

Instituto politécnico de Bragança



Escoamento de células sanguíneas em redes microcapilares

Mestrado em Engenharia Química

Realizado por: Luís Manuel Estevinho Pimparel nº 15698

Orientado por: Professor Ricardo Dias

Professor Vasco Cadavez

Professor José A. Silva

Bragança 6 de Novembro de 2012

Agradecimentos

Agradeço ao professor Ricardo Dias da Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança pela sua orientação.

Agradeço ao professor Vasco Cadavez da Escola Superior da Agrária do Instituto Politécnico de Bragança pela sua orientação.

Agradeço ao professor José A. Silva da Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança pela sua orientação.

Agradeço ao professor Rui Lima da Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança pela sua colaboração no âmbito dos microcanais.

Agradeço também o apoio da FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia), QREN e COMPETE no âmbito dos projetos PTDC/SAU-BEB/108728/2008, PTDC/SAU-BEB/105650/2008, PTDC/SAU-ENB/116929/2010.

Agradeço à Doutora Maria João do Laboratório de Processos Químicos da Escola Superior de tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança pelo apoio oferecido quando necessitei da sua ajuda.

A todos os meus amigos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste projeto. Obrigado pela compreensão, paciência e companheirismo demonstrado ao longo da realização deste projeto.

Agradeço aos meus pais, por me terem possibilitado frequentar a licenciatura e mestrado de Engenharia Química e todo o esforço que fizeram para me apoiar e orientar da melhor maneira possível.

Agradeço ao meu irmão e a minha namorada pela força e apoio anímico que me deram durante todo este tempo.

E por último, agradeço ao departamento de engenharia química e todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que este projeto se realizasse.

Resumo

Este trabalho teve como intuito o estudo das velocidades de migração de glóbulos vermelhos (GV's) na rede de canais formados por empacotamentos de esferas de vidro. Para tal procedeu-se ao empacotamento de várias colunas cromatográficas com esferas de vidro de diferentes diâmetros.

Foram feitos cinco empacotamentos nos quais os diâmetros médios das esferas eram 115, 150, 337.5, 875 e 2000 μ m. Para cada coluna empacotada fez-se passar no seu interior uma suspensão de GV's de origem bovina em soro fisiológico (SF), do qual se retirou o tempo de residência dos GV's para caudais que variaram entre 0,25 mL/min a 3 mL/min. Repetiu-se este procedimento para uma solução em SF de sacarose com concentração de 1 g/l, também para os mesmos caudais, de forma a permitir o cálculo da razão entre o tempo de residência dos GV's e o tempo de residência da sacarose (RRT). Os valores de RRT foram menores que um na esmagadora maioria dos casos, revelando que as suspensões de GV's em SF se moviam no interior das colunas mais rapidamente que a sacarose dissolvida em SF.

Os valores obtidos para os RRT's - inferiores a 0.9 em alguns casos - sugerem que alguns dos empacotamentos desenvolvidos podem ser utilizados para separar GV's de moléculas dissolvidas no sangue (como enzimas), com dimensões da ordem de grandeza da sacarose, dado que os GV's se movem mais rapidamente no interior das colunas empacotadas do que moléculas dissolvidas de menor dimensão que os GV's. Determinou-se por microscopia que o diâmetro dos GV's de origem bovina rondava os 8,2 μ m, valor que se encontra na gama referida na literatura.

De forma a tentar compreender o fluxo sanguíneo no interior das colunas cromatográficas produziram-se alguns microcanais em polidimetilsiloxano com características aproximadas às colunas empacotadas. Foi possível observar a formação de camadas livres de células em diferentes regiões dos microcanais e zonas de estagnação. O primeiro fenómeno conduz a um aumento da velocidade de migração dos GV's enquanto o segundo conduz à retardação dos GV's.

Outros fenómenos que podem retardar ou aumentar a velocidade dos GV's, relativamente à sacarose, são a captura momentânea dos GV's pelas esferas de vidro em regiões estreitas do empacotamento, próximas dos pontos de contacto entre esferas de vidro, e a exclusão do centro de massa dos GV's de regiões de baixa velocidade, junto à parede dos poros dos empacotamentos, fenómeno conhecido na literatura por cromatografia hidrodinâmica.

Palavras-chave: Cromatografia Hidrodinâmica, Glóbulos vermelhos, microcapilares sintéticos, empacotamento.

Abstract

In this work it were studied the migration velocities of red blood cells (GVs) in the network of channels present in packings of glass spheres. In order to do so, different chromatographic columns in packed with glass spheres of different sizes.

It were performed five packings containing glass spheres of average diameter 115, 150, 337.5, 875 e 2000 μm . It were injected bovine GV's samples, suspended in physiological saline (SF), in each column and the retention time – for flow rates that varied between 0,25 mL/min and 3 mL/min, was calculated. The same experiments were performed for solutions of sucrose in SF and the ratio between the retention time of the GV's and sucrose (RRT) was estimated. The RRT results were almost all lower than one, these results revealing that the GV's velocities were higher than the sucrose velocities.

The RRT results – inferior to 0.9 in some experiments – suggested that some of the developed packings can be used in order to separate the GV's from molecules dissolved in blood plasma (enzymes for instance) since the GV's migrate faster through the packed columns than – comparatively - small molecules. Using a microscope, the average diameter of the bovine GV's was calculated and it was close to 8.2 μm , this value being in the range referred in the literature.

The RRT results – inferior to 0.9 in some experiments – suggested that some of the developed packings can be used in order to separate the GV's from molecules dissolved in blood plasma (enzymes for instance) since the GV's migrate faster through the packed columns than – comparatively - small molecules.

In order to understand the GV's flow in the chromatographic columns it were built transparent microchannels, prepared using polydimethylsiloxane, possessing characteristics similar to the developed packings of spheres. Using a microscope and a high speed camera, it was possible to observe the development of cell-free layers at different regions of the microchannels and zones of stagnation. The first effect leads to the increase of the GV's velocities while the second one has an opposite influence in the GV's velocities.

Other phenomena may retard or speed up the GV's. The narrow regions close to the contact points between the glass spheres may shortly capture the GV's during their flow while the exclusion of the GV's mass center from low velocity regions, close the wall of the pores present in the packings, increase the GV's velocities. The latter effect is known by hydrodynamic chromatography.

Keywords : Hydrodynamic Chromatography, red blood cells (GV's), synthetic microcapillaires

Índice

1- Objetivos	10
2- Introdução	11
3 Aspectos Anatômicos e Fisiológicos	12
3.1 Sistema circulatório	12
3.2 Sangue	14
3.2.1 Glóbulos Vermelhos (GV's)	14
3.2.2 Glóbulos brancos	16
3.2.3 Plaquetas	18
3.3 Microcirculação	19
3.4 Camada livre de células.....	21
4- Materiais e métodos	22
4.1- Centrifugação	22
4.3 Determinação da dimensão das células sanguíneas.....	24
4.4 Cromatografia Hidrodinâmica	26
4.4.1 – Porosidade	29
4.5 Microcapilares	30
4.5.1 Criação de microcanais sintéticos	30
4.5.2 Manipulação de amostras de glóbulos vermelhos para o escoamento em microcanais.....	34
4.5.3 Análise do escoamento de GV's nos microcanais produzidos.....	35
5 Apresentação e discussão de resultados.....	36
5.1 Dimensão dos diferentes glóbulos vermelhos	36
5.2 Escoamento dos glóbulos vermelhos nas colunas cromatográficas	39

5.2.1 Dados de empacotamento de 0,1115 com sacarose e sangue de vaca.....	40
5.2.2 Empacotamento de 0,15 com sacarose e sangue de vaca.	41
5.2.3 Empacotamento de 0,3375mm com sacarose e sangue de vaca.	42
5.2.4 Empacotamento de 0,875mm com sacarose e sangue de vaca.	43
5.2.5 Empacotamento de 2,00 mm com sacarose e sangue de vaca.	44
5.2.6 Discussão dos resultados obtidos com as colunas cromatográficas	45
5.3 Microcanais.....	50
5.5 Camada livre de células.....	52
6- Experiências futuras.....	59
7- Conclusão	60
8- Bibliografia	61
9- Webografia	62
10 Anexos	63
10.1 Diâmetros médios GV 's de bovinos	63
10.2 Cálculo da porosidade	64

Índice de figuras

Figura 1 - Diagrama das duas circulações	12
Figura 2 - Vasos Sanguíneos.....	13
Figura 3 - Constituintes Sanguíneos.....	14
Figura 4 - Glóbulos Vermelhos	15
Figura 5- Amostras de sangue de vaca.....	15
Figura 6 Glóbulo Branco	17
Figura 7 – Leucócitos	17
Figura 8 - Plaquetas.....	18
Figura 9 – Microcapilares.....	20
Figura 10 - Camada livre de células	21
Figura 11 - Centrifugadora	22
Figura 12 - Encaixe para tubos de ensaios	23
Figura 13 - Obtenção do tubo centrifugado	23
Figura 14 - Esquema do equipamento experimental de aquisição de imagem.....	24
Figura 15 - Esquema do equipamento experimental.....	25
Figura 16 - Grelha de referência ampliada	25
Figura 17 - Esquema do equipamento experimental.....	26
Figura 18 - Fotografia da instalação experimental.....	26
Figura 19 - Sequência de uma injeção num empacotamento de 2mm num tubo de 50 cm.....	28
Figura 20 - Fotografia coluna com os dados relevantes.....	29
Figura 21- mascaras dos moldes de microcanais a desenvolver	30
Figura 22 - Impressora de corte	31
Figura 23 - A placa com a mascara na mesa de UV.....	32
Figura 24 - Momento da revelação.....	32
Figura 25 - A placa pronta para ser usada	33
Figura 26 - Microcanais obtidos: Círculos com diâmetro 300 μm ; 600 μm e com diâmetro 800 μm	33
Figura 27 - Os capilares na centrifugadora.....	34

Figura 28 - Medidor de hematócrito	35
Figura 29 - Microscópio ligado a um sistema com bomba de seringa	35
Figura 30 - Fotografia de GV's tirados ao microscópio	36
Figura 31 - Fotografia de um GV ampliado através do microscópio	37
Figura 32 - Fotografia de vários GV's para a contagem.....	37
Figura 33 - Gráfico da distribuição dos GV's de bovino	38
Figura 34 - Cromatogramas para empacotamento 0,1115mm, vários caudais e a curva RRT em função do caudal.	40
Figura 35 - Cromatogramas para empacotamento 0,15mm, vários caudais e a curva RRT em função dos caudais.	41
Figura 36 - Cromatogramas para empacotamento 0,3375mm, vários caudais e a curva RRT em função do caudal.	42
Figura 37 - Cromatogramas para empacotamento 0,875mm, vários caudais e a curva RRT em função do caudal.	43
Figura 38 - Experiência do empacotamento de 2mm com $Q=1$ ml/min, concentração de 1% de GV's de bovino	44
Figura 39 - Experiência do empacotamento de 2mm com $Q=2$ ml/min, concentração de 1% de GV's de bovino	44
Figura 40- Gráfico do comportamento de RRT	46
Figura 41 - Sistema de microscopia/camara de alta velocidade alojado a bomba de seringa ...	50
Figura 42 - Microcanal com diâmetro de 300 μm	50
Figura 43 - Microcanal com diâmetro de 600 μm	51
Figura 44 - Microcanal com diâmetro de 800 μm	51
Figura 45 - Referência no microcanal com cilindros de 600 μm de diâmetro.....	52
Figura 46 - Os pontos de pesquisa no microcanal de 600 μm	52
Figura 47 - Referência no microcanal de 800 μm	55
Figura 48 - Partes do estudo do microcanal de 800 μm	55
Figura 49 - Comparação da camada livre de células no primeiro círculo.....	58
Figura 50 - Comparação de zonas de estagnação num ponto do meio	58

Índice de tabelas

Tabela 1- Tamanho de células do sangue do corpo humano	16
Tabela 2 - Tamanho de células das espécies em estudo	16
Tabela 3 - Tamanho de Glóbulos Brancos dos animais em estudo entre outros em (μm)	18
Tabela 4 - Parâmetro da microcirculação no músculo sartório dum gato para vários vasos.....	20
Tabela 5 - Diâmetros dos GV's determinados experimentalmente e comparados	36
Tabela 6 - Intervalo de diâmetros dos Glóbulos Vermelhos.....	37
Tabela 7 - Diâmetro efetivo para o empacotamento de 0,115mm	47
Tabela 8 - Diâmetro efetivo para o empacotamento de 0,15mm	47
Tabela 9 - Diâmetro efetivo para o empacotamento de 0,3375mm.....	48
Tabela 10- Diâmetro efetivo para empacotamento de 0,875 mm	48
Tabela 11 - Diâmetro efetivo para empacotamento de 2 mm.....	48
Tabela 12 - Espessura da camada livre de células para um caudal de 5 $\mu\text{m}/\mu\text{l}$	53
Tabela 13 - Espessura da camada livre de células para um caudal de 10 $\mu\text{m}/\mu\text{l}$	54
Tabela 14 - Espessura da camada livre de células para um caudal de 20 $\mu\text{m}/\mu\text{l}$	54
Tabela 15- Espessura da camada livre de células para um caudal de 5 $\mu\text{m}/\mu\text{l}$ para 800 μm	56
Tabela 16 - Espessura da camada livre de células para um caudal de 10 $\mu\text{m}/\mu\text{l}$ para 800 μm	57
Tabela 17 - Espessura da camada livre de células para um caudal de 20 $\mu\text{m}/\mu\text{l}$ para 800 μm	57

1- Objetivos

1.1- Objetivo geral:

Estudar o escoamento de células sanguíneas em redes microcapilares e microcanais.

1.2- Objetivos Específicos:

Averiguar as diferentes velocidades migratórias dos GV's em diferentes empacotamentos;

Estudar a influência da concentração nos resultados da migração das células;

Estudar a influência do caudal nos valores do tempo de retenção relativo (RRT);

Estudar o comportamento dos GV's em microcanais e formação da camada livre de células.

2- Introdução

As células sanguíneas necessitam de um meio de transporte para atingirem e oxigenar todas as células adjacentes ao corpo humano, proporcionando-lhes trocas de matéria (minerais e gases) para assim mantê-las vivas e funcionais. As células recebem materiais, do meio, e lançam para esse meio os produtos do seu metabolismo. Para tal essas substâncias têm de estar em solução aquosa. Este movimento circulatório do sangue ocorre devido à atividade coordenada do coração, pulmões e das paredes dos vasos sanguíneos ^[1].

O sistema circulatório é composto pelos vasos sanguíneos onde circula o sangue ^[1,2]. O sangue é formado por duas fases: O plasma (constituído por 90% de água e o restante são sais minerais e nutrientes) e coagulante que tem como principais constituintes os glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas ^[1,2,3]. Todos os mamíferos têm um sistema circulatório, podendo diferir de espécies para espécies quanto ao tamanho das células sanguíneas. Enquanto nos seres humanos os diâmetros dos glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas variam entre 6,5 - 8 μm , 7-22 e 2-4 μm , respetivamente, para os ovinos os glóbulos vermelhos rondam os 2,5-4,5 e para os bovinos alterna entre 4,5-8 μm ^[2,3,4].

Tais diferenças de tamanho poderão originar diferentes velocidades das células sanguíneas nos microcapilares sintéticos sendo estes semelhantes aos capilares sanguíneos, portanto este facto poderá ser usado para eventual separação das células sanguíneas. Recorrendo à cromatografia hidrodinâmica é possível estudar a velocidade de migração das células sanguíneas e posteriormente proceder eventualmente à separação das mesmas ^[4,5].

No final do século XX, o uso de empacotamentos simples de esferas de vidro micrométricas permitiu obter leitos com poros à escala macromolecular, o que possibilitou a separação de moléculas poliméricas com diferentes massas moleculares. Nas separações por cromatografia hidrodinâmica (HDC), as moléculas com maior massa molecular saem primeiro da coluna do que as moléculas com menor massa molecular, devido ao escoamento do tipo parabólico e à maior exclusão das moléculas de maior dimensão da região da parede dos poros. Assim moléculas mais pequenas presentes no sangue como os nutrientes demoram mais a sair da coluna por estarem mais próximas das paredes dos poros, região onde as velocidades são menores, devido ao perfil parabólico de velocidades ^[5,6].

3 Aspetos Anatómicos e Fisiológicos

3.1 Sistema circulatório

Tanto as aves como os mamíferos são classificados de organismo complexo e com sangue “quente”, alguns de grandes dimensões como o ser humano ou simples animais doméstico, e requerem um sistema com elevada capacidade de transporte de várias substâncias para e de todas as células do organismo, o Sistema Circulatório [1,3,4,5].

