heat exchanger with stacked plates using LTCC technology.** Vol. 27, n. 03, 2010, pp. 483 - 497.

55 TABELING, PATRICK. **Introduction to Microfluidics.** Oxford University Press Inc., New York, 2005.

-
- 56 BERDICHEVSKY, Y., KHANDURINA, J., GUTTMAN, A., LO, Y.H. **UV/ozone modification of poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels.** Sensors and Actuators B, n. 97, 2004, 402–408.
- 57 BARKER, S.L.R., ROSS, D., TARLOV, M.J., GAITAN, M., LOCASCIO, L.E. **Control of flow direction in microfluidic devices with polyelectrolyte multilayers.** Anal. Chem. n.72, 2000, 5925–5929.
- 58 BAUER, W. A., FISCHLECHNER, M. ABELL, C. HUCK, W. T. S. **Hydrophilic PDMS microchannels for high-throughput formation of oil-in-water microdroplets and water-in-oil-in-water double emulsions.** Lab Chip, 10, 2010, 1814–1819.
- 59 WONG, I., HO, C. M. **Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices.** Microfluidic and Nanofluidics, v.7, n.3, 2009, 291-306.
- 60 SO, Y.H., GARROU, P., IM, J.H., SHECK, D.M., **Benzocyclobutene-based polymers for microelectronics.** Chemical Innovation. Vol. 31, N. 12, 2001, 40-47.
- 61 LEE, K., HE, J., CLEMENT, R., MASSIA, S., KIM, B. **Biocompatible benzocyclobutene (BCB)-based neural implants with micro-fluidic channel.** Biosensors and Bioelectronics, 20, 2004, 404–407.
- 62 LEE, K., MASSIA, S., HE, J. **Biocompatible benzocyclobutene-based intracortical neural implant with surface modification.** J. Micromech. Microeng., 15, 2005, 2149–2155.
- 63 TURMEZEI, P. POLYAKOV, A., MOLLINGER, J. R., BARTEK, M., BOSSCHE, A., BURGHARTZ, J.N., **Low-Cost Microfilter for Red Blood Cell Membrane Stiffness Measurement Using Photosensitive BCB.** TRANSDUCERS '03. The 12th International Conference on Solid State Sensors, Actuators and Microsystems, Boston, June 8-12, 2003.
- 64 TAN, C. P., CRAIGHEAD, H. G. **Surface Engineering and Patterning Using Parylene for Biological Applications.** Materials, 3, 2010, 1803-1832.

65 ATSUTA, K., SUZUKI, H., TAKEUCHI, S. **A parylene lift-off process with microfluidic channels for selective protein patterning.** J. Micromech. Microeng., 17, (2007, 496–500.

66 NOH, H. S., HUANG, Y., HESKETH, P. **Parylene micromolding, a rapid and low-cost fabrication method for parylene microchannel.** Sensors and Actuators B, 102, 2004, 78–85.

67 CITFLIK, A. T., GIJS, M. A. M. **A low-temperature parylene-to-silicon dioxide bonding technique for high-pressure microfluidics.** J. Micromech. Microeng., 21, 2011, 035011 (12pp).

68 Propriedades da lâmina de microscopia Knittel: http://www.knittel-glaeser.de/index_e.htm acessado em abril 2009

69 ALVARENGA, E. D., SALIBA, W. A., MILAGRES, B. G. **Construction of a low-cost ultraviolet-viewing cabinet with lamp.** Química Nova, Vol. 28, No. 5, 2005, 927-928.

70 PAN, Y. J., YANG, R. J. **A glass microfluidic chip adhesive bonding method at room temperature.** J. Micromech. Microeng., 16, 2006, 2666–2672.

71 KOBAYASHI, I., MUKATAKA, S., and NAKAJIMA, M. **Novel asymmetric through-hole array microfabricated on a silicon plate for formulating monodisperse emulsions.** Langmuir, 21, 2005, 7629-7632.

