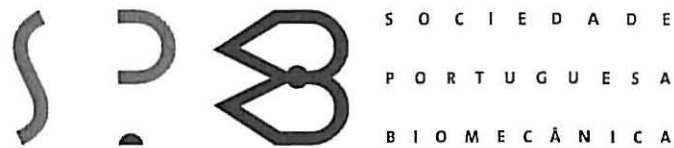


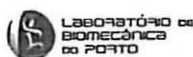
ATAS DO
5º CONGRESSO NACIONAL DE BIOMECÂNICA
*PROCEEDINGS OF THE
5TH PORTUGUESE CONGRESS ON BIOMECHANICS*



COMISSÃO ORGANIZADORA / *ORGANIZING COMMITTEE*

Renato M. Natal Jorge, FEUP
João Manuel R.S. Tavares, FEUP
Jorge Américo de Oliveira Pinto Belinha, IDMEC-FEUP
Marco Paulo Lages Parente, IDMEC-FEUP
Pedro Alexandre Lopes de Sousa Martins, IDMEC-FEUP

PATROCÍNIOS E APOIOS INSTITUCIONAIS / *SPONSORSHIP AND INSTITUTIONAL SUPPORT*



CELL-FREE LAYER MEASUREMENTS IN A BIFURCATION MICROCHANNEL: COMPARISON BETWEEN A MANUAL AND AUTOMATIC METHODS <i>David Bento, Diana Pinho, Elmano Pinto, Tomoko Yaginuma, Teresa Correia, José Lima, Ana I. Pereira, Carla S. Fernandes, Ricardo Dias, Rui Lima</i>	359
AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS DOS MÚSCULOS DA PERNA POR IRM ATRAVÉS DE T2 <i>José Nuno Alves, Ana Rita Justo Pereira, Sérgio Saraiva Alves, Filipa Oliveira João, Mário Forjaz Secca e António Prieto Veloso</i>	363
DISPOSITIVO PARA ENSAIO DE DESGASTE EM PRÓTESE TOTAL DE QUADRIL <i>Michel Haddad, Mauro Pedro Peres e Marcelino Pereira Nascimento</i>	367
FABRICO DE UMA PRÓTESE FEMORAL POR MAQUINAGEM CNC NUMA FRESADORA DE 3 EIXOS <i>Pedro Ferreira, Fernando Simões, Carlos Relvas e António Ramos</i>	371
ANÁLISE DE PONTE SOBRE IMPLANTES DENTÁRIOS USANDO UM MÉTODO SEM MALHA <i>H.M.S. Duarte, J. Belinha, L.M.J.S. Dinis e R.M. Natal Jorge</i>	377
ESTUDO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DO CIMENTO-EM-CIMENTO NA REVISÃO DA ARTROPLASTIA DA ANCA <i>Nuno Jorge, Luís Roseiro, Fernando Simões e Pedro Carnalbas</i>	379
ENHANCED VELOCITY OF RED BLOOD CELLS IN HIGHLY BRANCHED VESSELS: INFLUENCE OF THE VESSELS DIAMETER <i>Bianca Pires, Luís Pimparel, Diana Pinho, Rui Lima and Ricardo Dias</i>	385
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL DE UMA PRÓTESE PARA CICLISTAS COM AMPUTAÇÃO TRANSTIBIAL <i>P. Ferreira, L. Roseiro, V. Lopes, I. Costa, J. Almeida e Telmo Pinão</i>	391
BIOMECÂNICA DA COLUNA CERVICAL: INFLUÊNCIA DOS LIGAMENTOS <i>P. C. Fernandes, J. Folgado e P. R. Fernandes</i>	397
AUTOMATIC CALCULATION OF THE SKIN'S LINES OF NON-EXTENSION AT THE ANKLE JOINT <i>Sara P. Marreiros, Ana R. Domingues, Jorge M. Martins, Miguel T. Silva and Dava J. Newman</i>	401
DESENVOLVIMENTO DE UM MICRODISPOSITIVO BIOMÉDICO PARA A SEPARAÇÃO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS <i>Susana Novais, Diana Pinho, Ana I. Pereira, Maite Mujika, Sergio Arana, Rui Lima</i>	407
THERMO-MECHANICAL BEHAVIOR OF TRANSTIBIAL PROSTHESIS INTERFACES: INFLUENCE ON CORRECT PROSTHETIZATION <i>Adriana Cavaco, A. Ramalho, Sandra Pais and Luísa Durães</i>	411
COMPARAÇÃO DE CRIANÇAS COM E SEM JOELHOS VALGOS, PRATICANTES DE HÓQUEI EM PATINS, UTILIZANDO SISTEMAS DE ANÁLISE DE MOVIMENTO <i>Nuno M.J. Oliveira, Rubim Santos, M.L.P. Vaz e M.A. Marques</i>	417
MODELING AND ANALYSIS OF AN ANKLE-FOOT ORTHOSIS (AFO) USING MULTIBODY METHODOLOGIES <i>P. Ferreira, F. G. Flores, P. Flores, M. Siebler and A. Kecskeméthy</i>	423
ANÁLISE CINEMÁTICA DA TÉCNICA DE CRAWL EM DIFERENTES VARIANTES DE UM PROTOCOLO INCREMENTAL E INTERMITENTE PARA OBTENÇÃO DO VO2MÁX <i>Kelly de Jesus, Karla de Jesus, João Paulo Vilas-Boas e Ricardo J. Fernandes</i>	429
PROJETO, CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL DE UM PEDAL INSTRUMENTADO PARA BICICLETA <i>Vítor Lopes, Luís Roseiro, Pedro Ferreira, Inácio Costa e José Almeida</i>	435