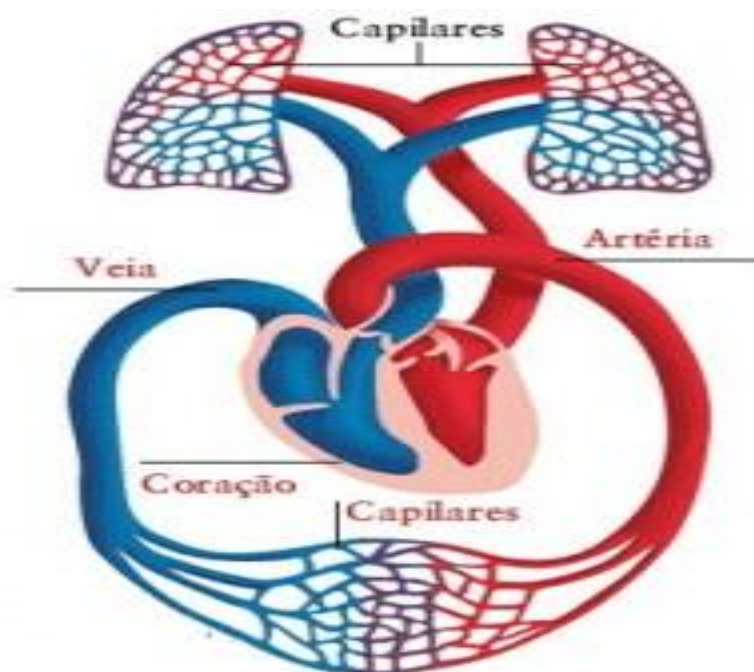


Figura 1 - Diagrama das duas circulações

O sistema circulatório engloba o coração, que é o órgão central, e uma série de estruturas tubulares ramificadas que transportam o sangue, os Vasos [1]. É um grande sistema fechado constituído por vasos que conduzem o sangue dos ventrículos aos tecidos, e destes de volta às aurículas. Está dividido em dois circuitos: a circulação pulmonar ou pequena circulação, que transporta o sangue do coração direito para as trocas gasosas respiratórias; e a circulação periférica ou sistémica, responsável pelo transporte do sangue a todos os tecidos para oferta de oxigénio e demais nutrientes [6].

Existem dois tipos de vasos na circulação: os vasos sanguíneos e os vasos linfáticos. Os vasos sanguíneos são de três tipos principais: artérias, veias e capilares ^[1,6].

Assim consideram-se vasos de condução a grandes artérias que emergem do coração e os seus principais ramos, caracterizadas pelas propriedades elásticas das suas paredes ^[1,6].

Os vasos de distribuição são as artérias de menor diâmetro que alcançam órgãos individualizados e se ramificam no seu interior. A parede das artérias caracteriza-se pela predominância de fibras musculares lisas ^[1,6,7].

Os vasos de resistência são principalmente as arteríolas pois apresentam lúmen de pequeno diâmetro com considerável espessura de fibras musculares nas suas paredes. A contração das fibras musculares permite uma resistência variável à passagem do sangue, controlando o fluxo sanguíneo através da rede capilar ^[7].

Os capilares e as vénulas são chamados vasos de troca pois, é através das suas paredes que ocorre a troca de substâncias entre o sangue e os tecidos ^[7,8].

As vénulas de maior calibre e as veias constituem um sistema de grande volume e baixa pressão, e deste modo consideram-se vasos de capacitância, que através deste se faz o retorno sanguíneo ao coração ^[8].



Figura 2 - Vasos Sanguíneos

3.2 Sangue

O sangue é formado por um líquido amarelado denominado plasma, no qual se encontram em suspensão milhões de células. Entre as proteínas plasmáticas, encontram-se a albumina, responsável pela manutenção da pressão osmótica sanguínea; o fibrinogénio e a protombina, que participam na coagulação; e as globulinas, incluindo os anticorpos, proporcionam imunidade face a muitas doenças [4].

Uma grande parte do plasma (91%) é composta pela água, meio que facilita a circulação de muitos fatores indispensáveis que formam o sangue. O nível de sal no plasma é semelhante ao nível de sal na água do mar [4,5].



Figura 3 - Constituintes Sanguíneos

Na figura acima, pode-se observar um vaso sanguíneo (cortado ao meio), onde aparecem os constituintes principais do sangue (plaquetas, glóbulos vermelhos e brancos), suspensos no plasma sanguíneo [9].

3.2.1 Glóbulos Vermelhos (GV's)

Os glóbulos vermelhos (Figura 4) são também conhecidos por hemácias ou eritrócitos.

São as células sanguíneas responsáveis pela cor vermelha do sangue, são as mais numerosas dos constituintes do sangue e muito flexíveis.

Os eritrócitos não têm núcleo, têm na sua constituição a hemoglobina e têm uma forma em disco bicôncavo que em média no corpo humano têm 7,5 μ m de diâmetro, com 2,6 μ m de espessura nas bordas e 0,8 μ m no centro [8,9].

A função dos glóbulos vermelhos é realizarem o transporte do oxigênio no sangue dos pulmões até aos tecidos e do dióxido de carbono dos tecidos aos pulmões [1,4].

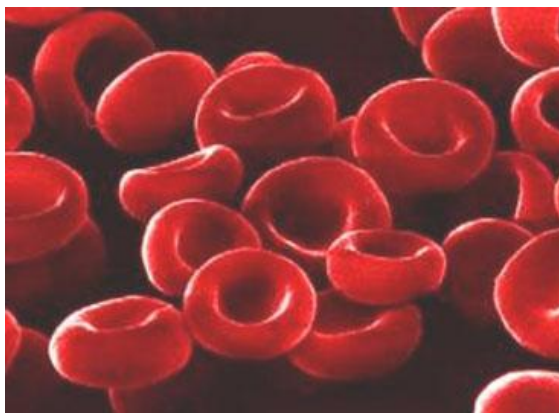


Figura 4 - Glóbulos Vermelhos

Realizaram-se estudos com glóbulos vermelhos, segundo referências bibliográficas sabe-se que o diâmetro das células sanguíneas, variam de espécie para espécie e também variam dentro da mesma espécie. No caso dos glóbulos vermelhos do sangue humano têm uma variação do seu diâmetro de 6,5 a 8 μm (tabela 1) [1]. Já os do sangue de ovelha alternam entre 2,5 e 4,5 μm e no de vaca entre 4,5 e 8 μm [10,11].



Figura 5- Amostras de sangue de vaca

Tabela 1- Tamanho de células do sangue do corpo humano

Célula	Tamanho	Número
Hemácia	6,5 a 8,5 μm	3,9 – 5,5 milhões/ μL na mulher
	Média 7,5 μm	4,1 – 6,0 milhões/ μL no homem
Leucócitos		6.000-10.000/ μL
Neutrófilos	12 – 15 μm	60-70%
Eosinófilos	12 – 15 μm	2-4%
Basófilos	12 – 15 μm	0-1%
Linfócito	6 – 18 μm	20-30%
Monócito	12 – 20 μm	3-8%
Plaquetas	2 – 4 μm	200.000-400.000/ μL
Microlitros (μL) e mm^3 são unidades idênticas		

Tabela 2 - Tamanho de glóbulos vermelhos das espécies em estudo

Espécie	Tamanho médio Diâmetro (μm)	Nº de eritrócitos (milhões/ mm^3)
Vaca	5,6	6-8
Ovelha	4,8	10-13
Homem	7,5	5-6

3.2.2 Glóbulos brancos

Os glóbulos brancos (Figura 6) são conhecidos também por leucócitos.

Os glóbulos brancos são produzidos na medula óssea ou em tecidos linfóides.

Estas células são incolores e esféricas, os granulados têm um núcleo irregular e os agranulosos têm o núcleo regular. Os glóbulos brancos são maiores que os glóbulos vermelhos mas estão no sangue em menores quantidades.

A função dos glóbulos brancos é a proteção do organismo ^[8,9].

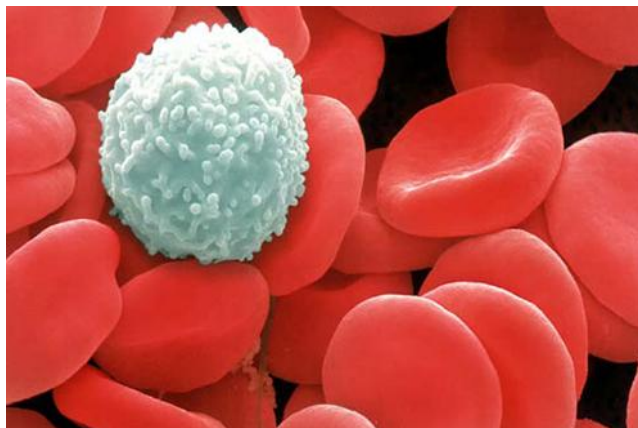


Figura 6 Glóbulo Branco

Os leucócitos podem ser ainda divididos em granuloso ou agranuloso, e por sua vez os granuloso são divididos em neutrófilo, eosinófilo (acidófilo) e basófilo, os agranulosos são divididos em linfócitos B e T e monócitos (Figura 7) [9].

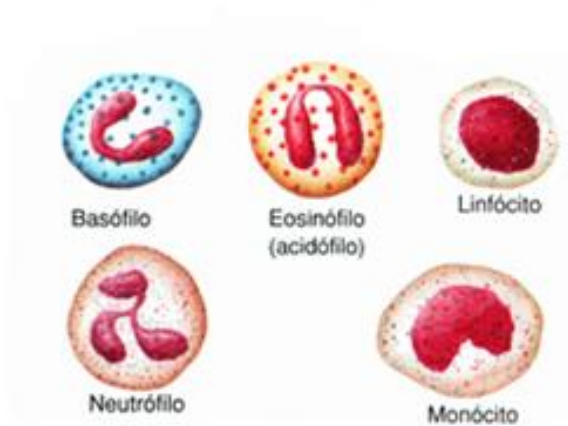


Figura 7 – Leucócitos

Tabela 3 - Tamanho de Glóbulos Brancos dos animais em estudo entre outros em (μm)

Espécie	Granulócitos			Linfócitos	Monócitos
	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos		
Cavalo	55-60	2-4	0,5-1	30-40	3-4
Bovino	25-30	5-6	0,4-0,8	55-65	5-8
Ovelha	30-35	5-6	0,4-0,8	50-70	2-4
Cabra	40-45	2-4	0-0,5	50-55	2-4
Porco	45-55	2-3	0-0,8	40-50	2-6
Cão	60-75	3-8	0,2-0,6	20-25	2-4
Gato	55-63	3-6	0,2-0,6	30-35	2-4
Coelho	45-55	1-3	1-5	35-55	4-6
Cobaia	40-45	3-6	0,4-0,8	45-50	3-5

3.2.3 Plaquetas

As plaquetas (Figura 8) também são conhecidas por trombócitos.

Têm uma forma circular, sem núcleo e com um diâmetro muito pequeno 2 a 4 μm . São as células mais pequenas do sangue.

A função das plaquetas é a coagulação do sangue. Elas apenas permanecem no sangue no prazo de 10 dias ^[8,9].



Figura 8 - Plaquetas

3.3 Microcirculação

É através da microcirculação que os nutrientes do sangue são transportados pelos capilares até aos tecidos ^[10].

Esta circulação ocorre em vasos com tamanhos inferiores a 100 μm , dentro deste parâmetro estão os vasos que se querem estudar neste trabalho, os microvasos capilares que tem o tamanho aproximado aos microcapilares ^[11]. As propriedades encontradas no fluxo sanguíneo dependem da geometria das redes microvasculares. As redes microvasculares podem derivar de vários vasos, estes podem ter sido fornecidos por arteríolas ou vénulas estas por sua vez podem ter sido drenadas por artérias ou veias. As redes de arteríolas estão organizadas em dois grandes grupos, para os vasos superiores a 25 micrómetros estes encontram-se sob a forma de arcos enquanto os mais pequenos encontram-se numa forma linear ^[12].

Existe uma grande variedade de métodos para medir os diferentes fluxos sanguíneos na microcirculação. As velocidades dos eixos e perfis de velocidade nas arteríolas e vénulas são medidas através de correlações temporais ou espaciais sob a intensidade de feixes luminosos. Pode usar-se como método marcadores de fluorescência nos glóbulos vermelhos, plaquetas ou ainda microesferas devidamente marcadas. Atualmente em mecânica dos fluidos tem-se usado a técnica da viscosimetria de partículas de imagem (VPI) para assim poderem construir um perfil de velocidades nos microvasos ^[11,12]. A microcirculação é o local onde o sangue e os tecidos realizam as suas trocas. A principal função da microcirculação é equilibrar as necessidades celulares em oxigénio com as quantidades transportada pelos eritrócitos, é fazer o equilíbrio da troca das substâncias e da nutrição dos tecidos ^[12].

Tabela 4 - Parâmetro da microcirculação no músculo sartório dum gato para vários vasos ^[13].

	Diâmetro (μm)	V _m (mm/s)	Re	α	TQC (s ⁻¹)	P _τ	In vitro μ _a , cPs, para H _d =0,45	In vitro μ _a , cPs, para H _d =0,45
Arteriolas	60	12	0,2	0,8	200	60	2,6	2,8
	15	7	0,03	0,2	470	140	1,8	4,9
Capilares	5	0,2	0,0003	0,07	40	12	1,8	15
Vénulas	18	0,2	0,001	0,2	10	3	1,9	4,2
	72	2,4	0,05	0,9	30	10	2,7	2,9

Notações: Re é o numero de Reynolds, $Re = \rho V_m D / \mu_b$, onde V_m é a velocidade média, μ_b = 3,84 cPs é a viscosidade do sangue com um hematócrito de 45%; α é o numero de Womersley, $\alpha = D (\rho w / \mu_b)^{1/2}$, onde w é a frequência; em que TQC é a Taxa de Quási cisalhamento; onde P_τ é a tensão de cisalhamento na parede.

A tabela 4 ilustra os parâmetros hemodinâmicos típicos para vários microvasos no músculo-esquelético selecionadas. É de notar que tanto o número de Reynolds e Womersley são pequenos.

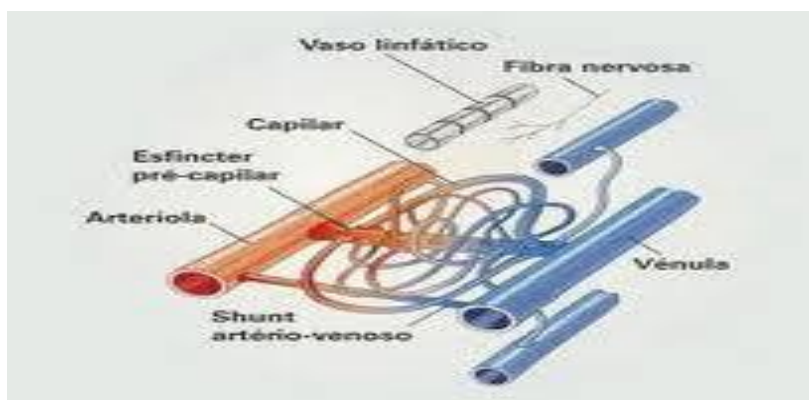


Figura 9 – Microcapilares

3.4 Camada livre de células

Na microcirculação há formação de uma camada livre de células junto a parede dos capilares é encarado como um redutor de atritos entre as células sanguíneas, e células endoteliais, conseqüentemente, é um redutor da resistência ao fluxo sanguíneo. No entanto, a formação do complexo da camada livre de células ainda não foi descrita convenientemente, principalmente devido a fatores físicos e multi-hemorreológicos que afetam esse fenómeno. Estudos recentes têm medido o efeito do hematócrito (Hct) da espessura da camada de células livre em linha reta em microcanais circular de polidimetilsiloxano (PDMS). A formação de uma camada livre de células é visível nas imagens capturadas (ver Figura 10) usando uma combinação de técnicas de análise de imagem que são capazes de detetar um aumento na espessura da camada livre de células à medida que diminui o Hct [15,16,17].