72 KOBAYASHI, I., NAKAJIMA, M., CHUN, K., KIKUCHI, Y., and FUJITA, H. **Silicon array of elongated through-holes for monodisperse emulsion droplets.** AIChE J., 48, 2002, 1639-1644.

73 GONGORA-RUBIO, M.R., CUNHA, M. R., COSTA, A. P. O., COSTA, R. M. R., RÉ, M. I. **Microfluidic devices for micro & nanoparticle fabrication using LTCC technology.** SHF – Microfluidics 2006 - Toulouse, 2006, 12-14.

74 NISISAKO, T. **Microstructured Devices for Preparing Controlled Multiple Emulsions.** Chem. Eng. Technol., 31, n. 8, 2008, 1091–1098.

75 NEVES, M.A. and RIBEIRO, H.S., KOBAYASHI, I. and NAKAJIMA, M. **Encapsulation of Lipophilic Bioactive Molecules by Microchannel Emulsification.** Food Biophysics, 3, 2008, 126–131.

76 CUNHA, M. R. da. **Desenvolvimento de misturadores microfluídicos para fabricação de micro-esferas poliméricas.** Dissertação (Mestrado), 2006, 179 p. Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

77 CHRISTOPHER, G.F. and ANNA, S.L. **Microfluidic methods for generating continuous droplet streams.** J. Phys. D: Appl. Phys. 40, 2007, R319–R336.

78 LAO, K.L. and LEE, G.B. **Monodisperse double emulsions generated by microfluidic chips utilizing flow focusing and pneumatic chopping devices.** TRANSDUCERS & EUROSensors 07. The 14th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, Lyon, France, June 10-14, 2007.

79 UTADA, A. S., CHU, L.Y., FERNANDEZ-NIEVES, A., LINK, D. R. , HOLTZE, C. and WEITZ, D. A., **Dripping, Jetting, Drops, and Wetting: The Magic of Microfluidics.** MRS Bulletin, 32, 2007, 702-708.

80 UTADA, A. S., FERNANDEZ-NIEVES, A., STONE, H. A., WEITZ, D. A. **Dripping to Jetting Transitions in Coflowing Liquid Streams.** Phys. Rev. Lett., Vol. 99, n. 9, 2007, 4pp.

81 SHAHA, R. K., SHUMA, H. C., ROWATA, A. C., LEE, D., AGRESTIA, J. J., UTADA, A. S., CHUA, L. Y., KIMA, J. W., FERNANDEZ-NIEVES, A., MARTINEZA, C. J. and WEITZA, D. A. **Designer emulsions using microfluidics.** Materials Today. Vol. 11, n. 4, 2008, 18-27.

82 SHUI, L., EIJKEL, J.C.T., BERG, A.V.D. **Multiphase flow in microfluidic systems – Control and applications of droplets and interfaces.** Advances in Colloid and Interface Science, 133, 2007, 35–49.

83 ABATE, A.R., THIELE, J., WEINHART, M., and WEITZ, D. A. **Patterning microfluidic device wettability using flow confinement.** Lab Chip, 10, 2010, 1774-1776.

84 OKUSHIMA, S., NISISAKO, T., TORII, T., and HIGUCHI, T. **Controlled Production of Monodisperse Double Emulsions by Two-Step Droplet Breakup in Microfluidic Devices.** *Langmuir*, 20, 2004, 9905-9908.

85 ANNA, S. L. and MAYER, H. C. **Microscale tipstreaming in a microfluidic flow focusing device.** *PHYSICS OF FLUIDS*, 18, 2006, 1-13.

86 XU, J. H., LI, S.W., TAN, J., LUO, G. S. **Correlations of droplet formation in T-junction microfluidic devices: from squeezig to dripping.** *Microfluid Nanofluidics*, n. 5:, 2008, 711-717.

87 XU, J. H., LI, S.W., TAN, J., WANG, Y. J., LUO, G. S. **Preparation of Highly Monodisperse Droplet in a T-Junction Microfluidic Device.** *AIChE Journal*, Vol. 52, n. 9, 2006.

88 ABATE, A. R., THIELE, J. and WEITZ, D. A. **One-step formation of multiple emulsions in microfluidics.** *Lab Chip*, 11, 2011, 253–258.

