



Estudo de métodos de modificação de propriedades dos glóbulos vermelhos para mimetizar efeitos da malária

Liliana da Silva Vilas Boas

Dissertação apresentada(o) à

Escola Superior de Tecnologia e Gestão

Instituto Politécnico de Bragança

para obtenção do grau de Mestre em

Tecnologia Biomédica

Este trabalho foi efetuado sob orientação de:

Carla Fernandes (IPB)

Susana Catarino (UMinho)

Junho 2017

Agradecimentos

A realização deste projeto não seria possível sem o contributo de algumas pessoas, que deste modo, apoiaram e incentivaram tornando possível a concretização desta tese.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Doutora Susana Catarino da Universidade do Minho e à Professora Carla Sofia Veiga Fernandes da Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Bragança, orientadoras principais da minha tese, pelo apoio incondicional, pelo acompanhamento cuidado e por um esclarecimento mais abordado acerca do tema em estudo.

Aos meus pais, alicerces importantes na minha educação, e que sem eles nada disto seria possível. Obrigado pelo apoio e força dados para a realização dos meus objetivos. Agradeço ainda ao meu namorado pelo apoio, incentivo e paciência.

Ao grupo de investigação do Instituto Politécnico de Bragança, um agradecimento especial, pelo auxílio prestado no laboratório. De uma maneira mais especial à Diana Pinho que sempre esteve presente para me auxiliar, pela sua disponibilidade incansável para esclarecimento de dúvidas e com o envio de sangue.

À Vânia Pinto e Paulo Sousa pelo fabrico dos microcanais e à Vera Faustino por ser incansável, pelo apoio no trabalho laboratorial e pela disponibilidade para me ajudar sempre que precisei.

Um agradecimento especial ao meu amigo Paulo Cristóvão por toda a ajuda e paciência, por estar sempre tão presente, pela sua amizade e apoio incondicional.

Resumo

A malária mata mais de um milhão de pessoas por ano e é uma das principais causas de morte em regiões subdesenvolvidas. Assim, o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico rápidas, eficientes e competitivas é essencial.

Este trabalho focou-se no estudo da deformabilidade dos glóbulos vermelhos (GVs) como biomarcador de malária, visto que esta propriedade do sangue está diretamente relacionada com as alterações que o parasita provoca ao longo da evolução da doença. Sistemas microfluídicos com estreitamentos abruptos juntamente com técnicas de processamento de imagem permitem determinar parâmetros como a velocidade de escoamento e a deformabilidade dos GVs. Assim, utilizando microcanais poliméricos com estreitamentos de 6 μm a 10 μm , efetuou-se um estudo comparativo entre GVs saudáveis e GVs quimicamente modificados para aumentar a sua rigidez e mimetizar o comportamento do parasita da malária. Os resultados obtidos mostram que os GVs saudáveis se deformam naturalmente para atravessar estreitamentos e recuperam rapidamente a sua forma original após o estreitamento. Em contrapartida, nas amostras modificadas com maiores percentagens de químicos o mesmo não se verificou, ocorrendo várias oclusões.

Conclui-se assim que o aumento da rigidez dos GVs provoca a diminuição da velocidade de escoamento, da deformabilidade e da capacidade de recuperação de forma das células. Este trabalho assume-se como um contributo para o desenvolvimento de novos sistemas de diagnóstico. Tendo em conta as microtecnologias existentes, será possível integrar, num chip, sensores, microeletrónica e plataformas microfluídicas, de forma a criar um método de diagnóstico simples, rápido, preciso e barato para deteção precoce da malária.

Abstract

Malaria kills more than one million people per year and is one of the leading causes of death in underdeveloped regions. Thus, the development of rapid, efficient and competitive diagnostic techniques is essential.

This work focused on the study of the deformability of red blood cells (RBCs) as a malaria biomarker, since this blood property is directly related to the changes that the parasite causes throughout the course of the disease. Microfluidic systems with abrupt contractions, along with image processing techniques, allow the determination of parameters such as the flow velocity and the deformability of the RBCs. Thereby, using polymeric microchannels with 6 μm to 10 μm width contractions, it was performed a comparative study between healthy and chemically modified RBCs to increase their stiffness and mimic the malaria parasite effect. The obtained results show that healthy RBCs naturally deform to cross the contractions and rapidly recover their original shape. In contrast, in modified samples with high concentration of chemicals, the same did not occur, with several occlusions being observed.

Therefore, it is concluded that increasing the rigidity of the RBCs causes the decrease of the flow velocity, the deformability and the shape recovery capacity of the cells. This work is a contribution to the development of new diagnostic systems. Taking into account the existing microtechnologies, it will be possible to integrate sensors, microelectronics and microfluidic platforms into a chip, in order to create a simple, fast, accurate and low cost diagnostic method for early detection of malaria.

Conteúdo

Nomenclatura.....	xi
Lista de figuras	xii
Lista de tabelas	xvii
1. Introdução.....	1
1.1. Enquadramento	1
1.2. Motivação	5
1.3. Objetivos.....	6
1.4. Estrutura da dissertação	7
2. Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica.....	9
2.1. Mecanismo de infecção da malária	10
2.1.1. Principais métodos de deteção da malária	11
2.2. Constituição do sangue	13
2.2.1. Glóbulos Vermelhos	13
2.2.2. Glóbulos Brancos.....	14
2.2.3. Plaquetas	15
2.2.4. Plasma.....	16
2.3. Reologia do sangue.....	16
2.3.1. Escoamento sanguíneo.....	16
2.3.2. Comportamento dos fluidos.....	17
2.3.3. Velocidade de escoamento.....	18
2.3.4. Comportamento reológico em microcanais	19
2.4. Deformabilidade dos Glóbulos Vermelhos	20
2.4.1. Métodos de estudo da Deformabilidade dos Eritrócitos.....	23
2.5. Velocidade dos Glóbulos Vermelhos	30
2.5.1. Métodos de medição da velocidade	32
3. Materiais e métodos utilizados	35