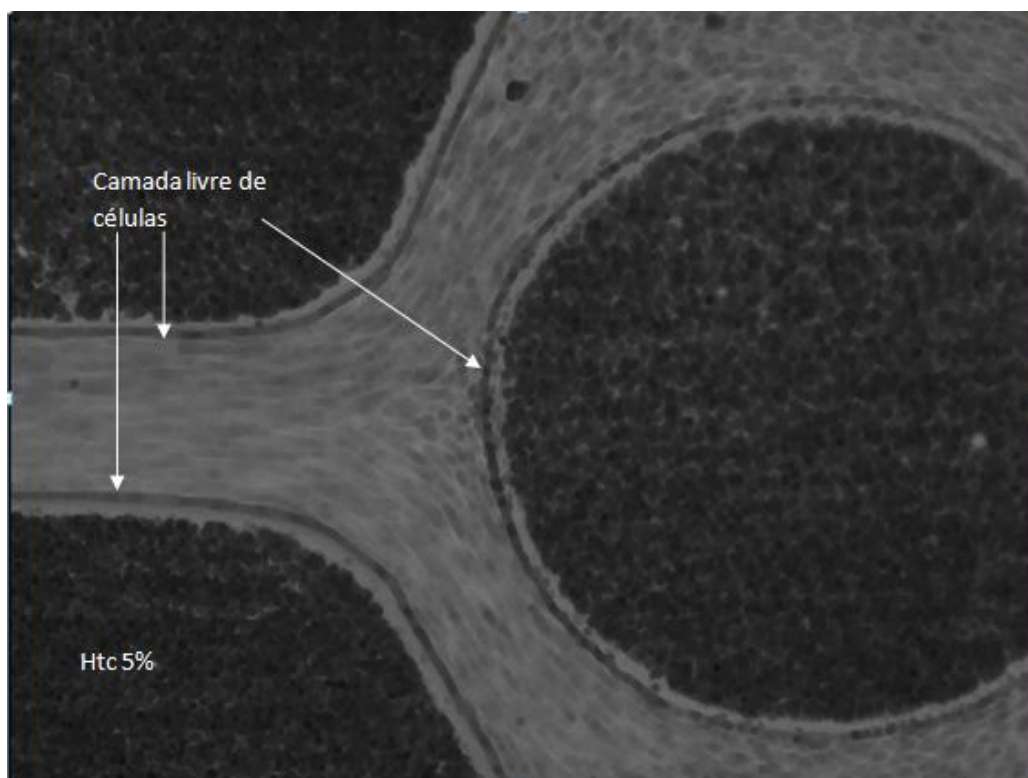


Figura 10 - Camada livre de células

4- Materiais e métodos

4.1- Centrifugação

Para conseguir realizar o estudo das células sanguíneas, foi realizada a centrifugação do sangue, e separação dos diferentes elementos circulantes do sangue [12].

Nos tubos de ensaio foram colocadas algumas amostras de sangue com soro fisiológico contendo 0,9% de cloreto de sódio, para evitar a coagulação e manter os glóbulos vermelhos vivos por mais tempo. Os tubos com sangue foram colocados na centrifugadora (Figura 11), tendo igual volume de sangue e soro, de modo a não ocorrer o rebenamento das mesmas por excesso de água ou atrofia destas por excesso de sal (diferença de pressão osmótica). Para que exista equilíbrio dentro da centrifugadora foi necessário colocar outros tubos em posições opostas com o mesmo peso. A centrifugação foi realizada à temperatura de 15°C, com 2000 rotações por minuto e com uma duração de 15 minutos [13].



Figura 11 - Centrifugadora

O uso da centrifugação permitiu que se realizassem algumas lavagens do hematócrito por forma a obter uma amostra contendo apenas glóbulos vermelhos e soro fisiológico, com uma micropipeta eram retiradas amostras com 0,1 ml de glóbulos vermelhos para 10 ml de soro e assim obter com um hematócrito de 1%.

Para isso usou-se um encaixe de forma a colocar-se os tubos de ensaio em locais adequados para esses serem centrifugados em condições seguras.



Figura 12 - Encaixe para tubos de ensaios

Ao longo do estudo, realizaram-se diferentes experiências com diferentes lavagens. As experiências foram realizadas com 2, 3 e 4 lavagens. Os resultados cromatográficos demonstraram que duas lavagens eram suficientes para isolar os glóbulos vermelhos.

No final de cada centrifugação obtiveram-se 3 camadas, sendo que a mais importante para o referido estudo era a camada depositada no fundo do tubo. Esta camada era constituída por glóbulos vermelhos e representavam 35% a 50% do volume final ^[1]. A camada bastante fina que aparece acima dos glóbulos vermelhos é constituída pelos glóbulos brancos e leucócitos, e apenas representa 1% do volume final ^[1]. Por fim, sobre estas duas camadas, era visualizada uma terceira que era constituída pelo plasma (Figura 13).



Figura 13 - Obtenção do tubo centrifugado

4.3 Determinação da dimensão das células sanguíneas

Para a determinar os tamanhos das células sanguíneas foi utilizado o programa Image J, após aquisição das imagens das células sanguíneas através de um microscópio munido de uma camera de filmagem e fotográfica Nikon conectado a um computador, como esquematizado na figura (14 A) é ilustrado na figura (14 B)^[12,13,14].

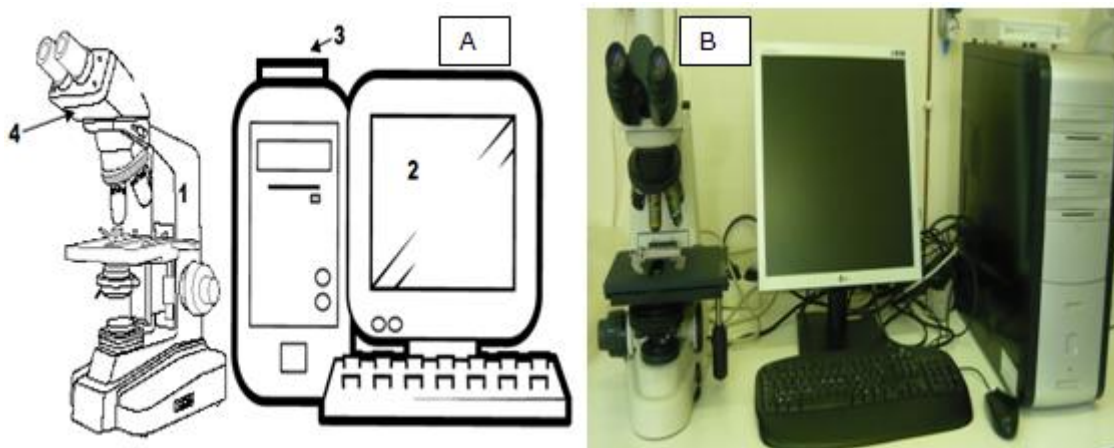


Figura 14 - Esquema do equipamento experimental de aquisição de imagem

O equipamento é constituído por um microscópio (1) e uma câmara para aquisição de imagens (4), incorporada no microscópio. Após recolha das imagens, a informação é enviada a um processador de dados (3), que converte a informação para o computador (2) com o software de aquisição de dados. Através do programa NIS ELEMENTS F2.20 obtém-se no monitor a imagem microscópica correspondente. Através desta é possível focar o objeto e capturar as imagens pretendidas^[12,13,14].

Para a observação dos glóbulos vermelhos ao microscópio foi utilizado sangue diluído a 1%. Fez-se um pequeno esfregaço com uma gota de sangue, colocada entre a lâmina de vidro e uma lamela, previamente limpas e desinfetadas com etanol. A lâmina foi colocada no microscópio, e após as focagens necessárias com objetivas mais pequenas, foram retiradas imagens recorrendo à lente de 100x, várias focagens dos glóbulos vermelhos para posterior determinação do tamanho médio destes. O processo foi realizado para o sangue de bovino.

O tamanho dos glóbulos vermelhos é calculado através do programa ImageJ. Para ser possível o cálculo do tamanho dos glóbulos vermelhos era necessária uma referência. Para tal foi utilizada uma grelha quadriculada com aresta de 10 μm , como demonstra a figura seguinte. Através do programa ImageJ,

fez-se passar um segmento de reta sobre uma aresta de um dos quadrados e definimos a referida aresta com 10 μm de comprimento.

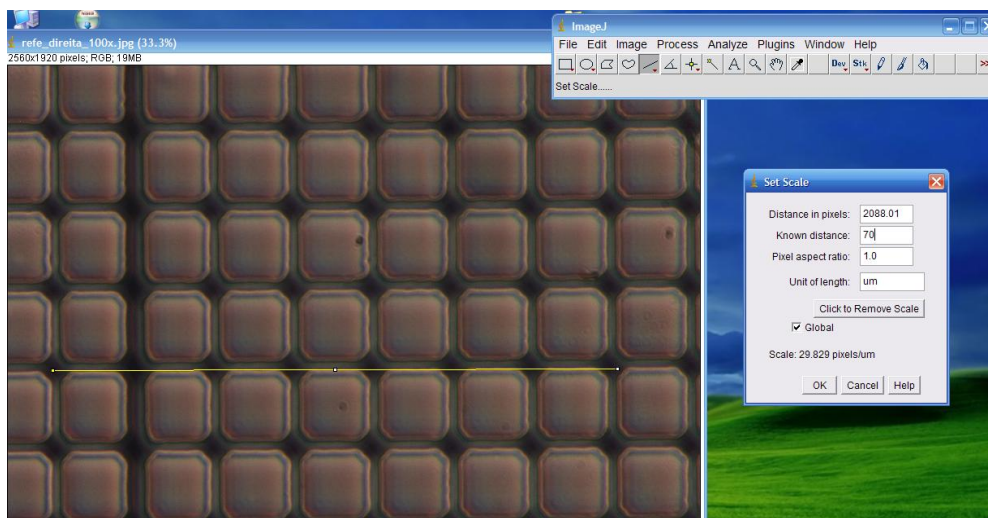


Figura 15 - Esquema do equipamento experimental

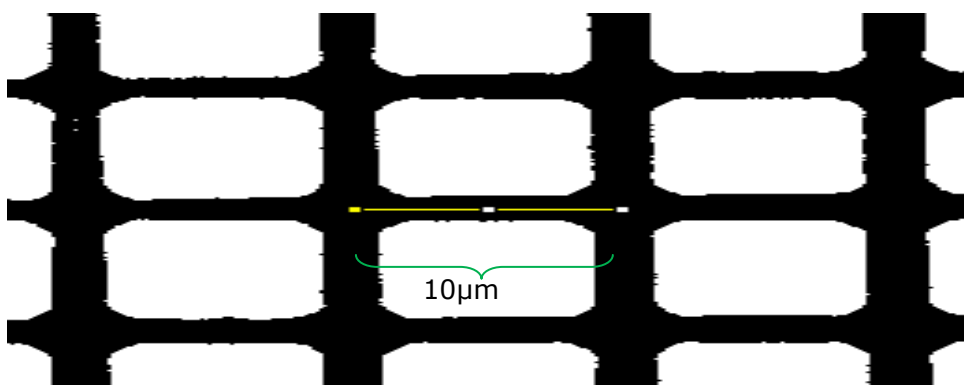


Figura 16 - Grelha de referência ampliada

Ficando assim a dita aresta como referência para a medição do diâmetro dos glóbulos vermelhos. Posteriormente, e através das imagens retiradas do microscópio, fez-se passar um segmento de reta na horizontal e outro na vertical sobre o glóbulo vermelho, de onde se retirou a dimensão, em μm , desses segmentos de reta. No final retirou-se o valor médio dos valores obtidos.

4.4 Cromatografia Hidrodinâmica

Para o estudo do tempo de retenção das células sanguíneas recorreu-se a cromatografia hidrodinâmica (HDC). O processo de cromatografia hidrodinâmica (HDC) realizar-se-á recorrendo a equipamento da *Jasco*, como esquematizado na figura 17 e ilustrado na figura abaixo ^[15].

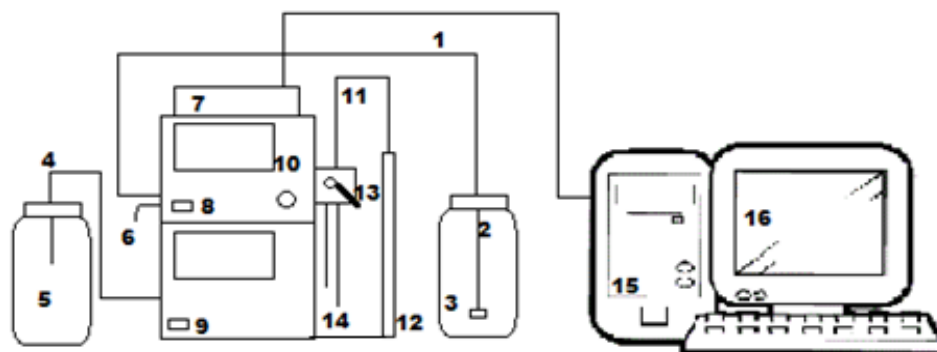


Figura 17 - Esquema do equipamento experimental



Figura 18 - Fotografia da instalação experimental

O equipamento é constituído por uma bomba (8) que bombeia o solvente líquido, designada fase móvel, encontrando-se num frasco (2), que no nosso caso corresponde a soro fisiológico. Ligando a bomba para um determinado caudal, faz-se uma injeção rápida da amostra na entrada do injetor (13), enchendo na totalidade o tubo que vai descer desde o injetor até ao início da fase estacionária.

Como o equipamento tem um loop de 20 μL a quantidade injetada em excesso irá sair pelo tubo de saída (14). Rodando o injetor de load para inject efetua-se um impulso, onde, a amostra será arrastada pela fase móvel até à fase estacionária na coluna (12) ^[15].

Devido a maior ou menor afinidade dos solutos para com a fase estacionária tem como consequência um maior ou menor tempo de retenção na coluna. Esta diferença de velocidades vai permitir ao detetor (9) captar por diferentes ordens de chegada os solutos, medindo o índice de refração e enviando a informação para o processador de dados, que converte a informação para o computador (15) com o software de aquisição de dados. Através do programa Peak Simple obtém-se no monitor (16) um cromatograma, apresentando em forma de picos a quantidade de substância por unidade de área. Após a leitura do índice de refração pelo detetor a solução percorre pelo tubo (4) até ao frasco de restos (5).

Para as experiências cromatográficas, foi utilizada como fase móvel, soro fisiológico, uma solução constituída por água destilada e 0.9% de Cloreto de Sódio (NaCl). As soluções eram preparadas a partir do soro fisiológico e do hematócrito previamente tratado, como explicado anteriormente. Utilizaram-se vários empacotamentos e algumas colunas. Para os empacotamentos de esferas de vidro com 0,1115mm, 0,15mm, 0,3375mm e 0,875mm utilizaram-se colunas em aço inox, com 4,6mm de diâmetro de 200mm de comprimento. Adicionalmente usaram-se empacotamentos de esferas de 2mm e 0,3375mm numa coluna de 50 cm de comprimento 2,5 cm de raio.

Todos os empacotamentos tiveram que ser preparados pelo autor deste trabalho com a ajuda do orientador no laboratório. Os empacotamentos tinham que estar coesos, sem volumes mortos. Para isso teve que se encher as colunas com as esferas de tamanho desejado com o auxílio de uma espátula. Através de batimentos verticais da coluna compactavam-se as esferas para retirar todo o ar e espaços vazios, e assim obter empacotamentos satisfatórios e porosidades próximas de 0,4 (ver anexo 8.2).

Antes de iniciar uma experiência era estabelecido o caudal desejado na bomba sendo necessário esperar (por vezes várias horas) pela estabilização do sinal no detetor de índice de refração, o qual podia ser observado no *software* de aquisição de dados. Após a estabilização do sinal, no valor de zero do índice de

refração, procedia-se à injeção da amostra que migrava posteriormente através da coluna (ver figura 19).

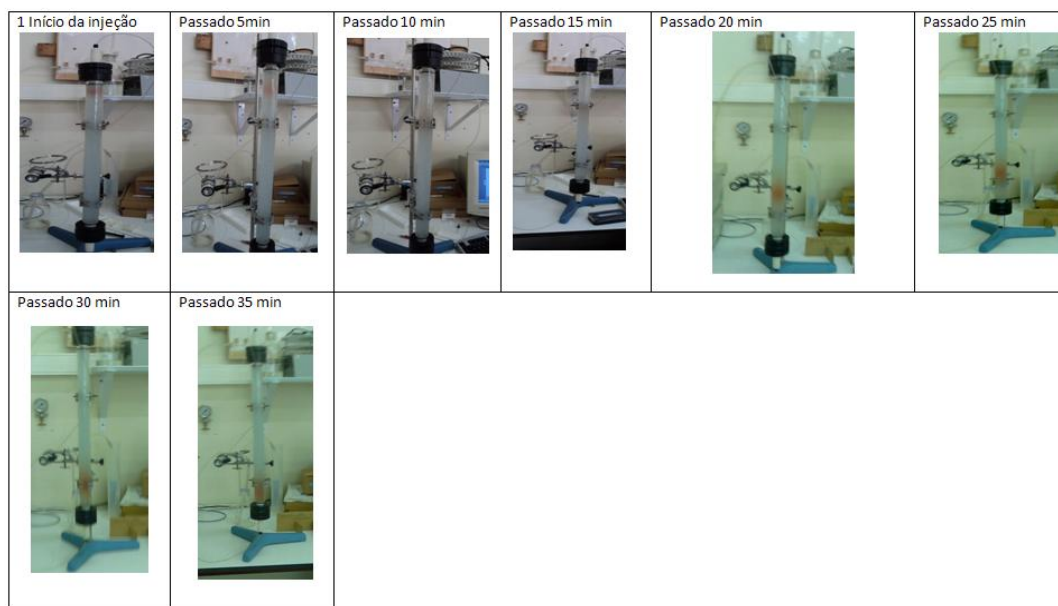


Figura 19 - Sequência de uma injeção num empacotamento de 2mm num tubo de 50 cm

Na figura acima está representada o trajeto de uma injeção de sangue com um hematócrito de 1% num empacotamento com esferas de 2mm num tubo de 50cm de 10 em 10 minutos. E verificou-se logo após a injeção no empacotamento uma camada fina e muito concentrada de sangue. Com o passar do tempo verificamos que a camada vai ficando mais esfeça e menos concentrada (dispersão). Por fim esta camada sai do empacotamento e entrar no detetor.