89 BARET, J.C. **Surfactants in droplet-based microfluidics.** *Lab Chip*, 12, 2012, 422-433.

90 LYSSANT, K. **Emulsions and Emulsions Technology.** Surfactant Science Series. Volume 6, New York, 1974, Capítulos 1, 2 e 13.

91 Manual: **The HLB SYSTEM a time-saving guide to emulsifier selection.** ICI Americas Inc. Wilmington, Delaware, 1989.

92 STONE, H. A., STROOCK, A. D., and AJDARI, A. **Engineering Flows in Small Devices : Microfluidics Toward a Lab-on-a-Chip.** *Annual Review of Fluid Mechanics*, Vol. 36, 2004, 381- 411.

93 Ehsan Yakhshi Tafti, Kevin Law, Ranganathan Kumar, Hyoung J. Cho. **Effect of Surfactants on Droplet Formation in Microchannels.** *Proceedings of ECTC 2008, 2008 ASME Early Career Technical Conference*, October 3-4, 2008, Miami, Florida, USA.

-
- 94 BARET, J. C., KLEINSCHMIDT, F., HARRAK, A. and GRIFFITHS, A.D. **Kinetic Aspects of Emulsion Stabilization by Surfactants: A Microfluidic Analysis.** *Langmuir*, v. 25, n. 11, 2009, 6088–6093.
- 95 SGRO, A. E., ALLEN, P. B., and CHIU, D.T. **Thermoelectric Manipulation of Aqueous Droplets in Microfluidic Devices.** *Anal Chem.*, Vol. 79, n. 13, 2007, 4845–4851.
- 96 YANG, C. H., HUANG, K. S., LIN, P. W., LIN, Y. C. **Using a cross-flow microfluidic chip and external crosslinking reaction for monodisperse TPP-chitosan microparticles.** *Sensors and Actuators B: Chemical*, 124, 2007, 510–516.
- 97 BERTHIER, J., VOT, S. L., TIQUET, P., DAVIDA, N., LAURO, D., BENHAMOU, P.Y., RIVERA, F. **Highly viscous fluids in pressure actuated flow focusing devices.** *Sensors and Actuators A: Physical*, 158, 2010, 140–148.
- 98 ZHENG, B., ROACH, S. L., and ISMAGILOV, R. F. **Screening of Protein Crystallization Conditions on a Microfluidic Chip Using Nanoliter-Size Droplets.** *J. AM. CHEM. SOC.*, 125, 2003, 11170–11171.
- 99 SONG, H., CHEN, D. L., and ISMAGILOV, R. F. **Reactions in Droplets in Microfluidic Channels.** *Angew Chem Int Ed Engl.* Vol. 13; n. 45, 2006, 7336–7356.
- 100 SEO, M., PAQUET, C., NIE, Z., XUA, S. and KUMACHEVA, E. **Microfluidic consecutive flow-focusing droplet generators.** *Soft Matter*, 2007, 3, 986–992.
- 101 NÝVLT, J., HOSTOMSKÝ, J., GIULIETTI, M. **Cristalização.** EdUSFCAR/IPT, São Carlos (2001). 160 p.
- 102 UUSI-PENTILÄ, S. M. **Optimization of Batch Antisolvent Crystallization.** Tese (Doutorado) Michigan State University. Michigan USA (1997) 123p.
- 103 Portal Laboratórios Virtuais de Processos Químicos – Universidade de Coimbra: http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=42&Itemid=159 acessado em 19/09/2010.