3.1.	Fabrico dos microcanais	35
3.2.	Soluções utilizadas	39
3.2.1.	Sangue saudável.....	39
3.2.2.	Glutaraldeído	40
3.2.3.	Diamida.....	41
3.2.4.	Glucose	41
3.3.	Equipamento de visualização dos escoamentos em microcanais	41
3.4.	Software de análise de imagem	43
3.4.1.	ImageJ.....	43
3.4.2.	PivLab.....	46
4.	Resultados e discussão	49
4.1.	Estudo da deformabilidade dos GVs	49
4.1.1.	GVs alterados com glutaraldeído.....	49
4.1.2.	GVs alterados com diamida	53
4.1.3.	GVs alterados com glucose.....	55
4.2.	Estudo da velocidade dos GVs	57
4.2.1	Gvs alterados com glutaraldeído.....	59
4.2.2	Gvs alterados com diamida.....	62
4.2.3	Gvs alterados com glucose.....	64
4.3.	Estudo da relação deformabilidade vs velocidade.....	66
5.	Conclusões e trabalho futuro.....	69
5.1.	Conclusões do trabalho.....	69
5.2.	Trabalhos futuros	71
	Bibliografia.....	73
	Anexos.....	85
	Anexo 1	85
	Anexo 2	90
	Anexo 3	95
	Anexo 4	100
	Anexo 5	105
	Anexo 6	110

Nomenclatura

Clc – Camada livre de células

GVs – Glóbulos vermelhos

Hct – Hematócrito

ID – Índice de deformação

PDMS – Polidimetilsiloxano

QBC – *Quantitative buffy coat*

Re – Número de Reynolds

Lista de figuras

Figura 1 - Distribuição global representativa de países livres de malária e países endêmicos para a malária em fases de controlo, eliminação, pré-eliminação e prevenção de reintrodução. Dados de 2007 [3].....	2
Figura 2 - Alterações das taxas de incidência entre o ano de 2000 e 2015 [7].....	3
Figura 3 - Estágios das espécies do parasita Plasmodium: a) anel (ring stage); b) trofozoíto; c) esquizonte; d) gametócito [8].	3
Figura 4 - Ciclo de infeção da malária [20].....	11
Figura 5 – Esquema de um capilar sanguíneo [16].	13
Figura 6 - Forma e dimensão de um GV humano [37].....	14
Figura 7 - Visualização de leucócitos no microscópio de varrimento [40].	15
Figura 8 - Visualização de plaquetas no microscópio de varrimento [40].	15
Figura 9 - Classificação de fluidos de acordo com a dependência tensão de corte vs. taxa de deformação de corte [42].	18
Figura 10 - Representação dos perfis de velocidades para Hct < 1% e Hct superior [37].	19
Figura 11 - a) Efeito de Fahraeus em capilares de vidro. b) Distribuição do Hct [37]. .	19
Figura 12 - Efeito de Fahraeus-Lindqvist. Variação da viscosidade em função do diâmetro do microcanal [37].....	20
Figura 13 - Formas de aspiração da membrana das hemácias individuais [70].	24
Figura 14 - a) Imagem topográfica de glóbulos vermelhos. b) Estrutura da superfície da membrana de uma hemácia [77].....	25
Figura 15 - (a) Exemplo de uma citometria de torção magnética. (b) Digitalização de uma imagem microscópica de hemácias com grânulos anexados. (c) Princípios da citometria de torção magnética [84].	26
Figura 16 - (a) Esquema do princípio de uma imagem da fase quantitativa. (b) medida interferogramas. (C) imagem de uma hemácia utilizando imagens de fase quantitativa [86].	26
Figura 17 - Velocidades de escoamento obtidas pela passagem de GVs não infetados e GVs infetados com <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> através de estreitamentos de 2 µm de largura. A) GVs saudáveis. B) GVs infetados por <i>P. falciparum</i> em estado trofozoíte e esquizonte. C) GVs infetados por <i>P. vivax</i> em ring stage. D) GVs infetados por <i>P. vivax</i> em estado trofozoíte. E) GVs infetados por <i>P. vivax</i> em estado esquizonte [17].....	31

Figura 18 - Desenho 2D das máscaras utilizadas para o fabrico dos microcanais, obtido no AutoCAD 2012. As regiões mais estreitas de cada máscara, na zona central do microcanal, têm larguras de 6, 8 e 10 μm , respetivamente.	36
Figura 19 - Processo de aplicação do fotorresistor [113].	36
Figura 20 - Microcanais fabricados em PDMS.	37
Figura 21 - Visualização ao microscópio de um microcanal com uma contração de 8 μm . a) entrada da contração do microcanal; b) saída da contração do microcanal. Objetiva: 40x.	37
Figura 22 - Desenho tridimensional de um microcanal com letras de identificação das diferentes regiões de circulação dos GVs.	38
Figura 23 - (a) Centrifugadora do sangue; (b) Visualização da separação dos GVs dos restantes constituintes do sangue após a centrifugação.	39
Figura 24 - Visualização das camadas de separação dos GVs dos restantes constituintes da amostra após a centrifugação.	40
Figura 25 - Circuito utilizado para o escoamento sanguíneo. A) Bomba de seringa; B) Câmara de alta velocidade; C) Microscópio invertido; D) Microcanais fabricados	42
Figura 26 - Sistema de bombeamento (NEMESYS Syringe Pump).	42
Figura 27 - Detalhe da ligação dos tubos à entrada e à saída do microcanal.	43
Figura 28 - Interface gráfica de utilizador do programa ImageJ.	44
Figura 29 - Exemplo de um recorte da zona de interesse (308 x 332 μm) na entrada do estreitamento do microcanal utilizando a função Crop (as setas indicam o sentido do fluxo).	44
Figura 30 - Seguimento dos GVs na saída da contração de 10 μm . a) GVs não modificados; b) GVs modificados com 0,08% de glutaraldeído.	45
Figura 31 - Interface gráfica do utilizador do software PivLab.	46
Figura 32 - Aplicação da calibração na entrada do canal de 6 μm	47
Figura 33 - Aplicação das máscaras de exclusão na entrada do canal de 6 μm	47
Figura 34 - Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glutaraldeído utilizado na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.	50
Figura 35 - Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glutaraldeído utilizado na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 8 μm de largura. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.	51
Figura 36 - Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glutaraldeído utilizado na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 10 μm de largura. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.	52