4.4.1 – Porosidade

A porosidade foi calculada através do empacotamento de 2mm já que este empacotamento era o único que reunia todas as condições fundamentais para esse cálculo.

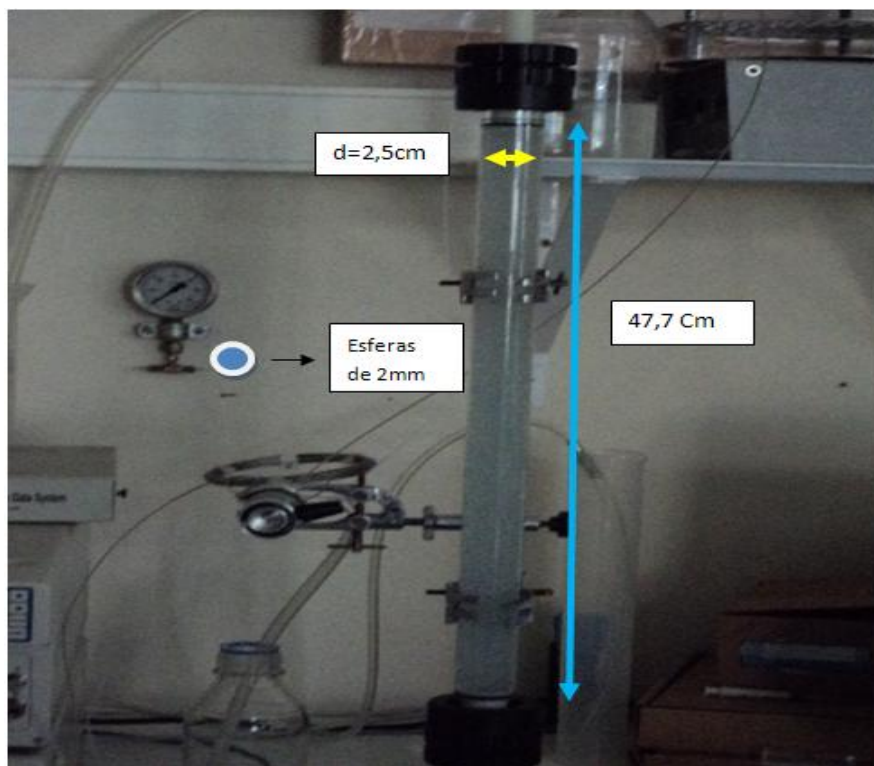


Figura 20 - Fotografia coluna com os dados relevantes

O cálculo da porosidade está apresentado no anexo (8.2), tendo-se obtido um valor próximo de 0,4, valor este que é típico para empacotamentos de esferas de vidro ^[16].

4.5 Microcapilares

4.5.1 Criação de microcanais sintéticos

O objetivo primordial na construção de microcanais foi analisar o comportamento do sangue em geometrias semelhantes ao dos empacotamentos das colunas utilizadas nas experiências de HDC. Assim, com a ajuda dum microscópio com uma camera de alta velocidade incorporada foi possível observar e analisar o comportamento das células durante o escoamento. Para a produção dos microcanais foram necessárias três fases:

Primeira fase: Utilizou-se um programa de desenho e arquitetura chamado de Auto CAD para desenhar a geometria e alinhar as formas com as medidas desejadas.

Segunda fase: Obtiveram-se as mascaras do projeto desenvolvido e assim utilizaram-se como molde. Deste modo, foram aplicados dois processos:

Primeiro processo: Impressão por corte em papel vinílico autocolante.

Segundo processo: Impressão de circuito em cobre (processo fotográfico).

Terceira fase: Pôs-se em prática o projeto.

Descrição das fases:

a) Planificação das formas

Planificaram-se e alinharam-se as dimensões dos microcanais. Neste trabalho experimental, aproximaram-se a geometria dos microcanais as dimensões dos empacotamentos das esferas antes trabalhadas na HDC.

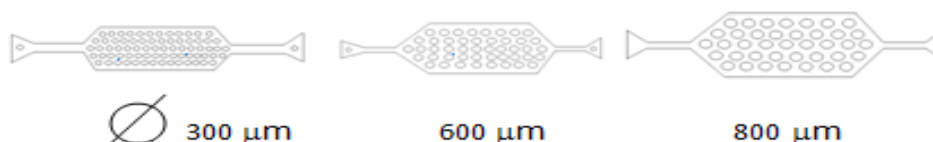


Figura 21- mascaras dos moldes de microcanais a desenvolver

Optou-se por fazer uma geometria com círculos de 800, 600 e 300 μm , expostas de forma equidistante, para cada diâmetro usaram-se intervalos com tamanho correspondente a metade do diâmetro dos círculos.

b) Impressão das máscaras

Inicialmente utilizou-se o processo da impressão de máscaras através da impressão de corte, isto é, ela imprime e corta o formato da geometria em papel vinílico autocolante, tal como demonstra a seguinte figura.



Figura 22 - Impressora de corte

Para valores abaixo dos 800 μm , a lâmina não tinha capacidade para cortar os círculos o que se tornou um problema e percebeu-se que não era a alternativa mais viável. Mesmo assim testou-se a máscara de 1000 μm , depois de cortada a máscara, retirou-se o molde e colocou-se na caixa de Petri, pronta para receber o PDMS.

Para a obtenção das máscaras com os diâmetros mais pequenos recorreu-se a uma empresa de forma molda-las pelo método litográfico. Já com a máscara proveniente da empresa, imprimiram-se pelo método fotográfico.

Foi necessário usar uma placa de cobre sensibilizada, esta foi adequada ao tamanho da máscara do microcanal, seguidamente colou-se a máscara a placa e colocou-se na mesa UV e esperou-se cerca de 200s conforme a figura.



Figura 23 - A placa com a mascara na mesa de UV

No momento da revelação prepararam-se num tabuleiro com dois litros de água e doze gramas de hidróxido de sódio a temperatura de 38°C, e colocou-se em seguida a placa dentro da solução, foi necessário agitar levemente o tabuleiro a fim de revelar a geometria da mascara tal como se pode ver na figura 23.



Figura 24 - Momento da revelação

Lavou-se a placa com água para evitar qualquer corrosão e assim ficou o cobre a vista, em seguida preparou-se uma solução contendo 50 ml de ácido clorídrico com 25ml de peróxido de hidrogénio fez-se a solução com 200 ml de água destilada. Pegou-se na placa e mergulhou-se nesta nova solução voltou-se a agitar ao de leve para o desaparecimento do cobre na placa e reparou-se que a solução ia alterando a cor para verde. Restando a geometria desejada na placa, procedeu-se a uma última lavagem para retirar os resíduos da anterior lavagem. Para reluzir o cobre limpou-se a placa com lenço de papel embebido em acetona tal como se pode verificar na figura 24.



Figura 25 - A placa pronta para ser usada

c) Elaboração dos microcanais

Preparou-se uma solução de PDMS na proporção de dez para um com um agente de cura (para assim solidificar mais depressa), cobriu-se a mascara com esta solução retiraram-se todas as bolhas numa bomba de vácuo, após a extinção das bolhas colocaram-se os moldes numa estufa a 80°C e cronometraram-se vinte minutos. Após o molde estar preparado pegou-se numa lâmina de vidro previamente limpa para preparar uma base para o microcanal. Na lâmina são colocadas uma quantidade suficiente de PDMS numa proporção de vinte para um para assim cobrir a mesma, esta vai centrifugar em vácuo de forma a espalhar homogeneamente o PDMS em seguida coloca-se na estufa a 80°C e aguarda-se 20 minutos. Depois retiram-se as lâminas, colocam-se os moldes e volta-se a por na estufa a 80°C, e aguardam-se depois 24 horas.



Figura 26 - Microcanais obtidos: Círculos com diâmetro 300 μm ; 600 μm e com diâmetro 800 μm .

4.5.2 Manipulação de amostras de glóbulos vermelhos para o escoamento em microcanais

Prepararam-se amostras contendo dextrano 40 (Dx 40) estes preparados foram realizados da mesma forma que as preparações com hematócitos de 1% em soro fisiológico, apenas se substituiu o soro fisiológico por dextrano 40 e aumentou-se o hematócrito de 1% para 5%.

O Dextrano é um polissacarídeo sintético que pode ser obtido a partir da fermentação de sacarose, devido ao seu peso e à sua estrutura molecular, a sua principal função é a expansão do volume plasmático. Para além disso, esta substância mantém um ambiente favorável de pressão osmótica para as células, e mantendo os glóbulos vermelhos funcionais.

Para nos certificarmos que o hematócrito era mesmo de 5% fez-se a sua medição e esta consistia em pegar em quatro capilares de dimensões reduzidas encher os capilares com a amostra de dextrano com glóbulos vermelhos. Estes capilares foram introduzidos na centrífugadora conforme está representado na seguinte figura.



Figura 27 - Os capilares na centrífugadora

Usou-se um programa diferente do anterior e esperou-se dez minutos para este ficar em condições, depois retiraram-se os capilares devidamente lacrados para que não libertassem a solução. Após a retirada dos capilares inseriram-se em cima de um medidor de hematócrito como se pode observar na figura 27.

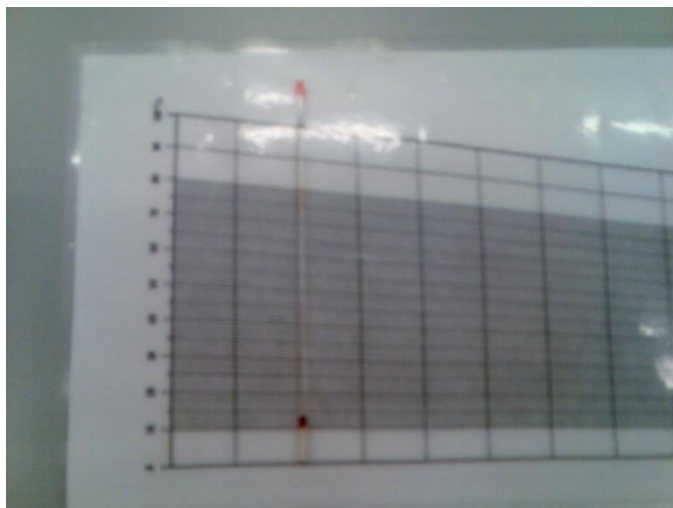


Figura 28 - Medidor de hematócrito

4.5.3 Análise do escoamento de GV's nos microcanais produzidos

Depois de concluída a conceção do dispositivo, procedeu-se ao estudo do escoamento dos glóbulos vermelhos com um hematócrito de 5% em Dextran 40. Neste estudo utilizou-se um microscópio invertido de modelo IX 71 com uma Câmara de Alta Velocidade incorporada e assim captar vídeos/imagens, e com uma bomba de seringa para bombear a amostra de forma contínua. Foram testados os mesmos caudais para os diferentes microcanais.



Figura 29 - Microscópio ligado a um sistema com bomba de seringa

Para testar o microcanal, inicialmente optou-se por introduzir um caudal muito reduzido, na ordem de $1 \mu\text{L}/\text{min}$ permitindo assim, que o microcanal fosse preenchido pelos glóbulos vermelhos lentamente, e desta forma evitar a formação de bolhas e danificação dos microcanais. Os vídeos capturados correspondem aos caudais de 5, 10 e $20 \mu\text{L}/\text{min}$.

5 Apresentação e discussão de resultados

5.1 Dimensão dos diferentes glóbulos vermelhos

O diâmetro médio obtido para os glóbulos vermelhos, provenientes do sangue de vaca (o sangue sob estudo) foi de 8.214 μm (ver tabela5). Na Tabela 5 pode observar-se também que para o caso do sangue, humano e ovino, as dimensões determinadas pelo mesmo processo utilizado neste trabalho são próximas dos valores da literatura.

Tabela 5 - Diâmetros dos GV's determinados experimentalmente e comparados

Diâmetro GV's [μm]		
GV's	Valores determinados	Literatura
Ovelha	4,6 ^[19]	2,5 a 4,5
Humano	7.363 ^[16]	6,5 a 8
Vaca	8.214	3,4 a 13,9

Nas Figuras 30 a 32 são apresentadas ilustrações do cálculo do diâmetro médio dos GV's a partir do ImageJ, conforme descrito na secção 3.3.

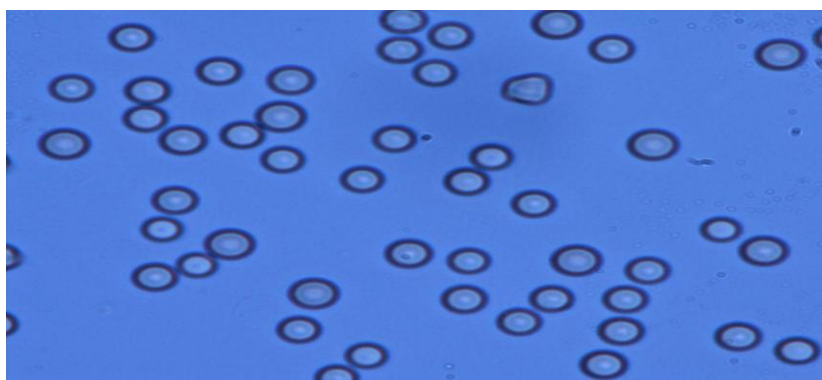


Figura 30 - Fotografia de GV's tirados ao microscópio

Para calcular os raios dos vários glóbulos vermelhos teve que se ampliar cada glóbulo vermelho e fez-se a subtração do ponto 2 pelo ponto 1 e a subtração do ponto 3 pelo ponto 4. Depois de se ter as duas distâncias fez-se a média e obteve-se o raio médio, tal como se pode ver na figura 31.

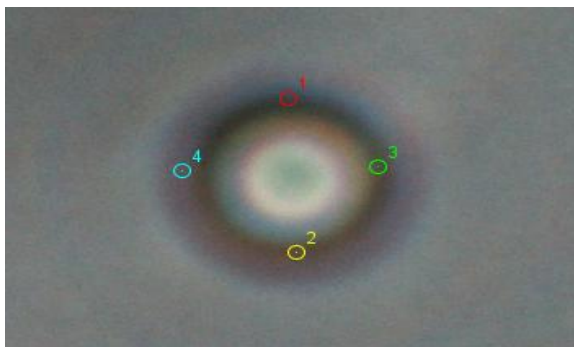


Figura 31 - Fotografia de um GV ampliado através do microscópio

Através das contagens dos glóbulos vermelhos provenientes do sangue de bovino retiram-se 100 células e registaram-se os diâmetros, conforme apresentado no anexo 8.2, e depois puseram-se em intervalos de tamanhos para se fazer uma distribuição conforme está apresentada na seguinte tabela.

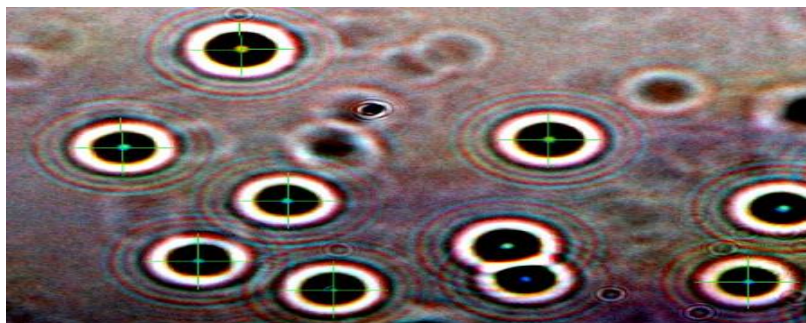


Figura 32 - Fotografia de vários GV's para a contagem

Tabela 6 - Intervalo de diâmetros dos Glóbulos Vermelhos (μm)

Intervalos (μm)	Números
[3;4[5
[4;5[8
[5;6[4
[6;7[13
[7;8[13
[8;9[25
[9;10[11
[10;11[6
[11;12[4
[12;13[5
[13;14[6
Total	100

Apos a contagem dos glóbulos e a sua diferenciação através dos tamanhos podemos elaborar um gráfico e retirar algumas ilações.