-
- 104 JUNGHANNS, J. U. A. H., MULLER, R. H. **Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications.** International Journal of Nanomedicine. Vol. 3, n. 3, 2008, 295–309.
- 105 KAWABATA, Y.; WADA, K.; NAKATANI, M.; YAMADA, Y.; ONOUEA, S. **Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications.** International Journal of Pharmaceutics, 420, 2011, 1– 10.
- 106 PEPPAS, N. A.; CARR, D. A. **Impact of absorption and transport on intelligent therapeutics and nanoscale delivery of protein therapeutic agents.** Chemical Engineering Science, 64, 2009, 4553- 4565.
- 107 LI, D. **Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics.** 2008 Springer Science Business Media, LLC. (1462-1470).
- 108 MARRE, S. and JENSEN, K. F. **Synthesis of micro and nanostructures in microfluidic systems.** Chem. Soc. Rev., 39, 2010, 1183–1202.
- 109 ZHAO, H., WANG, J. X., WANG, Q. A., CHEN, J. F., YUN, J. **Controlled Liquid Antisolvent Precipitation of Hydrophobic Pharmaceutical Nanoparticles in a Microchannel Reactor.** Ind. Eng. Chem. Res. 46, 2007, 8229-8235.
- 110 ALI, H.S.M., YORK, P., BLAGDENA, N. **Preparation of hydrocortisone nanosuspension through a bottom-up nanoprecipitation technique using microfluidic reactors.** International Journal of Pharmaceutics, 2009, 375, 107–113.
- 111 ALI, H.S.M., YORK, P., ALI, A.M.A., BLAGDEN, N. **Hydrocortisone nanosuspensions for ophthalmic delivery: A comparative study between microfluidic nanoprecipitation and wet milling.** Journal of Controlled Release, 2011, 149, 175–181.
- 112 WANGA, J. X., ZHANGA, Q. X., ZHOUB, Y., SHAOB, L., CHENB, J. F. **Microfluidic synthesis of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles with size-dependent and enhanced dissolution rate.** Chemical Engineering Journal, 2010, 162, 844–851.

113 ZHANG, Q. X., XU, L. M., ZHOU, Y., WANG, J.X., and CHEN, J. **Preparation of Drug Nanoparticles Using a T-Junction Microchannel System.** Industrial & Engineering Chemistry Research. V. 50, n.3, 2011, 13805 -13812.

114 ZHANG, H. X., WANG, J. X., SHAO, L. and CHEN, J. F. **Microfluidic Fabrication of Monodispersed Pharmaceutical Colloidal Spheres of Atorvastatin Calcium with Tunable Sizes.** Industrial & Engineering Chemistry Research, 2010, 49, 4156–4161.

115 KOCKMANN, N., KASTNER, J., WOIAS, P. **Reactive particle precipitation in liquid microchannel flow.** Chemical Engineering Journal, 135S, 2008, S110–S116.

116 KARNIK, R., GU, F., BASTO, P., CANNIZZARO, C., DEAN, L., KYEI-MANU, W., LANGER, R., and FAROKHZAD, O. C. **Microfluidic Platform for Controlled Synthesis of Polymeric Nanoparticles.** Nano Letters., Vol. 8, No. 9, 2008.

117 LO, C. T., JAHN, A., LOCASCIO, L. E., VREELAND, W. N. **Controlled Self-Assembly of Monodisperse Niosomes by Microfluidic Hydrodynamic Focusing.** Langmuir, VOL. 26, n. 11, 2010, 8559–8566.

118 VREELAND, W. N. and LOCASCIO, L. **Using Bioinspired Thermally Triggered Liposomes for High-Efficiency Mixing and Reagent Delivery in Microfluidic Devices.** Anal. Chem., 75, 2003, 6906-6911.

119 ZHANGA, S., YUNA, J., SHEN, S., CHENA, Z., YAOA, K., CHEN, J., CHEN, B. **Formation of solid lipid nanoparticles in a microchannel system with a cross-shaped junction.** Chemical Engineering Science, 63, 2008, 5600 – 5605.

120 ZHANGA, S. H., SHEN, S. C., CHEN, Z., YUN, J. X., YAO, K., CHEN, B., CHEN, J. **Preparation of solid lipid nanoparticles in co-flowing microchannels.** Chemical Engineering Journal, 144, 2008, 324–328.

121 JAHN, A., STAVIS, S. M., HONG, J. S., VREELAND, W. N., DEVOE, D. L., and GAITAN, M. **Microfluidic Mixing and the Formation of Nanoscale Lipid Vesicles.** ACSNano, Vol. 4, n. 4, 2010, 2077–2087.