Figura 37 – Entupimento do microcanal na entrada da contração de 6 μm . a) com GVs expostos a uma concentração de 0,025% de glutaraldeído; b) com GVs expostos a uma concentração de 0,08% de glutaraldeído.	52
Figura 38 - Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de diamida utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.	53
Figura 39 - Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de diamida utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.	54
Figura 40 - Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de diamida utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.	55
Figura 41 - Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glucose utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.	56
Figura 42 - Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glucose utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.	56
Figura 43 - Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glucose utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.	57
Figura 44 - Distribuição da velocidade dos GVs saudáveis num canal com um estreitamento de 6 μm . A seta indica o sentido do fluxo. A zona representada a amarelo demonstra valores de velocidade superiores às restantes zonas.	58
Figura 45 - Distribuição da velocidade dos GVs saudáveis num canal com um estreitamento de 6 μm . A seta indica o sentido do fluxo. A zona representada a amarelo demonstra valores de velocidade superiores às restantes zonas.	58
Figura 46 - Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glutaraldeído utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do	

microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.	59
Figura 47 - Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glutaraldeído utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.	60
Figura 48 - Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glutaraldeído utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.	61
Figura 49 - Variação da velocidade com o aumento da percentagem de diamida utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.	62
Figura 50 - Variação da velocidade com o aumento da percentagem de diamida utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.	63
Figura 51 - Variação da velocidade com o aumento da percentagem de diamida utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.	63
Figura 52 - Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glucose utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.	64
Figura 53 - Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glucose utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.	65
Figura 54 - Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glucose utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.	65
Figura 55 – Relação entre deformabilidade e velocidade com o aumento da percentagem de glutaraldeído utilizado no tratamento dos GVs, no microcanal com o estreitamento de 8 μm de largura. A tracejado está apresentada a linha de tendência linear.	66

Figura 56 - Relação entre deformabilidade e velocidade com o aumento da percentagem de diamida utilizada no tratamento dos GVs, no microcanal com o estreitamento de 8 μm de largura. A tracejado está apresentada a linha de tendência linear. 67

Figura 57 - Relação entre deformabilidade e velocidade com o aumento da percentagem de glucose utilizada no tratamento dos GVs, no microcanal com o estreitamento de 8 μm de largura. A tracejado está apresentada a linha de tendência linear. 67

Lista de tabelas

Tabela 1 - Principais vantagens e desvantagens das técnicas de medição da deformabilidade dos GVs.	29
Tabela 2 - Principais vantagens e desvantagens das técnicas de medição da velocidade dos GVs.	33
Tabela 3 - Características dos microcanais fabricados. As letras correspondem às diferentes zonas representadas na Figura 22.	38

Capítulo 1

1. Introdução

Este capítulo apresenta o enquadramento teórico do trabalho, assim como a sua principal motivação e objetivos a atingir. O capítulo termina com a descrição da organização da dissertação.

1.1. Enquadramento

A malária é uma doença infecciosa com alta incidência a nível global, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, como é o caso de África, Sudeste Asiático e América do Sul e Central. Desde 2013 já foram relatados 198 milhões de casos e 584 mil mortes em todo o mundo (havendo aproximadamente 1 a 2 milhões de mortes anuais) e, futuramente, prevê-se que metade da população mundial, cerca de 3,3 biliões, esteja em risco de contrair a doença [1] [2]. Na Figura 1 está representada a incidência da malária a nível mundial.

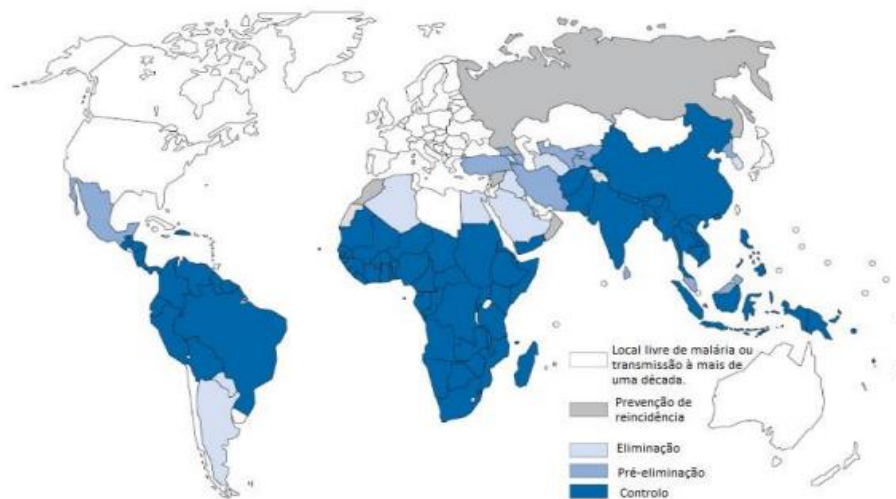


Figura 1 - Distribuição global representativa de países livres de malária e países endêmicos para a malária em fases de controlo, eliminação, pré-eliminação e prevenção de reintrodução. Dados de 2007 [3].

Geralmente os sintomas típicos da malária surgem entre 7 a 15 dias após uma infeção quando não se toma nenhuma medicação preventiva para esta doença. Os primeiros sintomas que surgem normalmente são febres altas, dores de cabeça, fraquezas, arrepios, tonturas, dores abdominais e nas articulações, vómitos e diarreia. Sendo estes sintomas bastante genéricos, existe uma grande dificuldade em diagnosticar a malária devido à sobreposição de sintomas podendo ser confundida com gripe, por exemplo [4] [5]. Embora esta doença seja potencialmente fatal, com um diagnóstico precoce e com o devido tratamento é possível recuperar [6]. A Figura 2 mostra a diminuição da incidência da malária a nível mundial entre o ano de 2000 e 2015.