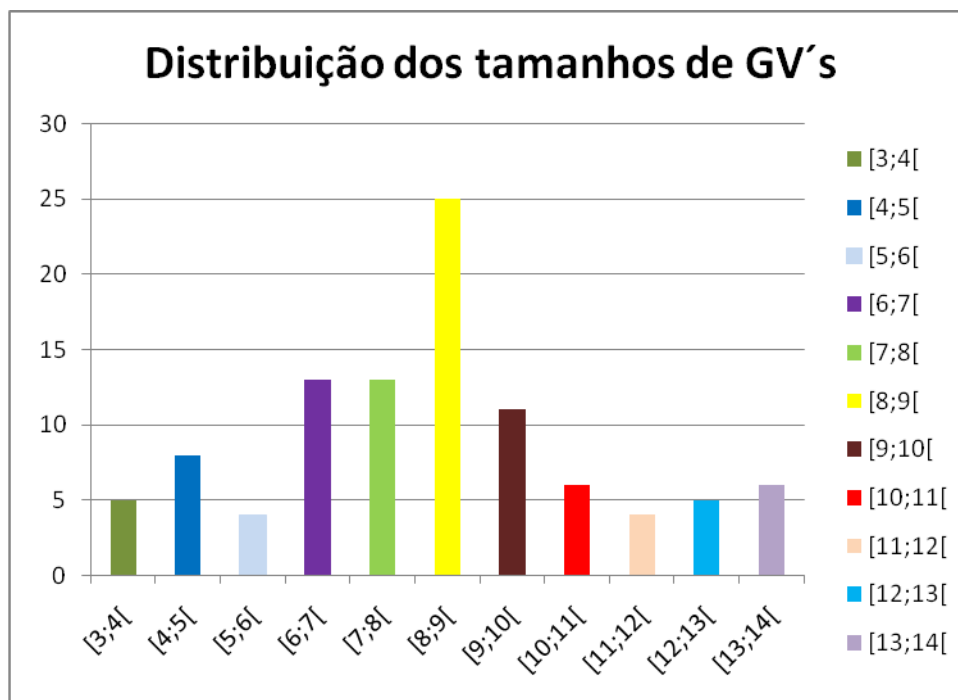


Figura 33 - Gráfico da distribuição dos GV's de bovino

Como era previsível existem uma maior quantidade de glóbulos vermelhos compreendidos no intervalo [8, 9[tal como apresentado na literatura. A existência de GV's com dimensão diferente nas amostras usadas nas experiências cromatográficas leva a obtenção de picos cromatográficos mais largos do que no caso hipotético em que todos os GV's possuem uma só dimensão.

5.2 Escoamento dos glóbulos vermelhos nas colunas cromatográficas

Para a realização deste estudo começou por efetuar-se as experiências com diferentes concentrações de GV's em soro fisiológico. As diferentes concentrações utilizadas foram de 0.1%, 0.25%, 0.5%, 0.75% e 1%. Com a aplicação do mesmo processo para as diferentes concentrações verificou-se que estas não afetavam os tempos de retenção (o tempo correspondente ao máximo dos picos apresentados nas gráficos seguintes) obtidos. Por esta razão decidiu-se usar para o resto do estudo uma concentração de 1% para evitar problemas com ruídos do sinal.

Após concluir-se que as concentrações utilizadas não afetavam o tempo de retenção também verificamos que o número de lavagens (dos GV's por centrifugação em soro fisiológico) não afetavam os valores do tempo de retenção. Assim optou-se por usar duas lavagens na preparação de todas as amostras usadas posteriormente nas experiências com diferentes caudais. Nesse estudo, fizeram-se experiências com 2,3 e 4 lavagens.

Nas figuras seguintes podemos observar os cromatogramas obtidos com os GV's do sangue de bovino e com sacarose. O caudal parece não afetar significativamente os tempos de retenção obtidos na gama dos caudais estudada. No entanto, parece haver um ligeiro aumento dos RRT's, para caudais superiores a 1 ml/min. Com o empacotamento de 0,1115 mm obtiveram-se RRT's elevados para caudais baixos (inferiores a 1 ml/min) e RRT's baixos para caudais mais elevados. Isto sugere que, no referido empacotamento os GV's eram retidos pelo empacotamento na gama de caudais mais baixa.

Em relação aos gráficos a concentração é adimensional e o tempo foi registado em minutos.

5.2.1 Dados de empacotamento de 0,1115 com sacarose e sangue de vaca

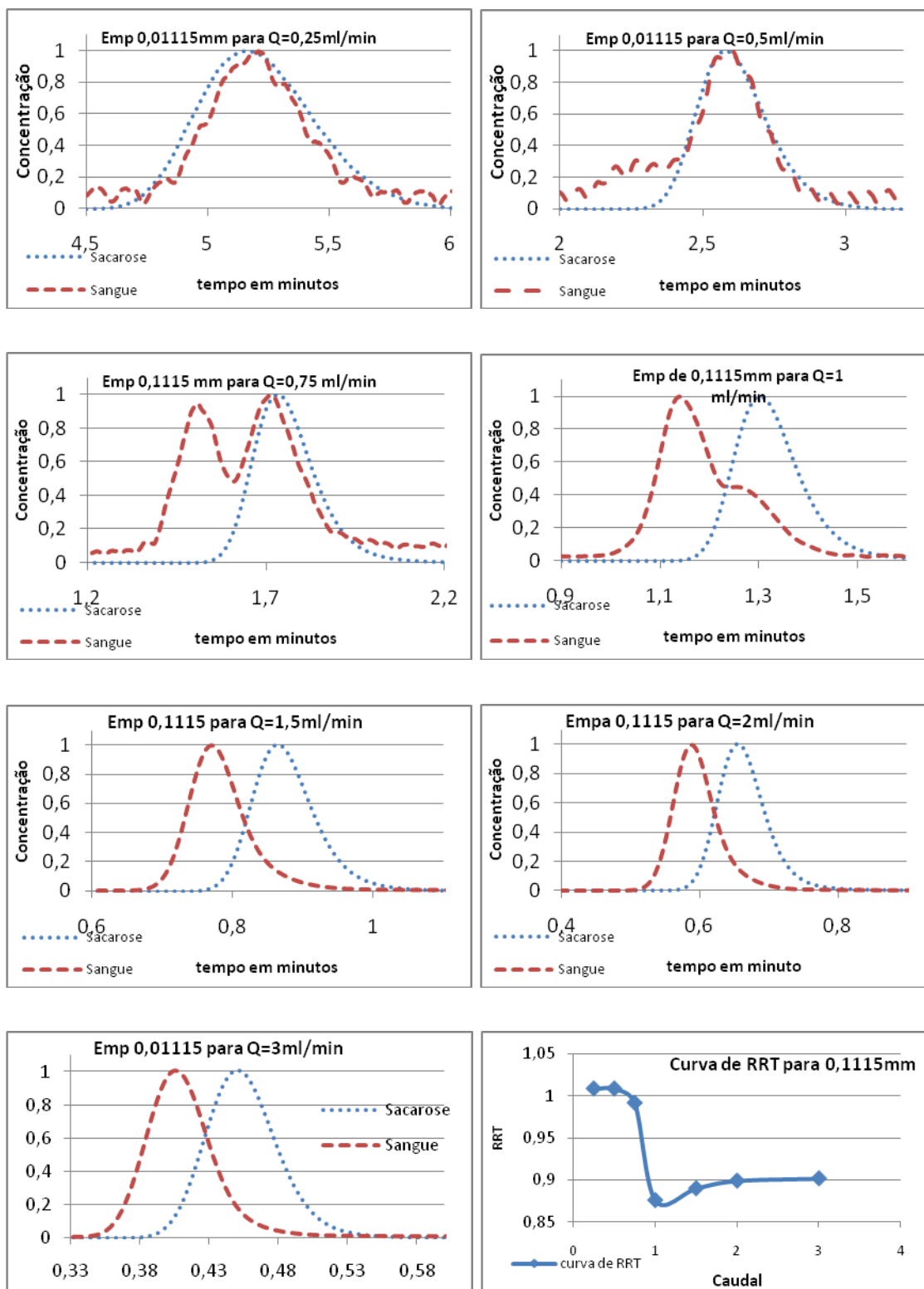


Figura 34 - Cromatogramas para empacotamento 0,1115mm, vários caudais e a curva RRT em função do caudal.

5.2.2 Empacotamento de 0,15 com sacarose e sangue de vaca.

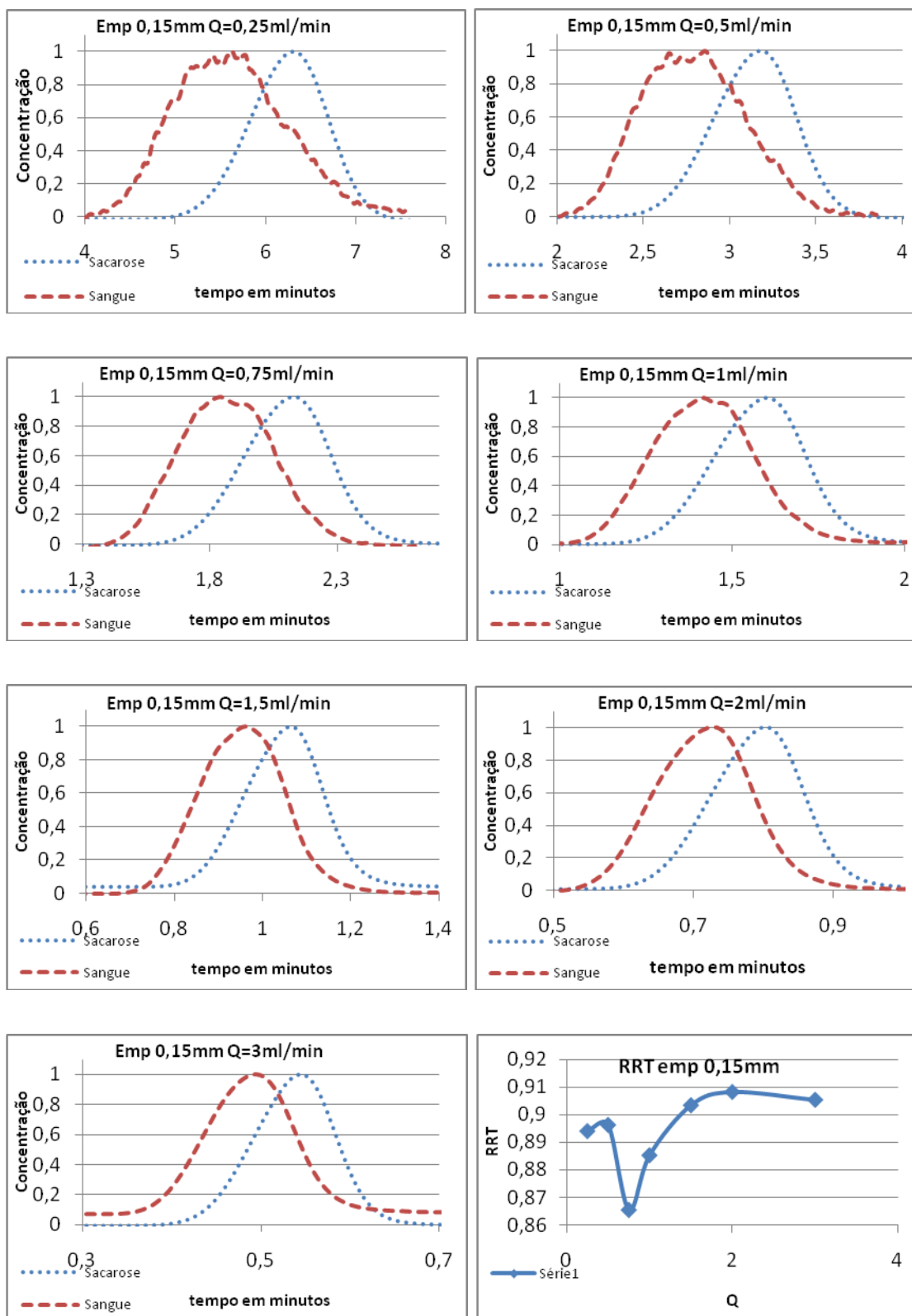


Figura 35 - Cromatogramas para empacotamento 0,15mm, vários caudais e a curva RRT em função dos caudais.

5.2.3 Empacotamento de 0,3375mm com sacarose e sangue de vaca.

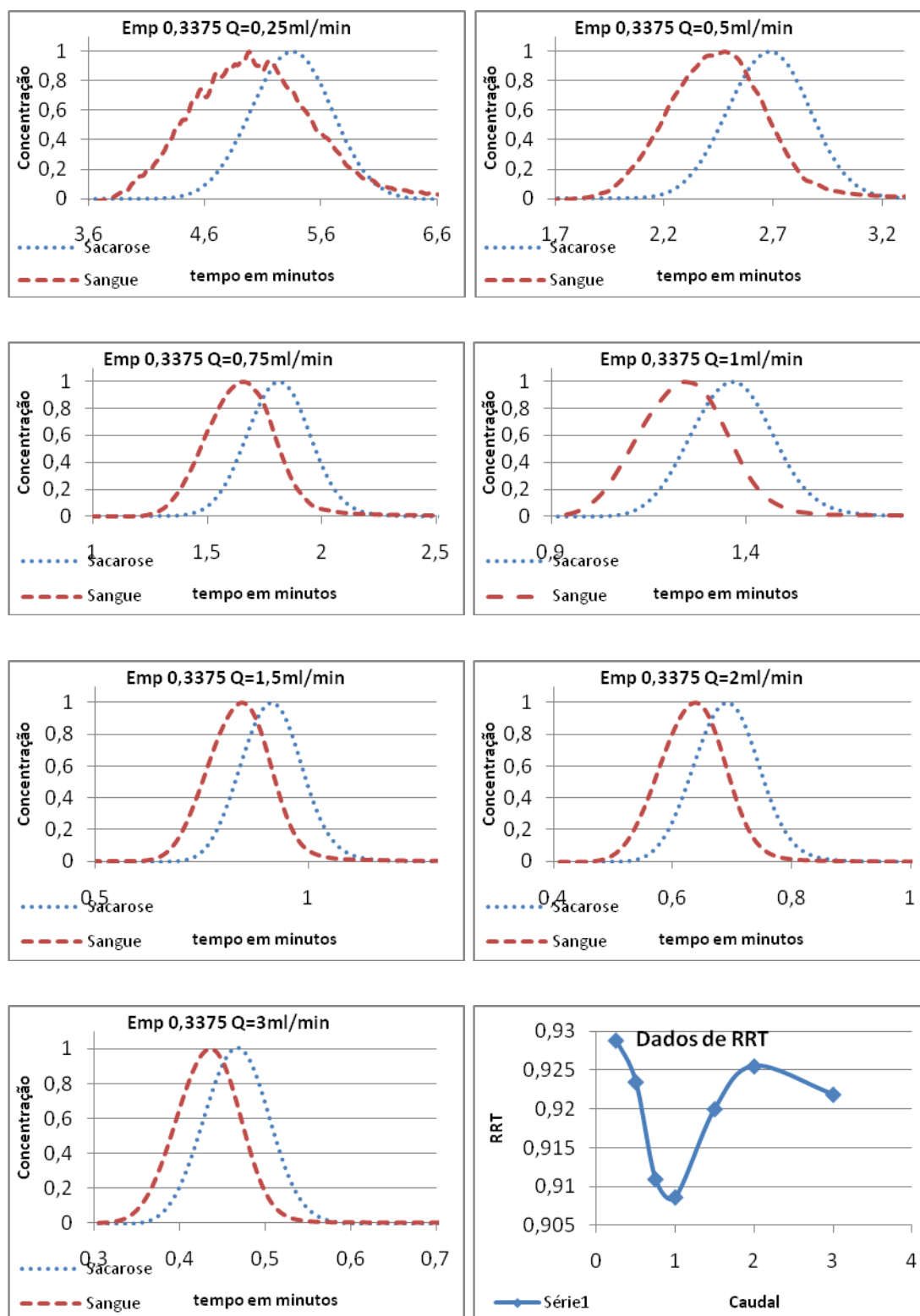


Figura 36 - Cromatogramas para empacotamento 0,3375mm, vários caudais e a curva RRT em função do caudal.