DESENVOLVIMENTO DE UM MICRODISPOSITIVO BIOMÉDICO PARA A SEPARAÇÃO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

Susana Novais¹, Diana Pinho², Ana I. Pereira³, Maite Mujika⁴, Sergio Arana⁴, Rui Lima²

¹ Instituto Politécnico de Bragança; susaninhanovais@gmail.com

² Instituto Politécnico de Bragança & CEFT, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto; {diana.ruinec}@ipb.pt

³ Instituto Politécnico de Bragança & Algoritmi, Universidade do Minho; apereira@ipb.pt

⁴ CEIT and Tecnun, Universidade de Navarra, Parque Tecnológico de San Sebastián; {mmujika,sarana}@ceit.es

PALAVRAS-CHAVE: Dispositivo Biomédico, Fotolitografia, Escoamento Sanguíneo, Camada de Plasma.

RESUMO: Neste trabalho procedeu-se ao desenho e implantação de um dispositivo biomédico, com capacidade de realizar a separação das células sanguíneas da camada de plasma. Numa primeira fase do trabalho realizou-se o desenho e fabricação do dispositivo, através da técnica de litografia suave. A segunda fase consistiu no estudo do escoamento sanguíneo com o objetivo de analisar o efeito das constricções na variação da espessura da camada de plasma. Concluímos que a constricção proporciona um aumento da espessura da camada de plasma e à medida que se aumenta o hematócrito a camada de plasma tende a diminuir.

1 INTRODUÇÃO

O uso de dispositivos micro-fluídicos para a separação de células sanguíneas tem um vasto número de vantagens em comparação com os métodos tradicionais de separação, como por exemplo, menor consumo de volume da amostra, facilidade de portabilidade, fabricação a custo reduzido, uma melhor esterilização e uma análise mais rápida e eficiente [1, 2].

A camada de plasma (CP) é um fenómeno fisiológico que acontece no sangue quando este flui em micro-vasos [3, 4]. Segundo Sangho Kim e seus colaboradores [5], a CP depende do diâmetro do vaso, do caudal usado e das propriedades reológicas do sangue, incluindo o hematócrito, a agregação de glóbulos vermelhos (GV's) e a sua deformabilidade. Ainda segundo estes investigadores a espessura da CP diminui com o aumento do hematócrito [5]. Este fenómeno ocorre graças à tendência dos GV's se submeterem à migração axial,

devido ao perfil de velocidades parabólico que resulta em elevadas tensões de corte em torno da parede, forçando os GV's a deslocarem-se na direção central do canal [6].