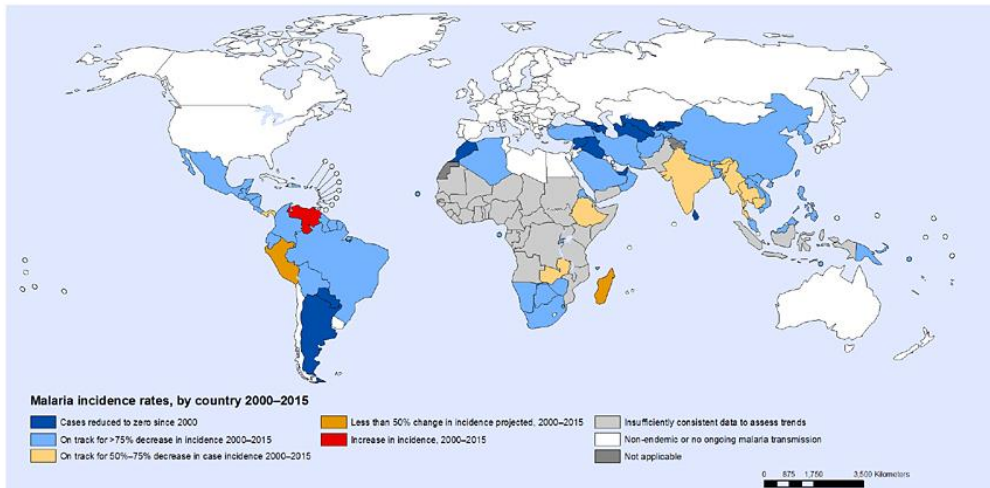


Figura 2 - Alterações das taxas de incidência entre o ano de 2000 e 2015 [7].

A doença em estudo é causada pelo parasita *Plasmodium* que infeta as células vermelhas do sangue. Existem quatro tipos de espécies deste parasita que afetam o ser humano: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*, e cada espécie apresenta quatro estágios: anel (*ring stage*), trofozoíto, esquizonte e gametócito, que estão representados na Figura 3 [8].

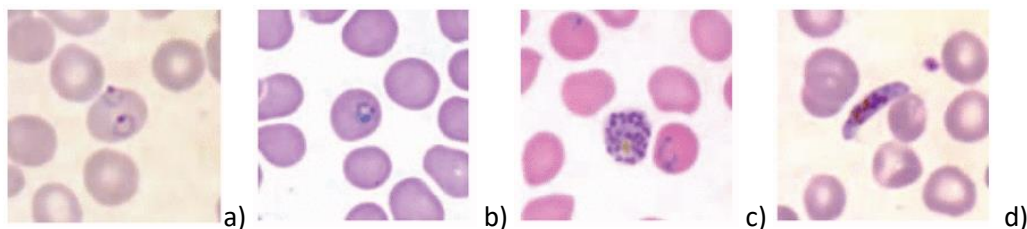


Figura 3 - Estágios das espécies do parasita *Plasmodium*: a) anel (*ring stage*); b) trofozoíto; c) esquizonte; d) gametócito [8].

Das espécies de *Plasmodium*, o *Plasmodium falciparum* é o mais perigoso e a sua detecção num estado inicial é extremamente importante, pois aumenta substancialmente a possibilidade de um tratamento efetivo, fazendo com que haja uma maior taxa de sobrevivência e uma diminuição da transmissão da doença. Como já referido anteriormente, a infecção da malária nos glóbulos vermelhos (GVs) humanos passa por vários estágios e à medida que a infecção se alastra, o parasita provoca alterações bioquímicas, óticas e morfológicas

nas hemácias, tornando estas células mais rígidas e espessas o que, conseqüentemente, causa um aumento da viscosidade do sangue [9] [10]. Estas alterações bioquímicas acontecem de forma gradual e através da análise do fluxo sanguíneo é possível diagnosticar se realmente se trata de um caso de malária e perceber o estágio em que se encontra. Uma das propriedades do sangue mais importante para um diagnóstico precoce desta doença é a deformabilidade dos GVs, uma vez que está diretamente relacionada com as alterações que o parasita provoca ao longo da evolução da malária [11].

Ao longo dos anos foram desenvolvidas diversas técnicas e dispositivos para a detecção da malária, em que o método mais utilizado é a microscopia convencional, por meio de análises de esfregaços de sangue e de colorações. Este método permite obter resultados de uma forma rápida e eficaz, no entanto necessita de uma preparação prévia da amostra e de microscopistas especializados que consigam distinguir os GVs infetados de diferentes espécies e o estágio em que se encontram [8]. Para o diagnóstico da malária sem que seja necessário laboratórios equipados com microscópios, nas regiões endêmicas são utilizados testes de diagnóstico rápido. Apesar das suas vantagens, estes apresentam bastantes limitações como a sensibilidade dos métodos, o seu custo e a capacidade de detetar diferentes espécies e baixa parasitemia [12]. Estas desvantagens, como o alto custo dos testes de diagnóstico rápido e a necessidade de equipamentos de laboratório para técnicas de microscopia tradicional, escassos em regiões endêmicas, podem afetar a extinção da doença e o tratamento efetivo por falta de acesso às melhores técnicas de diagnóstico.

Os sistemas microfluídicos são extremamente vantajosos para a preparação e análise de uma amostra, uma vez que permitem realizar o estudo com uma pequena quantidade de sangue, são de fácil manuseamento, têm um custo reduzido, apresentam um processamento bastante rápido e não necessitam de pessoal especializado [13]. Com as inovações já implementadas ao longo dos tempos, é possível agregar num único chip, sensores, componentes óticos, microeletrónica e canais microfluídicos que poderão permitir o desenvolvimento de métodos de diagnóstico simples e de baixo custo, quantitativos, rápidos e precisos para a detecção precoce da malária.

A realização deste trabalho fundamenta-se no estudo da deformabilidade dos GVs como um relevante marcador da malária. Com isto, tenciona-se realizar uma análise das diferenças da rigidez/deformabilidade das células, analisando simultaneamente a velocidade

de fluxo em microcanais com estreitamentos e analisando a recuperação de forma das células após os estreitamentos.