5.2.4 Empacotamento de 0,875mm com sacarose e sangue de vaca.

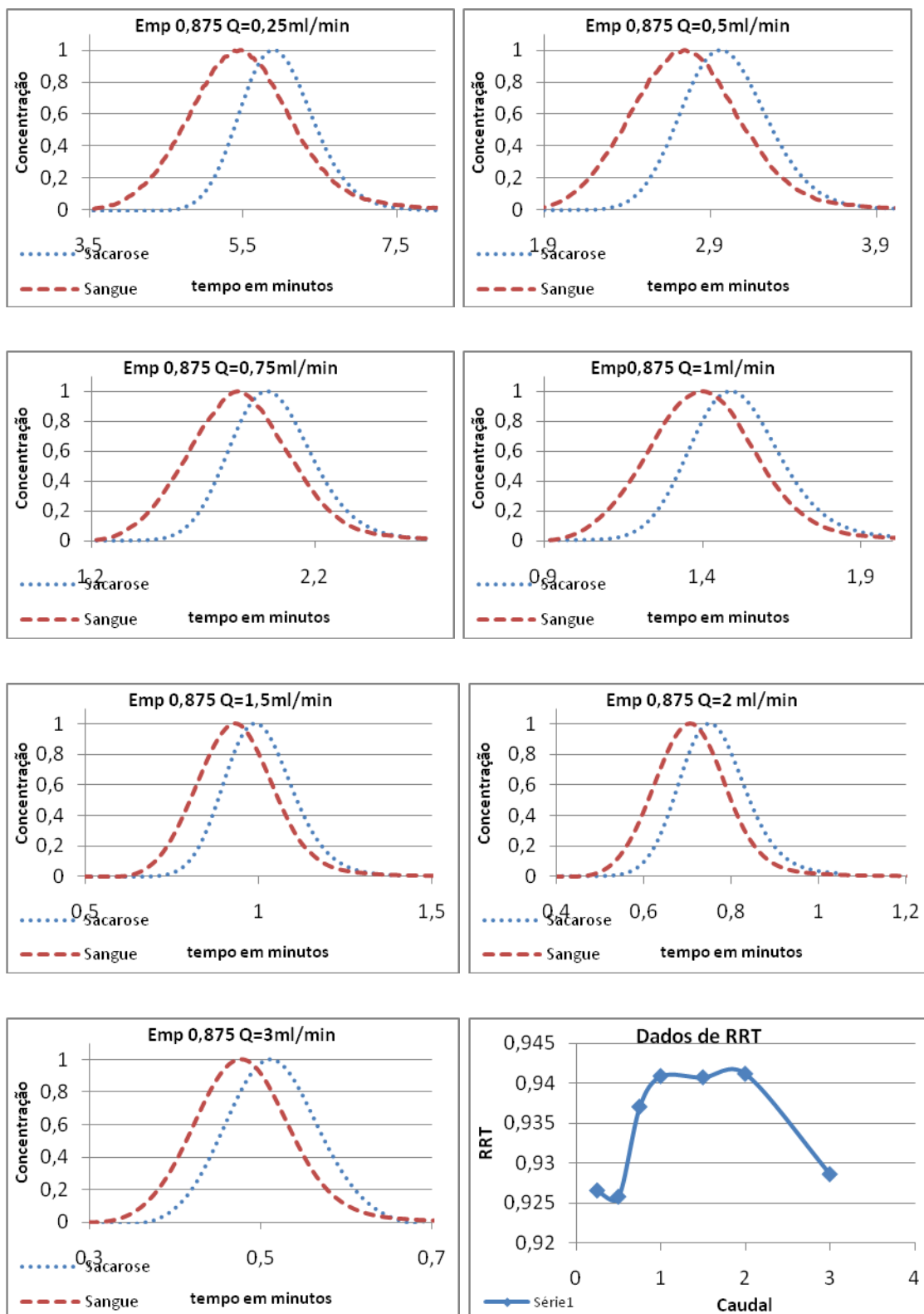


Figura 37 - Cromatogramas para empacotamento 0,875mm, vários caudais e a curva RRT em função do caudal.

5.2.5 Empacotamento de 2,00 mm com sacarose e sangue de vaca.

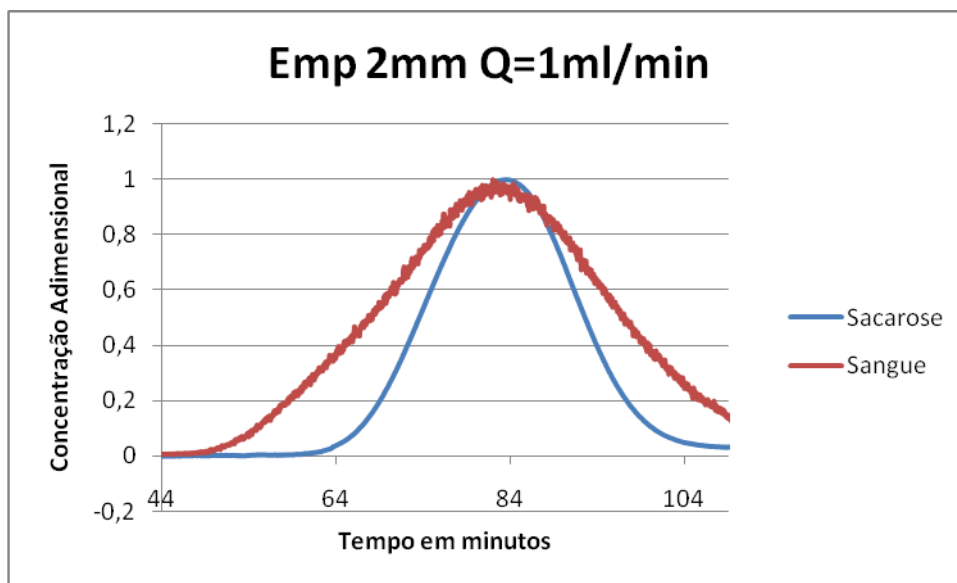


Figura 38 - Experiência do empacotamento de 2mm com Q=1 ml/min, concentração de 1% de GV's de bovino

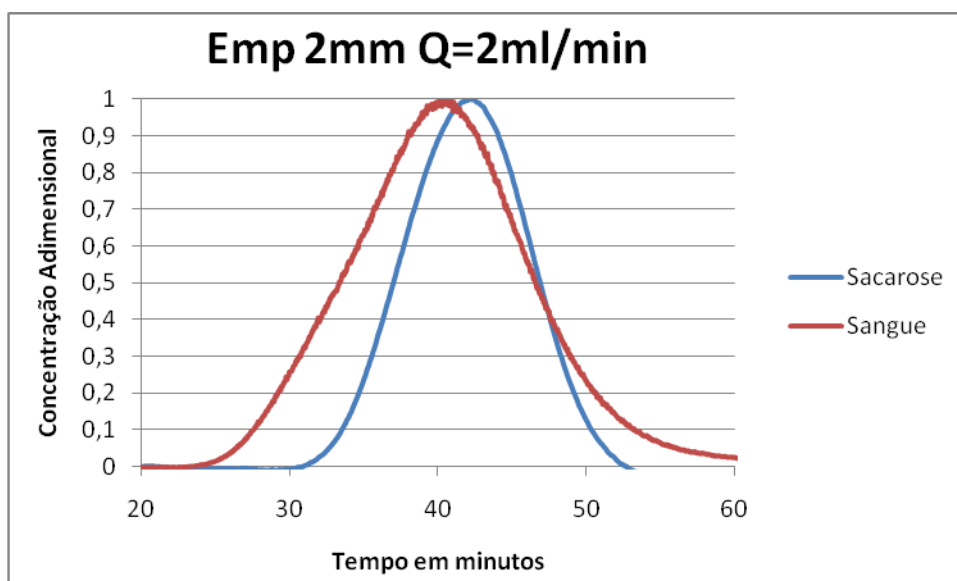


Figura 39 - Experiência do empacotamento de 2mm com Q=2 ml/min, concentração de 1% de GV's de bovino

5.2.6 Discussão dos resultados obtidos com as colunas cromatográficas

Nos trabalhos realizados, assumiu-se que os canais intersticiais podem ser representados por um feixe de capilares cilíndricos com diâmetro médio d_m , dado pela expressão $\frac{2}{3}d_p \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon}$, onde d_p é o diâmetro das partículas e ε a porosidade do empacotamento, assumiu-se que o ε é sempre 0,4 [16].

O RRT é o tempo de retenção relativo entre o tempo de retenção dos glóbulos vermelhos e o tempo de retenção da sacarose, sendo esta última molécula de tamanho infinitesimal e movendo-se à mesma velocidade que fase móvel.

$$RRT = \frac{1}{1+2\lambda - C\lambda^2}$$

Equação 1

Teoricamente os valores de RRT podem ser previstos pela equação 1 se os valores de λ e C forem conhecidos, o que não é o caso deste trabalho realizado com glóbulos vermelhos. O valor de λ representa o quociente entre o diâmetro efetivo dos glóbulos vermelhos e o diâmetro dos poros. O valor deste diâmetro efetivo dos GV's será afetado pela deformação dos mesmos durante o escoamento assim como possíveis orientações preferenciais que os GV's adquiram durante o seu escoamento, tornando isto impossível saber à partida qual o seu valor. Quanto ao diâmetro dos poros ele pode ser determinado por $\frac{2}{3}d_p \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon}$. A porosidade ε assume valores próximos de 0.4 e d_p (o diâmetro das esferas no interior da coluna) é conhecido. Na equação 3 a constante C pode variar entre 1 e 5 [16].

Na Figura (40) esquematiza-se o comportamento do RRT para diferentes valores de λ , considerando $C = 2$, $C = 2,7$ (valores típicos para polímeros flexíveis) e $C=4,89$ (valor típico para partículas sólidas esféricas). Presumivelmente o valor de C para os GV's estará entre estes dois últimos casos referidos pois os GV's não são rígidos mas serão menos flexíveis que um polímero [15,16].

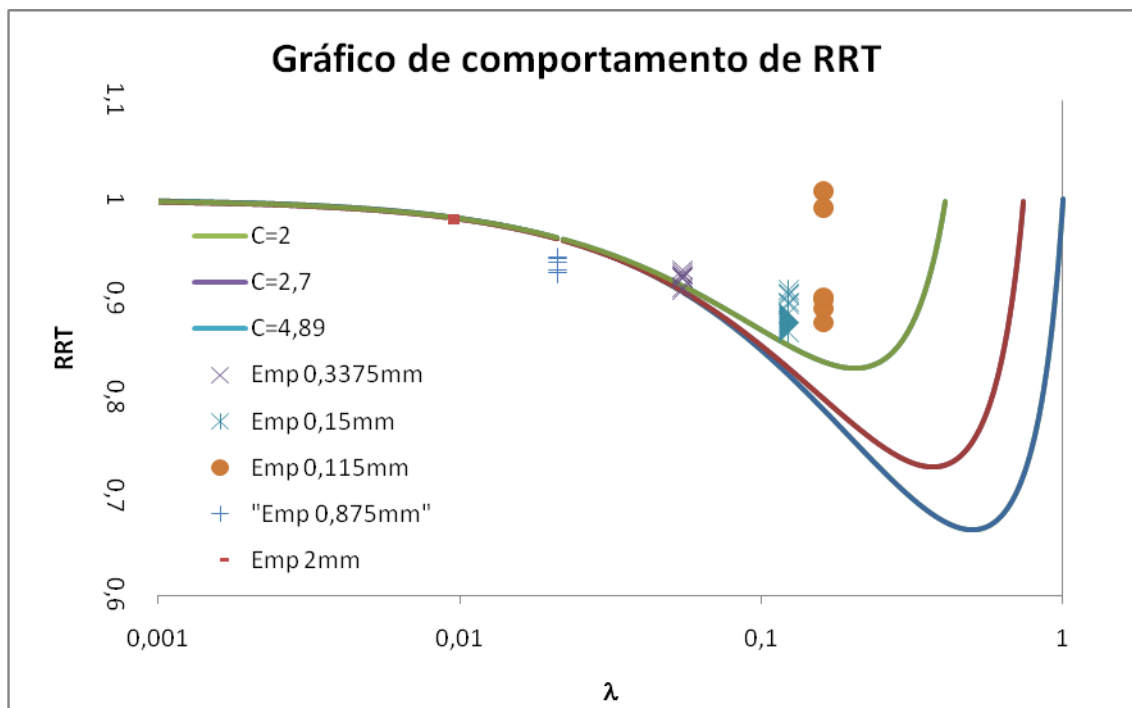


Figura 40- Gráfico do comportamento de RRT

Este gráfico foi construído para se ter uma percepção do comportamento do RRT em função do λ e como este varia através dos vários C's. As curvas foram calculadas pela equação 1 em que se fez variar o λ de 0,001 até 1 para os vários C's e obtiveram-se os respetivos RRT's. Os pontos apresentados no gráfico calcularam-se considerando que o λ era dado pela equação 2.

$$\lambda = \frac{2a}{2R}$$

Equação 2

Em que 2a representa o diâmetro efetivo dos GV's e 2R o diâmetro dos poros ($\frac{2}{3}d_p \frac{\epsilon}{1-\epsilon}$). Na figura 41 considera-se que 2a era dada pelo valor (8,2 μm) determinado por microscopia neste trabalho (GV's em repouso). No caso do empacotamento de 0,115mm alguns dos RRT são ligeiramente superiores a 1 o que significa que os glóbulos vermelhos são retardados pelo empacotamento. OS RRT's são bem descritos pela curva teórica, excetuando os empacotamentos de 0,15mm e 0,1115mm. Com estes últimos empacotamentos obtiveram-se os valores de RRT mais baixos (não levando em conta os RRT obtidos com caudais baixos para o empacotamento de 0,1115mm).

Uma vez que o diâmetro determinado por microscopia é um diâmetro em repouso, calcularam-se os diâmetros efetivos pela equação 1. Recorreu-se a equação 3 para calcular o diâmetro dos poros e a equação de segundo grau (resultante da equação 1) para calcular o diâmetro efetivo; $a\lambda^2 + b\lambda + c = 0$ em que $a = -C \cdot RRT$, $b = 2 \cdot RRT$ e $c = RRT - 1$.

$$\frac{2}{3} d_p \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon}$$

Equação 3

Consideraram-se dois valores de C (2,7 e 4,89) como apresentadas nas tabelas abaixo:

Tabela 7 - Diâmetro efetivo para o empacotamento de 0,1115mm

Caudal	Empacotamento [mm]	RRT	Diâmetro dos poros [mm]	C (constantes)	A	b	C	Λ	Diâmetro efetivo [μ m]
0,25	0,115	1,009	0,051	2,7	-2,723	2,017	0,0085	0,736	37,64
0,25	0,115	1,009	0,051	4,89	-4,932	2,017	0,0085	0,413	21,12
0,5	0,115	1,009	0,051	2,7	-2,723	2,017	0,0085	0,745	38,07
0,5	0,115	1,009	0,051	4,89	-4,932	2,017	0,0085	0,413	21,12
0,75	0,115	0,992	0,051	2,7	-2,677	1,983	-0,0085	0,736	37,64
0,75	0,115	0,992	0,051	4,89	-4,849	1,983	-0,0085	0,405	20,68
1	0,115	0,876	0,051	2,7	-2,364	1,751	-0,1243	0,661	33,80
1	0,115	0,876	0,051	4,89	-4,282	1,751	-0,1243	0,318	16,23
1,5	0,115	0,890	0,051	2,7	-2,403	1,780	-0,1102	0,673	34,38
1,5	0,115	0,890	0,051	4,89	-4,351	1,780	-0,1102	0,333	17,02
2	0,115	0,899	0,051	2,7	-2,427	1,798	-0,1011	0,679	34,73
2	0,115	0,899	0,051	4,89	-4,396	1,798	-0,1011	0,342	17,46
3	0,115	0,902	0,051	2,7	-2,434	1,803	-0,0984	0,681	34,83
3	0,115	0,902	0,051	4,89	-4,409	1,803	-0,0984	0,344	17,59