Este trabalho foi desenvolvido recorrendo a técnicas de litografia e de microscopia em que o principal objetivo foi desenvolver uma geometria capaz de efetuar a separação das células sanguíneas. Para tal foi estudado o efeito de uma constricção na camada de plasma, o efeito do hematócrito e do caudal na dimensão da CP a jusante da constricção. A estrutura deste trabalho é a seguinte. Na Secção 2 são descritas as técnicas e materiais usados neste trabalho. A Secção 3 apresenta os resultados obtidos neste estudo. As Secções 4 e 5 apresentam as conclusões e trabalhos futuros, respetivamente.

2 FLUIDOS ESTUDADOS E GEOMETRIA DO MICRO-CANAL

Os fluidos usados neste estudo foram o Soro fisiológico (NaCl) e o *Dextrano* 40 (Dx 40), contendo cerca de 5% e 10%, ie., Hct = 5 e 10, por volume de GV's. O sangue foi recolhido a partir de um ovino saudável tendo sido adicionado heparina a fim de impedir a sua coagulação. As células foram separadas do sangue por centrifugação (2000 rpm durante 15 minutos) e os GV's lavados duas vezes com uma solução de NaCl e colocados em suspensão com Dx 40 para perfazer a concentração de GV's pretendida. As amostras de sangue foram armazenadas hermeticamente a 5°C, tendo sido realizadas as experiências a uma temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) [7]. Os micro-canais testados neste estudo foram fabricados usando a técnica de litografia suave [7] e consistem em canais retos de 400 µm de largura com regiões de contração de 20 µm. Na Fig. 1, pode ser visualizada a geometria desenvolvida.

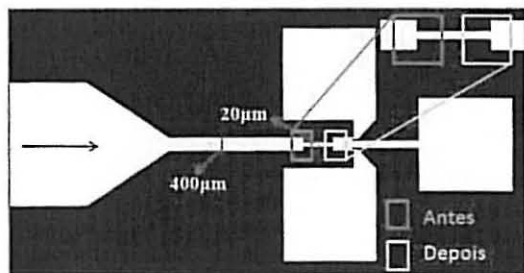


Fig. 1 Geometria e dimensões do micro-canál em PDMS.

A razão de expansão (r_e) apresentada pela equação 1, definida por,

$$r_e = \frac{W_1}{W_2} \quad (1)$$

onde W_1 , corresponde à largura maior (400 µm) e o W_2 , corresponde à largura menor (20 µm) [7]. Assim, a geometria apresentada na Fig.1 possui uma razão de expansão de 20.

Para os ensaios experimentais de escoamento sanguíneo, foi utilizado um

microscópio invertido (IX71, Olympus, Portugal). A velocidade dos fluidos de trabalho foi controlada utilizando uma bomba de seringa (Harvard Apparatus PHD ULTRA), e foram estudados três caudais: 2 µl/min, 5 µl/min e 10 µl/min. As imagens foram captadas com uma câmara de alta velocidade (*i-SPEED* LT) e transferidas para o computador para serem analisadas. Uma ilustração da configuração experimental é apresentada na Fig. 2.



Fig. 2 Sistema de Microscopia.

No presente estudo, todas as imagens foram capturadas no plano central dos micro-canais com uma objetiva de 20x mais o zoom de 1.6x, com uma velocidade de 600 frames/segundo. As imagens gravadas foram transferidas para o computador e, em seguida, o tratamento de imagem foi efetuado no *software* de imagem *Image J* (*Image Processing and Analysis in Java*, [8]).

Inicialmente, os vídeos capturados foram convertidos para uma sequência de imagens estáticas, tendo sido necessário converter as imagens em tons de cinza. De seguida, recorreu-se ao comando *Set Scale* para atribuir a cada *pixel* um valor em *microns*. Posteriormente, dentro do menu *Process* usou-se o comando *Filters*, para realçar a imagem. No menu *MtrackJ*, usa-se o comando *Add tracks* que através da sequência de imagens permitiu obter a trajetória da CP, obtendo-se assim os dados

pretendidos e extraídos mediante o comando *Measure Tracks* [7].

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Figs. 3 e 4 visualizam-se os resultados do estudo da camada de plasma no hematócrito 5% e 10% respetivamente, e considerando diferentes caudais (2, 5 e 10 $\mu\text{l}/\text{min}$).