122 TREVISAN, J. E. **Comparação entre os processamentos “Top-Down” e “Bottom-up” para a produção de lipossomas funcionais aplicados à vacinação**

gênica contra a Tuberculose. 2010. 157p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

123 BICUDO, R. C. S. **Nanopartículas de ácido hialurônico produzidas por nanoprecipitação e reticulação química: Processos e Caracterização.** 2011 172p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

124 KOH, C. G., ZHANG, X., LIU, S., GOLAN, S., YU, B., YANG, X., GUAN, J., JIN, Y., TALMON, Y., MUTHUSAMY, N., CHAN, K. K., BYRD, J. C., LEE, R. J., MARCUCCI, G., LEE, L. J. **Delivery of antisense oligodeoxynucleotide lipopolyplex nanoparticles assembled by microfluidic hydrodynamic focusing.** Journal of Controlled Release, 141, 2010, 62–69.

125 ALVES, R. **Estudo termoanalítico e de compatibilidade fármaco excipiente de rifampicina e alguns medicamentos utilizados na terapêutica da Tuberculose.** 2007 113 páginas Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

126 AGRAWAL, S., SINGH, I., KAUR, K. J., BHADRE, S. R., KAUL, C. L., PANCHAGNULA, R. **Comparative bioavailability of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide from a four drug fixed dose combination with separate formulations at the same dose levels.** International Journal of Pharmaceutics, Vol.276, Issues 1-2, 2004, 41-49.

127 AGRAWAL, S., ASHOKRAJ, Y., BHARATAM, P. V., PILLAI, O., PANCHAGNULA, R. **Solid-state characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance.** European Journal of Pharmaceutical Sciences, 22, 2004, 127–144.

128 Biblioteca Nacional de Medicamentos CHEMID Advanced <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/> - consulta em 08/06/2011.

129 FREIRE, F. D., ARAGAO, C. F. S., MOURA, T. F. A. L., RAFFIN, F. N. **Thermal studies of isoniazid and mixtures with rifampicin.** J Therm. Anal. Calorim., 97, 2009, 333–336.

130 Site da ANVISA <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/conceito.htm#2.8> – consulta em 07/06/2011.

131 SON, Y. J., MCCONVILLE, J.T. **A new respirable form of rifampicin.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. Vol. 78, Issue 3, 2011, 366-376.

132 DIAS, S.T. **Estudo da técnica de recobrimento de cristais de rifampicina com excipientes hidrofílicos visando aumento da velocidade de dissolução.** 2009 128p. Dissertação (mestrado) 2009. Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo, São Paulo, 2009.

133 NETO, B. B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos.** 4ª Edição – 2010.

134 Bird, R. **Fenômenos de Transporte.** Editora LTC. 2004.

135 ABATE, A.R., SEIFFERT, S., UTADA, A. S., SHUM, A., SHAH, R., THIELE, J., DUNCANSON, W. J., ABBASPOURAD, A., LEE, M. H., AKARTUNA, I., LEE, D., ROTEM, A., WEITZ, D.A. **Microfluidic techniques for synthesizing particles.** Book Chapter Preprint.

136 JEONG, W. C., LIM, J. M., CHOI, J. H., KIM, J. H., LEE, Y. J. L., KIM, S. H., LEE, G., KIM, J. D., YI, G. R., YANG, S. M. **Controlled generation of submicron emulsion droplets via highly stable tip-streaming mode in microfluidic devices.** Lab Chip, 2012, 12, 1446–1453.

137 DAVIES, R. T., KIM, D. and PARK, J. **Formation of liposomes using a 3D flow focusing microfluidic device with spatially patterned wettability by corona discharge.** J. Micromech. Microeng., 22, 2012, 055003 (8pp).

138 RHEE, M., VALENCIA, P. M., RODRIGUEZ, M. I., LANGER, R., FAROKHZAD, O. C. and KARNIL, R. **Synthesis of Size-Tunable Polymeric Nanoparticles Enabled by 3D Hydrodynamic Flow Focusing in Single-Layer Microchannels.** *Adv. Mater*, 23, 2011,H79–H83.