Tabela 8 - Diâmetro efetivo para o empacotamento de 0,15mm

Caudal	Empacotamento [mm]	RRT	Diâmetro dos poros [mm]	C (constantes)	A	b	C	Λ	Diâmetro efetivo [μ m]
0,25	0,15	0,894	0,067	2,7	-2,414	1,788	-0,106	0,676	45,05
0,25	0,15	0,894	0,067	4,89	-4,372	1,788	-0,106	0,337	22,47
0,5	0,15	0,896	0,067	2,7	-2,420	1,793	-0,104	0,678	45,17
0,5	0,15	0,896	0,067	4,89	-4,383	1,793	-0,104	0,339	22,62
0,75	0,15	0,866	0,067	2,7	-2,337	1,731	-0,134	0,653	43,50
0,75	0,15	0,866	0,067	4,89	-4,232	1,731	-0,134	0,305	20,31
1	0,15	0,885	0,067	2,7	-2,390	1,771	-0,115	0,669	44,60
1	0,15	0,885	0,067	4,89	-4,329	1,771	-0,115	0,328	21,89
1,5	0,15	0,903	0,067	2,7	-2,439	1,807	-0,097	0,683	45,52
1,5	0,15	0,903	0,067	4,89	-4,418	1,807	-0,097	0,346	23,05
2	0,15	0,908	0,067	2,7	-2,452	1,817	-0,092	0,686	45,75
2	0,15	0,908	0,067	4,89	-4,441	1,817	-0,092	0,350	23,33
3	0,15	0,905	0,067	2,7	-2,445	1,811	-0,095	0,684	45,61
3	0,15	0,905	0,067	4,89	-4,427	1,811	-0,095	0,348	23,17

Tabela 9 - Diâmetro efetivo para o empacotamento de 0,3375mm

Caudal	Empacotamento [mm]	RRT	Diâmetro dos poros [mm]	C (constantes)	a	b	C	Λ	Diâmetro efetivo [μ m]
0,25	0,3375	0,929	0,1500	2,7	-2,508	1,858	-0,0711	0,041	6,08
0,25	0,3375	0,929	0,1500	4,89	-4,542	1,858	-0,0711	0,043	6,41
0,5	0,3375	0,923	0,1500	2,7	-2,493	1,847	-0,0765	0,044	6,61
0,5	0,3375	0,923	0,1500	4,89	-4,516	1,847	-0,0765	0,047	7,02
0,75	0,3375	0,911	0,1500	2,7	-2,460	1,822	-0,0891	0,053	7,89
0,75	0,3375	0,911	0,1500	4,89	-4,454	1,822	-0,0891	0,057	8,52
1	0,3375	0,909	0,1500	2,7	-2,453	1,817	-0,0914	0,054	8,14
1	0,3375	0,909	0,1500	4,89	-4,443	1,817	-0,0914	0,059	8,81
1,5	0,3375	0,920	0,1500	2,7	-2,484	1,840	-0,0800	0,046	6,96
1,5	0,3375	0,920	0,1500	4,89	-4,499	1,840	-0,0800	0,049	7,42
2	0,3375	0,926	0,1500	2,7	-2,499	1,851	-0,0745	0,043	6,40
2	0,3375	0,926	0,1500	4,89	-4,526	1,851	-0,0745	0,045	6,78
3	0,3375	0,922	0,1500	2,7	-2,489	1,844	-0,0781	0,045	6,77
3	0,3375	0,922	0,1500	4,89	-4,508	1,844	-0,0781	0,048	7,20

Tabela 10- Diâmetro efetivo para empacotamento de 0,875 mm

Caudal	Empacotamento [mm]	RRT	Diâmetro dos poros [mm]	C (constantes)	A	b	C	Λ	Diâmetro efetivo [μ m]
0,25	0,875	0,927	0,389	2,7	-2,502	1,853	-0,073	0,042	16,347
0,25	0,875	0,927	0,389	4,89	-4,531	1,853	-0,073	0,044	17,302
0,5	0,875	0,926	0,389	2,7	-2,500	1,851	-0,074	0,043	16,548
0,5	0,875	0,926	0,389	4,89	-4,527	1,851	-0,074	0,045	17,529
0,75	0,875	0,937	0,389	2,7	-2,530	1,874	-0,063	0,035	13,719
0,75	0,875	0,937	0,389	4,89	-4,582	1,874	-0,063	0,037	14,362
1	0,875	0,941	0,389	2,7	-2,540	1,882	-0,059	0,033	12,784
1	0,875	0,941	0,389	4,89	-4,601	1,882	-0,059	0,034	13,334
1,5	0,875	0,941	0,389	2,7	-2,540	1,881	-0,059	0,033	12,819
1,5	0,875	0,941	0,389	4,89	-4,600	1,881	-0,059	0,034	13,373
2	0,875	0,941	0,389	2,7	-2,541	1,882	-0,059	0,033	12,714
2	0,875	0,941	0,389	4,89	-4,602	1,882	-0,059	0,034	13,258
3	0,875	0,929	0,389	2,7	-2,507	1,857	-0,071	0,041	15,827
3	0,875	0,929	0,389	4,89	-4,541	1,857	-0,071	0,043	16,714

Tabela 11 - Diâmetro efetivo para empacotamento de 2 mm

Caudal	Empacotamento [mm]	RRT	Diâmetro dos poros [mm]	C (constantes)	a	b	C	Λ	Diâmetro efetivo [μ m]
1	2	0,982	0,8889	2,7	-2,652	1,965	-0,018	0,009	8,128
1	2	0,982	0,8889	4,89	-4,803	1,965	-0,018	0,009	8,214
2	2	0,977	0,8889	2,7	-2,638	1,954	-0,023	0,012	10,684
2	2	0,977	0,8889	4,89	-4,777	1,954	-0,023	0,012	10,833

No caso dos empacotamentos de 0,1115mm e 0,15mm podemos ver que o diâmetro efetivo se afasta significativamente de 8,214 μ m (determinado experimentalmente). Esta discrepância pode ser devido a deformação dos glóbulos vermelhos durante a passagem por estes empacotamentos, sendo obrigados a

passar por regiões bastante estreitas (como a região de pontos de contacto entre esferas) e a alongarem-se para poderem fluir.

Nos empacotamentos de 0,3375, 0,875 e 2 mm os diâmetros efetivos aproximam-se do valor experimental já que os poros são maiores e permitem uma passagem mais fácil dos glóbulos vermelhos, com um grau de deformação menor.

5.3 Microcanais

Com a técnica de litografia suave, foi possível fabricar microcanais em (PDMS) com geometrias semelhantes às observadas no interior das colunas cromatográficas [5].

Aguardou-se algum tempo até que os capilares estivessem prontos para analisados. Através de um microscópio ligado a uma camera de alta velocidade e uma bomba de seringa foi possível observar o escoamento dos GV's no interior dos microcanais.



Figura 41 – Sistema de microscopia/camara de alta velocidade alojado a bomba de seringa

Com este sistema foi possível também fotografar os microcanais e assim aferir a qualidade dos mesmos.

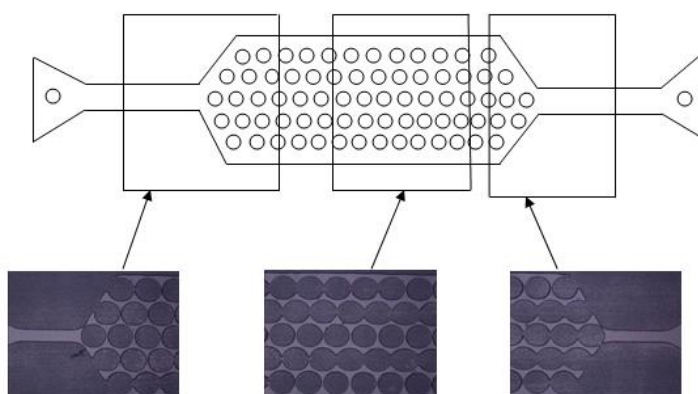


Figura 42 - Microcanal com diâmetro de 300 μm

Nos microcanais contendo cilindros com diâmetro 300 μm (acima) foi possível verificar a junção de vários cilindros o que inviabilizou experiências subsequentes.

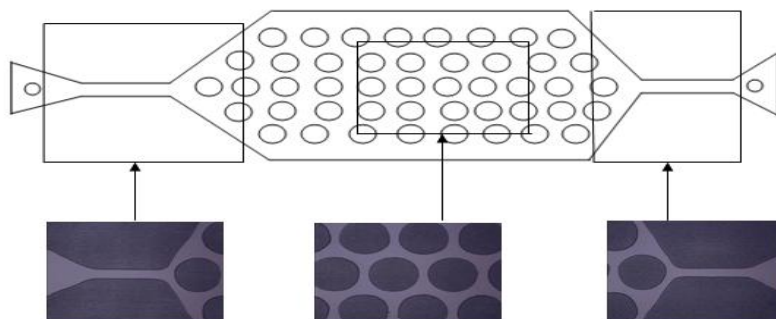


Figura 43 - Microcanal com diâmetro de 600 μm

Estes microcanais (600 μm) ficaram bem delineados e logo com estes foi possível prosseguir as experiências.

Através da bomba de seringa foi possível impor um caudal específico e assim ver se a espessura da camada livre de células variava com o caudal e também com a dimensão dos cilindros.

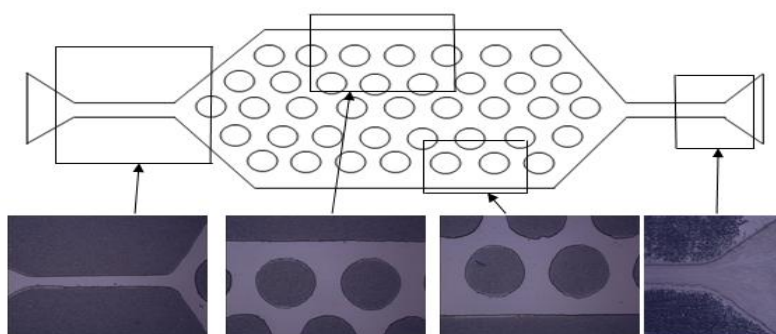


Figura 44 - Microcanal com diâmetro de 800 μm

Os microcanais contendo cilindros com 800 μm também eram de boa qualidade e logo pudemos prosseguir experiências de escoamento com os microcapilares de 600 e 800 μm . Pudemos então começar a análise para ver se existia ou não a formação da camada livre de células. Usaram-se caudais de 5,10 e 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ para estudar a influência do caudal numa eventual formação de camada livre de células.

5.5 Camada livre de células

Para o estudo da camada livre de células a referência utilizada no image j para determinar a sua espessura foi o diâmetro dos cilindros (600 μm na figura 45)

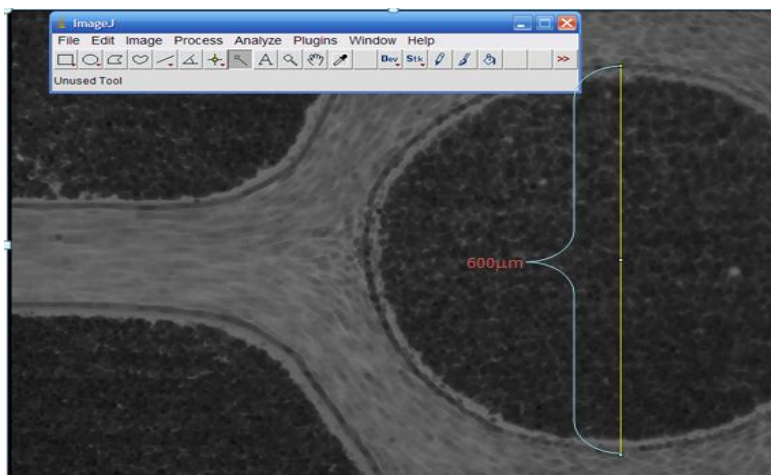


Figura 45 – Referência no microcanal com cilindros de 600 μm de diâmetro

Na microcirculação há formação de uma camada livre de células junto a parede dos capilares sendo este efeito um redutor de atrito entre as células sanguíneas e células endoteliais da parede dos vasos sanguíneos. Para estudar a camada livre de células escolheram-se dez locais estratégicos para poder tirar conclusões no microcanal de 600 μm .

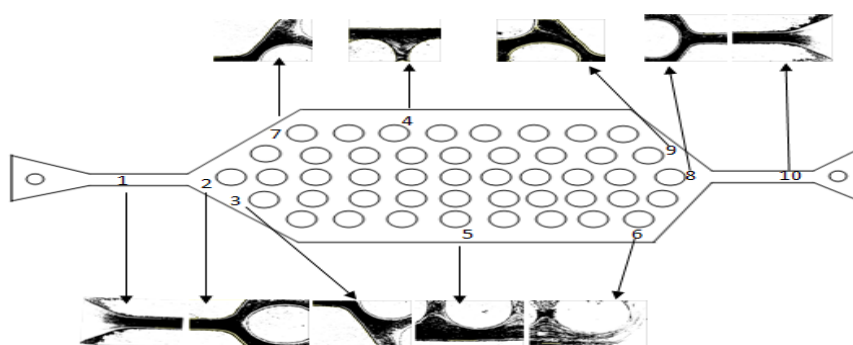





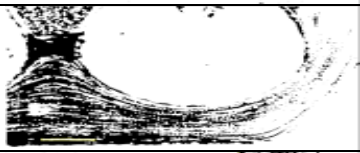






Figura 46 - Os pontos de pesquisa no microcanal de 600 μm

Como anteriormente foi dito utilizamos dois microcanais diferentes e também três caudais diferentes (5, 10 e 20 μm)

Tabela 12 - Espessura da camada livre de células para um caudal de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$

Posição	Numero	Fotografia Ampliada	Espessura em μm
Entrada	1		7,166667
Primeiro círculo	2		5,052727
Parede lateral inicial baixa	3		9,517059
Parede de cima	4		10,22661
Parede em baixo	5		3,65125
Parede em baixo Fim	6		2,843333
Parede lateral inicial cima	7		8,735425
Último círculo	8		1,22
Parede em cima fim	9		10,35786
Fim	10		4,87

Estes dez pontos vão ser mantidos variando apenas os caudais, e assim retirar ilações se existe ou não variação na camada livre de células e se esta aumenta ou diminui com o aumento do caudal.

Tabela 13 - Espessura da camada livre de células para um caudal de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$

Posição	Numero	Espessura em μm
Entrada	1	7,656182
Primeiro circulo	2	6,635
Parede lateral inicial baixa	3	10,05673
Parede de cima	4	11,57278
Parede em baixo	5	4,78653
Parede em baixo Fim	6	3,562384
Parede lateral inicial cimo	7	9,61378
Último círculo	8	1,9738
Parede em cima fim	9	10,89724
Fim	10	5,287234

Verificou-se um alargamento da camada livre de células com o aumento do caudal de 5 para 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, mantendo todo o resto. E não sendo perceptível a olho nu, apenas se apresentam valores e não as imagens.

Tabela 14 - Espessura da camada livre de células para um caudal de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$

Posição	Numero	Espessura em μm
Entrada	1	8,035479
Primeiro circulo	2	6,906542
Parede lateral inicial baixa	3	10,95673
Parede de cima	4	12,27874
Parede em baixo	5	5,382635
Parede em baixo Fim	6	3,989579
Parede lateral inicial cimo	7	10,13584
Último círculo	8	3,127633
Parede em cima fim	9	12,23987
Fim	10	6,087245

As tabelas 12,13 e 14 sugerem que, na gama de caudais estudada, a espessura da camada livre de células aumenta com o caudal.

Na figura 47 apresenta-se a referência para determinação da espessura da camada livre de células no caso em que os microcanais continham cilindros com diâmetro 800 μm .

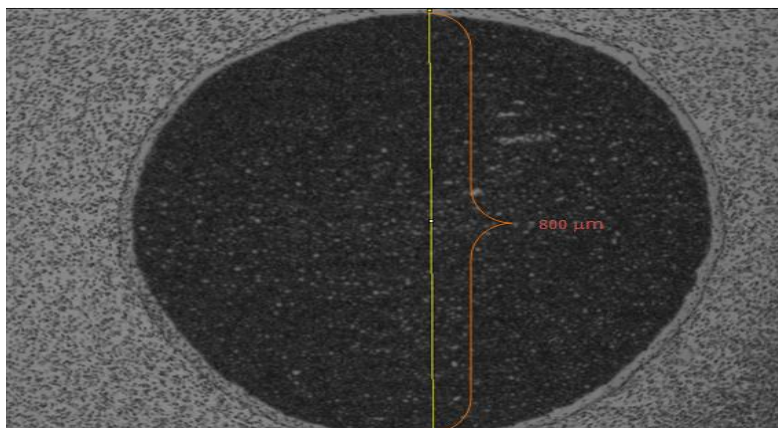


Figura 47 - Referência no microcanal de 800 μm

Na figura 48. Apresentam-se as regiões estudadas ao caso do microcanal com cilindros de 800 μm .