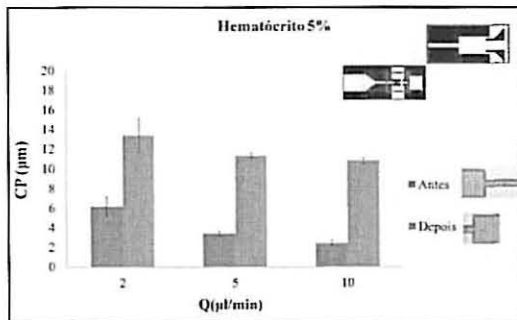


Fig. 3 Estudo da espessura da CP para o Hct 5% em função dos diferentes caudais.

Analisando a Fig. 3, é possível concluir sobre o comportamento da CP para o Hct de 5%, em função dos caudais 2, 5 e 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Os resultados sugerem que a CP diminui ligeiramente com o aumento do caudal. Adicionalmente, comparando a CP a montante (Antes) e a jusante (Depois) da constrição, os resultados sugerem que a CP a jusante da constrição é cerca de **2.9 vezes**¹ maior que a montante da CP.

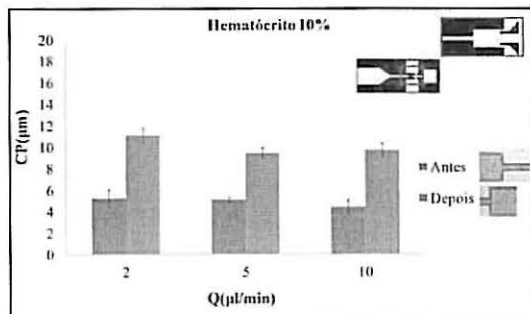


Fig. 4 Estudo da espessura da CP para o hematócrito de 10% em função dos três caudais.

Considerando o estudo para um hematócrito de 10%, veja-se a Fig. 4, é facilmente observável que a CP aumenta consideravelmente a jusante da constrição. Em relação ao caudal pode-se concluir que não apresenta grande influência na camada de plasma. Em termos gerais, a CP a jusante da constrição é cerca de **2.1 vezes** superior à camada de plasma a montante da constrição.

Nas Figs. 5 e 6 são apresentados os resultados globais da visualização do escoamento sanguíneo. Na Fig. 5 é possível avaliar o efeito da constrição na variação da espessura da camada de plasma.

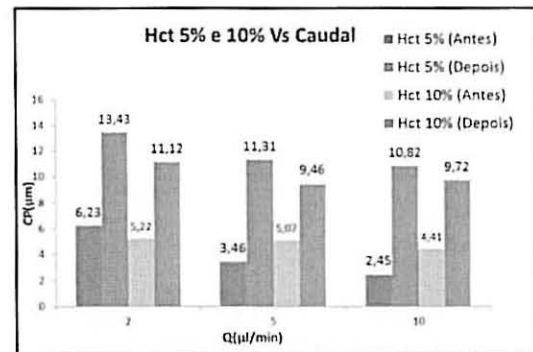


Fig. 5 Análise da CP, antes e depois da constrição para todos os Hct's e caudais em estudo.

Face aos resultados expostos na Fig. 5, pode-se aferir que para os Hct's estudados, a constrição proporciona um aumento da espessura da CP. Por outro lado os resultados obtidos da CP a jusante da constrição sugerem que o aumento do Hct promove uma ligeira diminuição da camada de plasma.

Na Fig. 6, compara-se os resultados obtidos relativamente à diferença na camada de plasma (Δcp). Este valor Δcp é obtido considerando a diferença entre a camada de plasma antes (cpA) e a camada de plasma depois da constrição (cpD). O Δcp é então calculado pela seguinte equação:

$$\Delta\text{cp} = \text{cpD} - \text{cpA} \quad (2)$$

¹ Valor obtido pela divisão da média dos caudais depois da constrição (a jusante), pela média dos caudais antes de constrição (a montante).