De modo a desenvolver estes sistemas e avaliar o seu desempenho ao nível da sua eficiência e reprodutibilidade, assegurando a segurança laboratorial e a diminuição do custo e da complexidade dos ensaios microfluídicos laboratoriais, têm vindo a ser estudados métodos de alteração das propriedades dos GVs, mimetizando sinteticamente os efeitos da malária sem a necessidade de utilização de parasitas ou amostras infetadas. Assim, este trabalho pretende ainda implementar diferentes métodos químicos de alteração das propriedades mecânicas dos GVs para mimetizar os efeitos da malária: diamida, glutaraldeído e glucose. A rigidez das células será modificada e o seu comportamento, em relação à deformabilidade e velocidade de escoamento, será comparado com o dos GVs saudáveis.

1.2. Motivação

A malária continua a matar mais de um milhão de pessoas por ano e é a principal causa de morte entre as crianças africanas. A atenção que o mundo dispensa a esta adversidade mortal, bem como os esforços para conter a sua propagação, continuam a ser insuficientes. Assim, é extremamente importante o desenvolvimento de técnicas eficazes para o diagnóstico desta doença, quer nos países subdesenvolvidos, onde há uma maior incidência, quer nos países desenvolvidos, onde existem poucos especialistas no diagnóstico.

O diagnóstico da malária inclui a identificação dos parasitas, antígenos e/ou produtos da sua presença no sangue do indivíduo, o que é uma tarefa complexa pois a eficácia do diagnóstico depende de vários fatores: identificação correta das quatro espécies da malária (*Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*); diferentes estágios de esquizogonia dos glóbulos vermelhos; endemicidade das diferentes espécies; migração populacional; nível de parasitemia; imunidade; sintomas; resistência a fármacos; problemas de reincidência; presença de parasitas em tecidos mais profundos.

Quando esta doença não é diagnosticada antecipadamente, o tratamento ocorre tardiamente e é essa a principal razão para a elevada percentagem de mortes em vários países

endêmicos, sobretudo naqueles que possuem poucos recursos. Devido à falta de experiência ou conhecimento da malária, a detecção da mesma e identificação dos parasitas durante uma análise dos esfregaços de sangue pode ser prejudicada.

Face a estes problemas, sente-se a necessidade de criar e desenvolver métodos de diagnóstico eficazes, rápidos, de baixo custo e de fácil utilização para que possam ser empregues nas áreas endémicas subdesenvolvidas e que não requeiram pessoal com treino específico.

Posto isto, para resolver o problema da motivação deste trabalho é importante estudar as células infetadas e o estabelecimento de uma relação entre a velocidade de escoamento do sangue, deformabilidade dos glóbulos vermelhos e os diferentes estados da malária. Diante disso, será possível desenvolver sensores integrados em dispositivos microfluídicos que permitam a criação de um sistema de detecção da malária autónomo, de alta sensibilidade, preciso, de baixo custo, portátil e de baixo consumo energético. Adicionalmente, para que estes sistemas sejam futuramente desenvolvidos e analisados, é essencial mimetizar sinteticamente os efeitos da malária no sangue humano, de modo a poder testar a sensibilidade e reprodutibilidade dos métodos sem necessidade de amostras infetadas, melhorando a segurança laboratorial.

1.3. Objetivos

Uma vez que o diagnóstico da malária se baseia na deformabilidade das células, o estudo dessa deformabilidade será elaborado medindo as velocidades dos glóbulos vermelhos e as dimensões das células em microcanais com estreitamentos para uma posterior análise do efeito destas constrições no escoamento das células vermelhas do sangue. Esta abordagem (previamente estudada já na equipa de investigação na Universidade do Minho [14]) parte do potencial da presença de geometrias com estreitamentos abruptos para deformar células devido às tensões de cisalhamento e escoamentos gerados por estas contrações geométricas. Utilizando baixas concentrações de GVs tratados com diferentes percentagens de glutaraldeído, glucose e diamida, as amostras serão injetadas por um sistema de bombeamento em microcanais de polidimetilsiloxano (PDMS) com estreitamentos abruptos de diferentes larguras (6 μm , 8 μm e 10 μm), e a sua capacidade de escoar

pelos estreitamentos dos microcanais será avaliada, assim como analisada a sua recuperação de forma após o estreitamento. De forma a medir a velocidade de escoamento e a deformabilidade dos GVs recorre-se a uma câmara de vídeo de alta velocidade, microscópio e técnicas de processamento de imagem. Pretende-se assim obter uma correlação entre diferentes níveis de rigidez (causada pelos diferentes químicos) e diferentes velocidades/índices de deformabilidade nos microcanais, que possam ser associadas aos vários estágios de malária. Para além dos objetivos enunciados anteriormente pretende-se ainda estudar o potencial de ferramentas computacionais (como o ImageJ e PIVLab) para apoio à análise de velocidades/deformações de GVs.

1.4. Estrutura da dissertação

No primeiro capítulo da dissertação é apresentado o enquadramento teórico, motivação e principais objetivos do trabalho. Ao longo do segundo capítulo são apresentados os fundamentos teóricos e uma revisão bibliográfica dos tópicos de interesse para o trabalho, tais como a constituição do sangue e a sua reologia, a deformabilidade dos glóbulos vermelhos e os seus métodos de estudo, e a velocidade dos GVs e os seus principais métodos de deteção. Neste capítulo também é abordado o mecanismo de infeção da malária e os seus principais métodos de deteção. De seguida, no terceiro capítulo, são expostos os materiais e métodos experimentais utilizados ao longo das várias fases do trabalho: fabrico dos microcanais, preparação de soluções e equipamentos utilizado na visualização do escoamento nos microcanais. Neste capítulo são também explicadas as ferramentas de *software* e as funções utilizadas. O quarto capítulo apresenta os resultados experimentais da deformação dos GVs e da velocidade de escoamento nos microcanais obtidos ao longo do trabalho, assim como a discussão dos mesmos. Por último, o quinto capítulo expõe as principais conclusões retiradas do presente trabalho, assim como algumas sugestões para trabalhos que sejam realizados no futuro.

Capítulo 2

2. Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica

Este capítulo apresenta uma revisão bibliográfica e os fundamentos teóricos associados ao sangue e a sua reologia, aos principais métodos de diagnóstico da malária e ao estado da arte dos métodos de detecção de velocidade e deformabilidade de GVs.