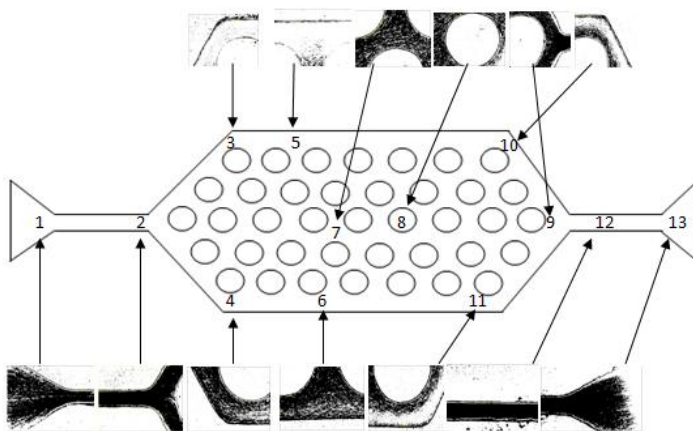





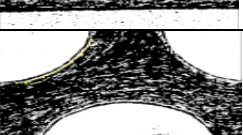









Figura 48 - Partes do estudo do microcanal de 800 μm

Os caudais utilizados foram os mesmos que no caso anterior (5, 10, 20 $\mu\text{l}/\text{min}$).

Tabela 15- Espessura da camada livre de células para um caudal de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ para 800 μm

Posição	Numero	Fotografias	Espessura em μm
Início	1		12,75
Entrada	2		7,524
Parede lateral inicial cima	3		4,624545
Parede lateral inicial baixo	4		2,68
Parede do cimo meio	5		7,648571
Parede de baixo meio	6		17,64615
Meio entre canais	7		46,47005
Círculo do meio	8		48,67425
Último círculo	9		20,73214
Parede de cima fim	10		8,556
Parede de baixo fim	11		6,02
Saída	12		7,645217
Saída final	13		7,613129

Estes treze pontos vão ser mantidos variando apenas os caudais, e assim retirar ilações se existe ou não variação na camada livre de células e se esta aumenta ou diminui com o aumento do caudal.

Tabela 16 - Espessura da camada livre de células para um caudal de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ para 800 μm

Posição	Numero	Espessura em μm
Início	1	13,09938
Entrada	2	7,997343
Parede lateral inicial cima	3	6,082196
Parede lateral inicial baixa	4	4,875235
Parede do cimo meio	5	8,089215
Parede de baixo meio	6	20,99714
Meio entre canais	7	50,98615
Círculo do meio	8	53,98762
Último círculo	9	24,90128
Parede de cima fim	10	9,98713
Parede de baixo fim	11	8,786217
Saída	12	9,986129
Saída final	13	8,921521

Verifica-se que nos mesmos pontos e no mesmo microcanal a espessura da camada livre de células aumenta ligeiramente com o aumento do caudal de 5 para 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Tabela 17 - Espessura da camada livre de células para um caudal de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ para 800 μm

Posição	Numero	Espessura em μm
Início	1	15,67512
Entrada	2	10,0824
Parede lateral inicial cima	3	7,982179
Parede lateral inicial baixo	4	6,009217
Parede do cimo meio	5	10,00922
Parede de baixo meio	6	23,15412
Meio entre canais	7	52,07081
Círculo do meio	8	55,87762
Ultimo circulo	9	26,87528
Parede de cima fim	10	11,87522
Parede de baixo fim	11	9,99722
Saída	12	10,87186
Saída final	13	9,651223

Neste caso podemos verificar que a camada livre de células aumenta também com o caudal. Os resultados obtidos sugerem que a espessura da camada livre de células é maior no caso do microcanal com cilindros de 800 μm .

Este facto pode observar-se claramente na figura 49.

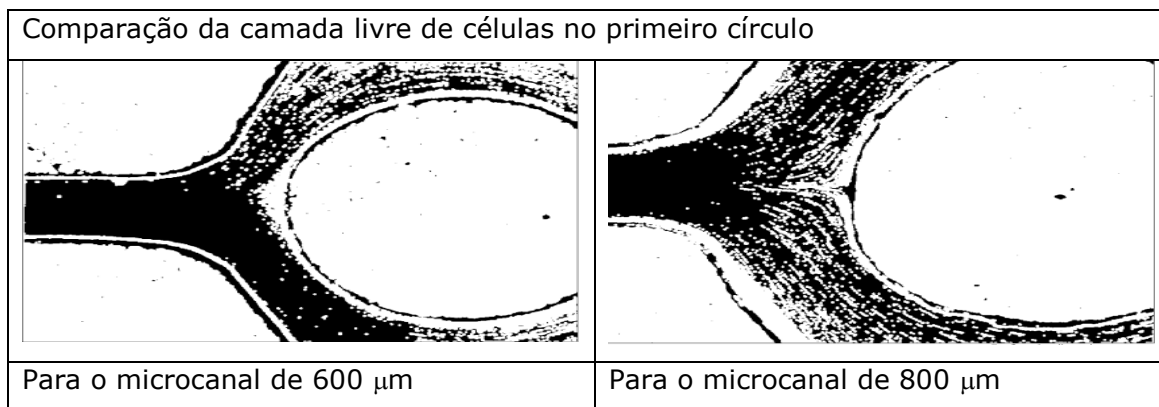


Figura 49 - Comparação da camada livre de células no primeiro círculo

Para além da formação da camada livre de células (que aumenta a velocidade dos GV's) foram detetadas zonas de recirculação/estagnação entre os cilindros (ver figura 50) que provoca um efeito contrário a camada livre de células no que diz respeito a velocidade destas.

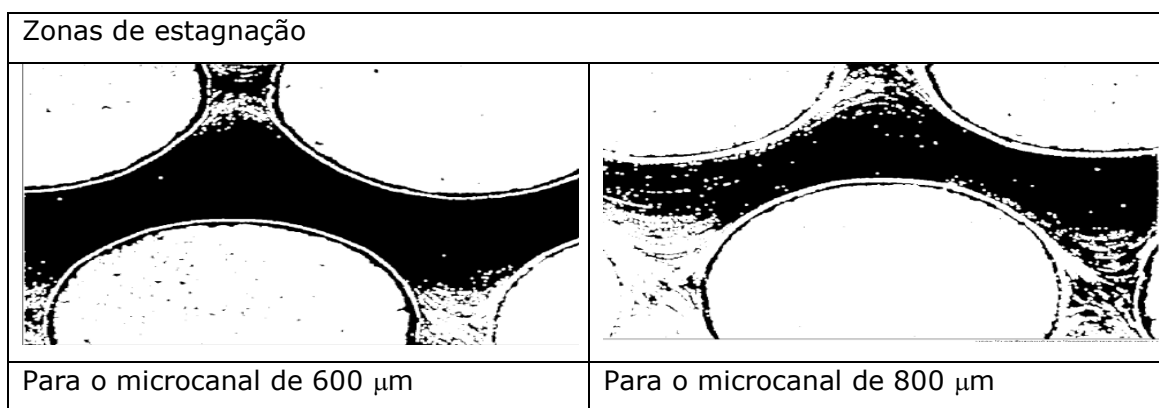


Figura 50 - Comparação de zonas de estagnação num ponto do meio

6- Experiências futuras

Futuramente este trabalho poderá ser desenvolvido para investigação de certos fenómenos que ficaram por desvendar devido a falta de tempo.

Usar outros empacotamentos, com esferas mais pequenas do que 0,1115mm, para assim estudar os tempos de retenção com microesferas.

Verificar e estudar o fenómeno que acontece no empacotamento de 0,1115mm, para caudais inferiores a 1 ml/min.

Usar um dispositivo com câmara de filmar para se acompanhar o movimento do sangue em empacotamentos com colunas transparentes e assim seguirem o percurso da solução de soro com glóbulos vermelhos.

Encaminhar este trabalho para tratamento de certas doenças, tais como leucemias ou outras que estejam relacionadas com as células sanguíneas.

Por fim poderá manipular-se os valores da camada livre de células e o refluxo nos microcanais e tentar encontrar um formula para calcular este fenómeno.

7- Conclusão

Neste trabalho foram usados empacotamentos de esferas de vidro para estudar as velocidades individuais de migração dos glóbulos vermelhos de bovino.

Calculou-se por microscopia a dimensão média das células sanguíneas de bovino (8,214 μm) e verificou-se que o valor determinado neste trabalho era próximo do valor da literatura.

Para garantir que o hematócrito não possuísse substâncias indesejadas, como por exemplo proteínas, foram realizadas entre duas a quatro lavagens do mesmo. Verificou-se também que o número de lavagens do hematócrito não teve qualquer influência no tempo de retenção e decidiu-se assim usar duas lavagens.

Nas experiências cromatográficas os valores de RRT foram descritos pela teoria para os empacotamentos de 2mm, 0,875mm e 0,375mm. Os valores de RRT para os empacotamentos de 0,15mm e 0,1115mm foram superiores aos teóricos. Nos primeiros empacotamentos o diâmetro efetivo dos GV's aproximou-se do valor determinado por microscopia (8,2 μm) enquanto nos últimos empacotamentos o diâmetro efetivo era substancialmente superior a 8,2 μm . Esta diferença obter-se-á pela deformação dos GV's durante o fluxo através dos últimos empacotamentos.

As experiências com os microcanais permitiram concluir que existe formação de camada livre de células em várias regiões dos mesmos e que existem zonas de estagnação dos GV's entre os cilindros incluídos nos microcanais.

As velocidades a que os GV's migram através dos empacotamentos devem-se a diferentes efeitos: Cromatografia hidrodinâmica, formação da camada livre de células, retardamento para regiões estreitas no empacotamento e zonas de estagnação/recirculação.

Enquanto os dois primeiros efeitos conduzem a um aumento da velocidade dos GV's, o contrário acontece nos dois últimos casos.

8- Bibliografia

- [1] Cristina Teixeira, "sebenta de Anatomo-Histo-Fisiologia I", IPB, 2010.
- [2] Sousa, Maria Helena L.; Elias, Decio O.; "Fundamentos da Circulação Excorpórea". 2ª Edição. Rio de Janeiro: Centro editorial Alfa Rio, 2006.
- [3] Robbins e Cotran - "Patologia - Bases Patológicas das Doenças". 7ª Edição.
- [4] Mota, Manuel; Teixeira, José; Yelshin, Alexander; Cortez, Susana; "Novas Técnicas Cromatográficas". Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho. Braga.
- [12] João A. Martins e Silva, Fatores intervenientes não Controlo da microcirculação e da Oxigenação tecidual. Instituto de Química Fisiológica. Faculdade Medicina de Lisboa.
- [14] Dellmann - Brown; Histologia Veterinária. Acribia Zaragoza Editorial (Espana), 1980. Soft Cover. ISBN:8420004421
- [15] Tijssen R, Bos J, Kreveld ME. Hydrodynamic Chromatography in Open Microcapillary Tubes. Anal. Chem. 1986; 58:3036-3034.
- [16] Ana Couto, Lúcia Teixeira, Vladimir Leble, Rui Lima, António Ribeiro, Ricardo Dias (2011). "Flow of red blood cells in capillary networks", Japan-Portugal Nano-BME symposium, Porto and Bragança, 35-38.
- [17] Nash G., Meiselman H., (1983) Red cell and ghost viscoelasticity. Effects of hemoglobin concentration and in vivo aging. Biophysical Journal 43: 63-73.
- [18] Garcia, V., et al. (2010) Flow of physiological fluids in microchannels: the sedimentation effect. 6th World Congress of Biomechanics, Singapore, 2010, 1071-1074.
- [19] Bianca Pires (2012). "Conceção de um dispositivo de microcromatografia hidrodinâmica para separação de células sanguíneas e visualização do mecanismo de separação", Projeto em tecnologia Biomédica IPB.

9- Webografia

[5] Sistema circulatório.

www.ajudaalunos.com/pptcn/sistema_circulatorio.ppt, acessido a 29-12-2011

[6]http://lqes.iqm.unicamp.br/canal_cientifico/pontos_vista/pontos_vista_di_vulgacao94-1.html, acessido a 29-12-2011

[7] <http://patofisio.wordpress.com/2010/04/19/leucocitos>, acessido a 29-12-2011

[8] <http://crentinho.wordpress.com/2009/>, acessido a 29-12-2011

[9] <http://www.infoescola.com/sangue/plaquetas>, acessido a 29-12-2011

[10] Pequena e microcirculação. Universidade Luterana do Brasil.

<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABMhUAJ/pequena-microcirculacao>, acessido a 4-01-2012

[11] Microcirculação.

<http://www.slideshare.net/delanievov/fisiologia-da-microcirculao>, acessido a 12-01-2012

[13] <http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/hematocrito.htm>, acessido a 12-01-2012

10 Anexos

10.1 Diâmetros médios GV's de bovinos

GV's	X [μm]	Y [μm]	Média	GV's	x [μm]	y [μm]	Média	GV's	x [μm]	y [μm]	média
1	8,045	8,012	8,0285	34	8,716	8,761	8,7385	67	7,643	7,811	7,727
2	8,07	8,075	8,0725	35	4,325	8,495	6,41	68	6,034	6,045	6,0395
3	8,196	8,196	8,196	36	4,266	4,227	4,2465	69	12,035	12,282	12,1585
4	8,124	8,056	8,09	37	6,284	6,121	6,2025	70	12,361	12,149	12,255
5	8,279	8,257	8,268	38	6,368	6,189	6,2785	71	11,149	11,384	11,2665
6	7,235	7,212	7,2235	39	9,725	10,602	10,1635	72	7,259	7,382	7,3205
7	7,944	8	7,972	40	9,793	9,658	9,7255	73	8,45	8,148	8,299
8	7,978	7,978	7,978	41	10,059	10,293	10,176	74	13,175	13,299	13,237
9	8,347	8,296	8,3215	42	10,182	10,037	10,1095	75	13,243	13,142	13,1925
10	8,347	8,263	8,305	43	11,521	10,343	10,932	76	13,948	13,915	13,9315
11	8,263	8,23	8,2465	44	11,689	11,343	11,516	77	13,747	12,959	13,353
12	8,096	8,045	8,0705	45	6,135	6,112	6,1235	78	11,154	13,077	12,1155
13	8,257	8,19	8,2235	46	6,18	6,079	6,1295	79	11,065	13,143	12,104
14	8,392	8,346	8,369	47	9,454	9,454	9,454	80	13,98	13,768	13,874
15	8,034	8,034	8,034	48	10,432	10,387	10,4095	81	13,757	13,745	13,751
16	8,079	8,034	8,0565	49	6,359	6,755	6,557	82	11,634	11,535	11,5845
17	7,944	7,944	7,944	50	6,408	6,789	6,5985	83	11,49	11,5	11,495
18	7,977	7,844	7,9105	51	4,308	3,978	4,143	84	9,846	9,769	9,8075
19	8,19	8,168	8,179	52	4,308	4,927	4,6175	85	9,712	9,746	9,729
20	8,325	8,235	8,28	53	5,33	4,884	5,107	86	9,864	9,652	9,758
21	8,011	8,056	8,0335	54	4,671	4,833	4,752	87	10,065	10,808	10,4365
22	8,034	8,034	8,034	55	5,849	5,894	5,8715	88	8,651	9,573	9,112
23	8,034	7,878	7,956	56	5,866	5,861	5,8635	89	8,785	7,595	8,19
24	8,011	4,235	6,123	57	3,039	3,849	3,444	90	9,44	9,137	9,2885
25	7,99	7,878	7,934	58	3,286	4,195	3,7405	91	12,249	12,373	12,311
26	8,101	4,077	6,089	59	4,956	4,369	4,6625	92	9,069	9,025	9,047
27	8,235	8,19	8,2125	60	4,067	4,28	4,1735	93	8,94	9,153	9,0465
28	8,168	3,967	6,0675	61	3,755	3,699	3,727	94	6,131	6,136	6,1335
29	8,28	8,146	8,213	62	3,799	3,788	3,7935	95	11,17	11,13	11,15
30	8,196	8,095	8,1455	63	3,068	4,989	4,0285	96	9,13	10,304	9,717
31	8,011	7,978	7,9945	64	6,269	6,81	6,5395	97	6,159	5,516	5,8375
32	7,91	7,81	7,86	65	7,81	7,732	7,771	98	8,516	9,582	9,049
33	8,762	8,727	8,7445	66	7,654	7,811	7,7325	99	4,382	4,889	4,6355
100	3,342	3,639	3,4905								

Média Total 8,21356

10.2 Cálculo da porosidade

$$m_{\text{esferas}} = 355,0\text{g}; \quad d_{\text{esferas}} = 2,5 \text{ g/cm}^3; \quad m_{\text{esferas}}/d_{\text{esferas}} = 355,0/2,5$$

$$V_{\text{esferas}} = 142 \text{ cm}^3; \quad V_{\text{poros}} = V_{\text{coluna}} - V_{\text{esferas}}; \quad V_{\text{coluna}} = A_{\text{base}} * h$$

$$V_{\text{coluna}} = \pi * r^2 * 47,7; \quad V_{\text{coluna}} = 234.147 \text{ cm}^3$$

$$V_{\text{poros}} = 92,1468 \text{ cm}^3; \quad \epsilon = 0,393543$$