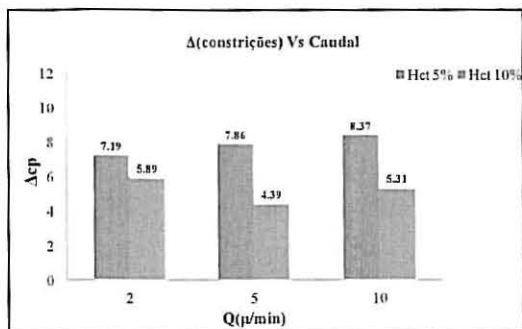


Fig. 6 Diferença das constricções para todos os Hct's quando comparadas com os distintos caudais entre a cpA e a cpD.

Na Fig.6, são apresentados os resultados da diferença da CP antes e depois da constricção para os Hct's estudados. Os resultados sugerem que à medida que se aumenta o Hct, a CP tem a tendência a reduzir, o que corrobora os resultados da Fig. 5.

Quantitativamente e analisando por exemplo o caudal 2, afere-se que para um Hct 5%, o $\Delta_{cp} = 7.2$, e para um Hct 10%, o Δ_{cp} diminui para 5.9. Ao se analisar os outros caudais, também se afere que o Δ_{cp} é sempre superior para o menor hematócrito.

4 CONCLUSÕES

O objetivo deste estudo consiste no desenvolvimento de um *biochip* com a capacidade de, num único passo, executar a separação das células sanguíneas existentes na camada de plasma.

As técnicas de análise usadas no presente estudo como o perfilómetro e o SEM, pode-se concluir que o controlo dimensional e geométrico foi suficiente para o tipo de experiências realizadas.

O uso do polímero PDMS empregue durante o processo de fabricação permitiu o desenvolvimento de micro-canais para o estudo *in vitro* do escoamento sanguíneo à micro escala. De salientar, que a técnica de fotolitografia usada durante o processo de micro-fabricação foi uma mais-valia para a realização deste projeto, tendo demonstrado

grande qualidade na replicação dos padrões pretendidos.

Relativamente aos resultados obtidos na variação da espessura da camada de plasma, para a geometria edificada com uma razão de expansão de 20, os resultados sugerem que a camada de plasma é sempre superior a jusante da constricção. Quando comparados os valores da diferença da espessura da camada de plasma (jusante-montante), é evidente que o fluido com um Hct de 5%, é aquele que possui maiores valores, seguindo-se o fluido com um Hct de 10%.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FCT, COMPETE, QREN e União Europeia (FEDER) pelo financiamento através dos seguintes projetos: PTDC/SAU-BEB/105650/2008, PTDC/SAU-BEB/108728/2008, PTDC/EME-MFE/099109/2008 e PTDC/SAU-ENB/116929/2010.

REFERÊNCIAS

- [1] C. Kyongmi, M. Jihee, K. Shhan, K. Sang-Don, C. Jaeweon, "Bioparticle separation using microfluidic porous Plug for environmental monitoring", Vol.23, pp: 202-215, 2007.
- [2] M. Al-Fandi, M. Al-Rousan, M. A. K. Jaradat, L. Al-Ebbini, "New design for the separation of microorganisms using microfluidic deterministic lateral displacement", Vol.27, pp: 237-244, 2011.
- [3] C. Caro, T. Pedley, R. Schroter, W. Seed, "The mechanics of the circulation", Oxford University Press, 1978.
- [4] H. Fujiwara, T. Ishikawa, R. Lima, N. Matsuki, Y. Imai, H. Kaji, M. Nishizawa, T. Yamaguchi, "Red blood cell motions in high-hematocrit blood flowing through a stenosed microchannel", Journal of Biomechanics, Vol 42, pp: 838-843, 2009.
- [5] S. Kim, P. K. Ong, et al. "The cell-free layer in microvascular blood flow", Vol. 46, pp: 181-189, 2009.
- [6] R. Lima, M. Oliveira, Yaginuma T., Ishikawa T., Imai Y. Yamaguchi T., "Development of a Microfluidic Device for Partial Cell Separation", 2011.
- [7] S. Novais, "Desenvolvimento de um microdispositivo biomédico para a separação e deformação de eritrócitos, Tese de Mestrado em Tecnologia Biomédica do Instituto Politécnico de Bragança, Portugal, 2012.
- [8] T. Ferreira, W. Rasband, "The ImageJ user guide", 2011.