Um fluido pode ser definido como sendo uma substância que sofre uma deformação contínua quando submetido a uma força tangencial. A noção de fluido abrange líquidos e gases, sendo possível distingui-los pelo seu grau de compressibilidade: os líquidos são praticamente incompressíveis ao contrário dos gases, que numa condição de pressão apresentam elevada compressibilidade [15]. Por definição, biofluidos são todos os fluidos produzidos pelo organismo. Assim, a urina, o líquido amniótico, a água do corpo, o leite materno, o sangue, entre outros, são considerados biofluidos. De todos os biofluidos, o sangue é o mais importante, uma vez que é responsável pelo transporte de nutrientes e de oxigénio para o organismo [16].

Vários estudos apontam para a importância de estudar o sangue na microcirculação. Várias patologias alteram as propriedades do sangue, como é o caso da viscosidade do plasma, as propriedades mecânicas dos glóbulos vermelhos e a viscosidade da membrana. A malária é uma das doenças que altera o comportamento do sangue, uma vez que a mesma reduz a deformabilidade dos eritrócitos [16].

Com todos os problemas que as doenças como a malária apresentam para o sangue, é extremamente importante compreender o comportamento deste biofluido na microcirculação para o avanço da medicina e da engenharia biomédica.

2.1. Mecanismo de infecção da malária

A malária é provocada por protozoários parasitários do género *Plasmodium*, em que Handayani et al. estudaram duas das suas espécies, *P. falciparum* e *P. vivax* [17]. Eles afirmam que os glóbulos vermelhos infetados com *P. falciparum* tornam-se cada vez mais rígidos com o amadurecimento do parasita, resultando em modificações da superfície da célula infetada por uma variedade de proteínas derivada do parasita. Contrariando outros estudos que afirmam que há uma diminuição da deformabilidade das hemácias infetadas por *P. vivax*, Suwanarusk et al. alegam que a deformabilidade aumenta drasticamente, porque trofozoítos (forma ativa do protozoário que causa a malária) de *P. vivax* desenvolvem esquizontes (parasita da malária amadurecido) que infetam as hemácias [18]. Para resolver esta controvérsia, Handayani et al. analisaram o comportamento de GVs infetados com *P. vivax* num modelo microfluídico com uma contração e concluíram que apesar da elevada deformabilidade das hemácias infetadas, várias foram destruídas ao passarem pela contração, o que revela uma maior fragilidade [17].

O ciclo de infecção da malária, representado na Figura 4, é causado pela picada de mosquitos fêmeas *Anopheles*, que transmite o esporozóite ao hospedeiro e este vai agir como vetor de transmissão. Através dos vasos sanguíneos, o esporozóite é conduzido até ao fígado, onde penetra os hepatócitos, ocorrendo a fase esquizonte (aumenta de tamanho) e reproduz-se de forma assexuada, originando merozoítos. Por conseguinte, os hepatócitos rebentam e libertam milhares de merozoítos na corrente sanguínea que infetam os glóbulos vermelhos do hospedeiro provocando a fase inicial (*ring stage*), evoluindo para a fase trofozoíte e por fim a fase esquizonte. Nesta última fase, os glóbulos vermelhos infetados replicam-se e originam entre 16 a 32 novos merozoítos que acabam por rebentar o glóbulo vermelho hospedeiro e desencadear um ciclo intra-eritrócito, que consiste na infecção de glóbulos vermelhos saudáveis de forma cíclica [19].

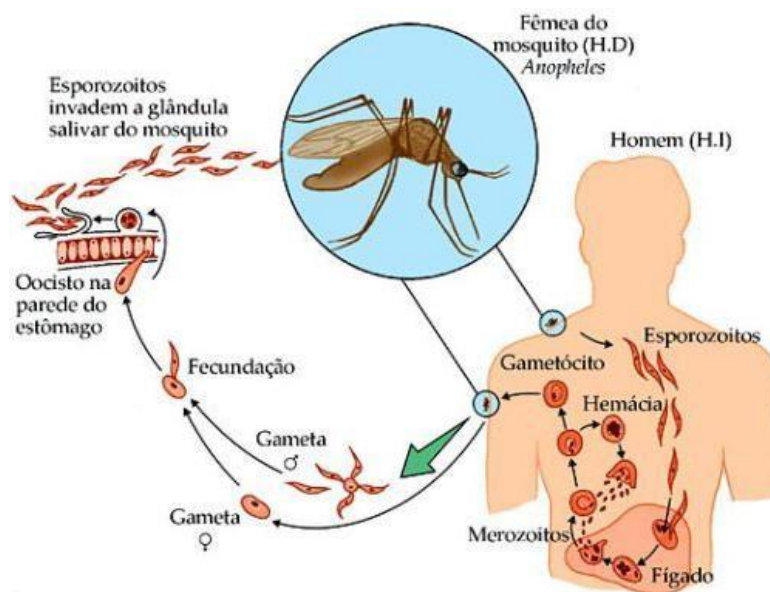


Figura 4 - Ciclo de infecção da malária [20].

No ciclo intra-eritrócito ocorre uma degradação de 60 a 80% da hemoglobina (constitui aproximadamente 95% da quantidade de proteínas presentes nas hemácias) [21]. A proteólise da hemoglobina liberta aminoácidos e heme, em que o heme não demonstra ser metabolizado ou reciclado, porém é mantido como polímero inerte conhecido como hemozoína [22].

Durante a evolução da malária, o parasita modifica continuamente as propriedades dos glóbulos vermelhos hospedeiros e exporta certas proteínas parasíticas que tornam as células infetadas mais aderentes, aumentando a citoadesão [23] [24]. Também induzem progressivamente o aumento da rigidez dos GVs enquanto o parasita amadurece [25].

Todas as alterações morfológicas que este parasita provoca comprometem a microcirculação [26] e em casos de malária mais críticos pode-se verificar outras patologias, como por exemplo anemia [27].

2.1.1. Principais métodos de detecção da malária

O sangue é um dos materiais biológicos mais cruciais que pode ser utilizado para o diagnóstico e estudo de doenças. Assim, é extremamente importante a criação de métodos

simples e eficazes que permitam fazer a separação do sangue, para posteriormente estudar o comportamento das biomoléculas [28-33].