139 KIM, H., LUO, D., LINK, D., WEITZ, D. A., MARQUEZ, M., CHENG, Z. **Controlled production of emulsion drops using an electric field in a flow focusing microfluidic device.** Applied Physics Letters, 91, 2007, 133106.

-
- 140 KOSTER, S. e VERPOORTE, E. **A decade of microfluidic analysis coupled with electrospray mass spectrometry: An overview.** Lab Chip, 2007, 7, 1394–1412.
- 141 LOPEZ-HERRERA, J.M., BARRERO, A., LOPEZ, A., LOSCERTALES, I.G., MARQUEZ, M. **Coaxial jets generated from electrified Taylor cones. Scaling laws.** Aerosol Science, 34, 2003, 535–552.
- 142 JAWOREK, A., SOBCZYK, A.T. **Electrospraying route to nanotechnology: An overview.** Journal of Electrostatics, 66, 2008, 197–219.
- 143 RHODES, C. R. **Microfluidic Flow Focusing Device for Eletrospinning of Hollow Polymer Nanofibers.** (2006) 53p. Massachusetts Institute of Technology. . Faculdade de Engenharia Mecânica.
- 144 CHAKRABORTY, S., LIAO, I., ADLER, A., LEONG, K.W. **Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems.** Advanced Drug Delivery Reviews 61, 2009, 1043–1054.
- 145 ZENG, J. **Non-Linear Electrohydrodynamics in Microfluidic Devices.** International Journal of Molecular Sciences, v.12, n.3, 2011, 1633-1649.
- 146 ALVIM, I. D. ; CUNHA, M. R. ; RE, M. I. ; GONGORA-RUBIO M. R. **Microfluidic chip technology applied on production of microparticles by ionic gelation for food application.** In: IFT Annual Meeting & Food Expo, 2011, New Orleans. IFT Annual Meeting & Food Expo 2011. Chicago, 2011. v. 1. p. 1-1
- 147 YUE, J.; BOICHOT, R.; LUO, L.; GONTHIER, Y.; CHEN, G.; YUAN, Q. **Flow Distribution and Mass Transfer in a Parallel Microchannel Contactor Integrated with Constructal Distributors.** AIChE Journal, 2010, Vol. 56, No. 2, 298-317.
- 148 VASQUEZ-ALVAREZ, E.; DEGASPERI, F. T.; MORITA, L. G.; GONGORA-RUBIO, M. R. and GIUDUCI, R. **Development of a micro-heat exchanger with stacked plates using LTCC Technology.** Brazilian Journal of Chemical Engineering., Vol. 27, No. 03, 2010, pp. 483 – 497.
- 149 NISISAKO, T. and TORII, T. **Microfluidic large-scale integration on a chip for mass production of monodisperse droplets and particles.** Lab Chip, 8, 2008, 287–293.

150 MULLIGAN, M.K. E ROTHSTEIN, J. **Scale-up and control of droplet production in coupled microfluidic flow-focusing geometries.** Microfluidics and Nanofluidics. V. 13, n. 1, 2012, 65-73.

151 LI, W., YOUNG, E. W. K., SEO, M., NIE, Z., GARSTECKI, P., SIMMONS, C. A. and KUMACHEVA, E. **Simultaneous generation of droplets with different dimensions in parallel integrated microfluidic droplet generators.** Soft Matter, 4, 2008, 258–262.

152 EMERSON, D. R.; CIESLICKI, K.; GUA, X.; BARBER, R. W. **Biomimetic design of microfluidic manifolds based on a generalized Murray's law.** Lab Chip, 6, 2006, 447– 454.

153 WU, W., HANSEN, C. J., ARAGON, A. M., GEUBELLE, P. H., SCOTT, R., LEWIS, W. J. A. **Direct-write assembly of biomimetic microvascular networks for efficient fluid transport.** Soft Matter, 2010, 6, 739–742.