O diagnóstico clínico da malária não é uma tarefa fácil, uma vez que esta doença apresenta os mesmos sintomas que outras patologias. Nos países subdesenvolvidos, o diagnóstico desta doença é feito através dos sintomas dos pacientes (febre, dor de cabeça, vômitos, diarreia, arrepios, tonturas, dor abdominal, etc.) o que pode levar a diagnósticos errados.

Este tipo de diagnóstico pode conduzir a falsos negativos ao menosprezar sintomas da malária que coincidam com outras patologias menos perigosas. Isto pode levar à falta de tratamento da malária nesse doente, assim como a possível proliferação da doença através do mesmo. Em contrapartida, este método também pode resultar em falsos positivos, o que levará a que os pacientes não sejam medicados para a doença que possuem e, podem ainda, desenvolver resistência aos fármacos destinados ao tratamento da malária.

Por todas estas razões, várias técnicas para a deteção e diagnóstico da malária têm sido investigadas, como é o caso de:

- Técnica de microscopia convencional: esta é realizada através da coloração e análise de esfregaços de sangue [34]. Esta técnica tem um custo relativamente baixo e possibilita a identificação das diferentes espécies e do nível de parasitemia. Contudo, tem a desvantagem de necessitar de microscopistas especializados e treinados para a obtenção de resultados fidedignos.
- Quantitative buffy coat (QBC): este método é um exemplo das técnicas de concentração, baseando-se na diferença entre os valores da densidade dos componentes sanguíneos e no princípio de que as células infetadas ficam concentradas entre as camadas separadas de eritrócitos e leucócitos do tubo de QBC centrifugado [35]. Esta técnica é bastante simples e fiável, todavia requer equipamento de elevado custo e mostra complicações na determinação das espécies e no nível de parasitemia presente na amostra.
- Teste de diagnóstico rápido: estes baseiam-se essencialmente em princípios de imunocromatografia, como por exemplo o teste OptiMAL que faculta a deteção de antígenos de desidrogenase láctica (DHL) libertados pelas hemácias infetadas

[12]. Este procedimento é de fácil utilização, é rápido e não necessita de equipamento de laboratório sofisticado. Contudo, esta técnica apenas deve ser utilizada em conjunto com métodos complementares para confirmação do diagnóstico devido à sensibilidade dos resultados [36].

2.2. Constituição do sangue

O sangue é uma substância líquida essencial para o diagnóstico da malária, que circula nas artérias e veias do organismo e pode ser caracterizado como um fluido opaco, com viscosidade superior à água e heterogêneo. Consiste numa suspensão de uma série de elementos celulares (glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas), como se pode verificar na Figura 5. Estes componentes correspondem a cerca de 46% do volume total do sangue, numa matriz aquosa de moléculas, proteínas orgânicas e sais chamado plasma [15] [16].

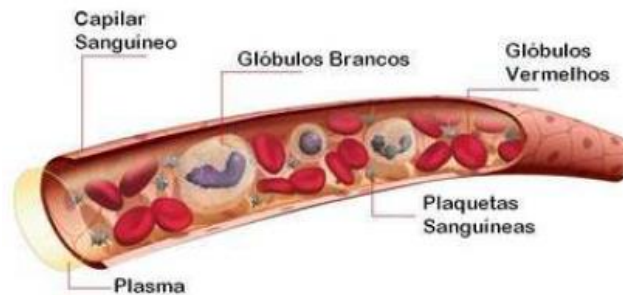


Figura 5 – Esquema de um capilar sanguíneo [16].

2.2.1. Glóbulos Vermelhos

Os glóbulos vermelhos, também designados de hemácias ou eritrócitos, são elementos celulares desprovidos de núcleo e organelos, que na ausência de tensões aplicadas, apresentam-se sob a forma bicôncava com cerca de 8 μm de diâmetro, com uma espessura média de 2 μm e um volume de 85 a 90 μm^3 , como se pode verificar na Figura 6 [37] [38].

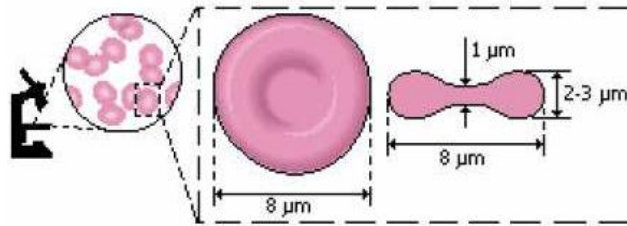


Figura 6 - Forma e dimensão de um GV humano [37].

Os GVs são as mais abundantes células sanguíneas, sendo cerca de 700 vezes mais numerosos que os glóbulos brancos e 17 vezes mais que as plaquetas, e deslocam-se no sistema circulatório pelas forças responsáveis pela circulação sanguínea. A sua principal função é transportar o oxigénio dos pulmões para os tecidos do organismo e o dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões, através da hemoglobina que ocupa cerca de 25% do volume da hemácia [37] [38].

Devido à sua forma, os GVs têm a capacidade de se deformar, facilitando a sua passagem pelo centro dos capilares e possuem um módulo de elasticidade bastante elevado [16]. O hematócrito corresponde à percentagem do volume ocupado pelos glóbulos vermelhos no volume total do sangue.

2.2.2. Glóbulos Brancos

Os glóbulos brancos ou leucócitos são células claras ou esbranquiçadas, com núcleo mas sem hemoglobina, e são responsáveis pela resposta imunitária. Normalmente possuem uma forma esférica, como é possível observar na Figura 7, e o seu diâmetro varia entre os 7 e os 22 μm consoante o seu tipo [37] [39].



Figura 7 - Visualização de leucócitos no microscópio de varrimento [40].

2.2.3. Plaquetas

As plaquetas, também conhecidas como trombócitos, são relativamente pequenas (1 a 2 μ m de diâmetro), apresentam uma forma irregular ou oval, como se verifica na Figura 8, e estão presentes em grande número no sangue [37] [40].

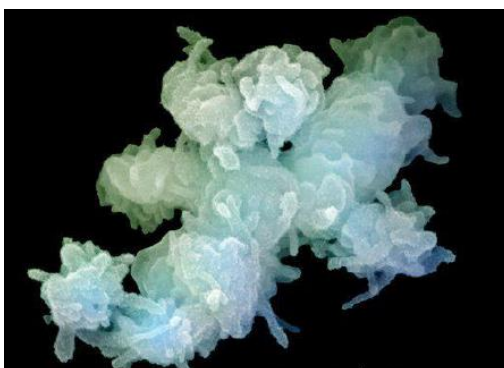


Figura 8 - Visualização de plaquetas no microscópio de varrimento [40].

Os trombócitos são fragmentos citoplasmáticos anucleados produzidos na medula óssea, cuja principal função é a formação de coágulos sanguíneos que impossibilitem a perda de sangue quando há uma hemorragia [37] [38].

2.2.4. Plasma

O plasma é um fluido amarelado, composto por cerca de 91% de água e 9% de outras substâncias como proteínas, iões, substâncias nutritivas, gases e produtos de degradação, e tem a função de transportar nutrientes e substâncias tóxicas.

É um líquido que contém substâncias em suspensão (que não depositam), quase todas proteínas plasmáticas, as quais são produzidas pelo fígado ou pelas células sanguíneas, sendo exceção as hormonas proteicas [38].

2.3. Reologia do sangue

2.3.1. Escoamento sanguíneo

O escoamento sanguíneo apresenta variações conforme os tecidos onde passa e as suas funções. Alguns necessitam de um escoamento superior quando estão em trabalho, pois existe um aumento do consumo de oxigénio, nutrientes e produção de dióxido de carbono, enquanto durante o repouso o escoamento é significativamente pequeno [41].

O escoamento do sangue segue os princípios físicos da conservação da massa, da energia e da quantidade de movimento. A circulação do sangue nos vasos sanguíneos resulta das forças de gravidade e das forças devidas aos gradientes de pressão. A variação de pressão nos vasos sanguíneos de ponto para ponto torna possível o movimento do sangue. No entanto, forças de corte exercidas no fluido pelas paredes dos vasos sanguíneos e forças devidas à turbulência do escoamento contrariam a circulação do sangue [41].

O escoamento de um fluido pode ser considerado laminar, transitório ou turbulento. Um escoamento laminar ocorre quando o fluido se move em camadas, ou lâminas, e uma camada desliza sobre a camada adjacente, verificando-se apenas a troca de quantidade de movimento molecular. No regime laminar, a viscosidade tende a moderar a tendência para o aparecimento de instabilidade e turbulências. No escoamento turbulento, as partículas do fluido apresentam movimentos irregulares, havendo uma transferência de quantidade de movimento [41].

Como já referido anteriormente, existem dois tipos principais de escoamentos contínuos: o escoamento turbulento e o escoamento laminar, que variam consoante a sua posição relativa numa escala de turbulência em que se indica o número de *Reynolds* (*Re*). Em

regime laminar o número de Re é inferior a 2300 e quando o escoamento é turbulento apresenta um número de Re elevado (superior a 2300). Entre estes dois limites o regime é de transição. O número de Re determina-se pela razão entre as forças de inércia e as forças de viscosidade e, no caso de condutas de secção circular, pode ser calculado pela seguinte equação:

$$Re = \frac{\rho VD}{\mu} = \frac{VD}{\nu}$$

em que ρ é a massa volúmica do fluido, V é a velocidade média, D é o diâmetro da conduta, μ é a viscosidade do fluido e ν é a viscosidade cinemática [41].

2.3.2. Comportamento dos fluidos

Dependendo do seu comportamento, os fluidos podem ser Newtonianos ou Não-Newtonianos.

Os fluidos Newtonianos são aqueles que mantêm a sua viscosidade em qualquer velocidade de escoamento, podendo ser considerados fluidos com viscosidade ideal, ou seja, a variação da tensão de corte em relação ao gradiente de velocidade é linear [37].

Os fluidos Não-Newtonianos são fluidos cuja viscosidade varia conforme o grau de deformação aplicado. Assim sendo, os fluidos Não-Newtonianos não apresentam viscosidade constante, pois podem não ter uma viscosidade bem definida. Estes fluidos não obedecem à lei de Newton da viscosidade. O sangue é um exemplo de um fluido Não-Newtoniano, exibindo um comportamento não linear [37].

Na Figura 9 pode observar-se o comportamento de fluidos Newtonianos e Não-Newtonianos de acordo com a variação da tensão de corte e da taxa de deformação de corte.

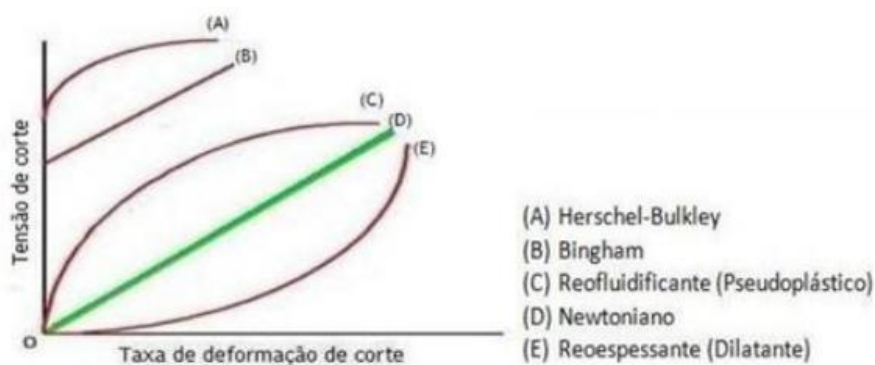


Figura 9 - Classificação de fluidos de acordo com a dependência tensão de corte vs. taxa de deformação de corte [42].

2.3.3. Velocidade de escoamento

Ao longo dos anos têm sido realizados vários estudos *in vitro* acerca da velocidade de escoamento sanguíneo que revelam resultados bastante dispersos, comprovando a complexidade deste fenómeno. Esta variabilidade de resultados deve-se ao facto de a velocidade do fluxo sanguíneo ser fortemente afetada por vários parâmetros combinados, tais como o hematócrito, o diâmetro do microcanal (quanto maior o diâmetro, menor a velocidade do sangue), a taxa de deformação, o fluido da suspensão (plasma, soro fisiológico ou dextrano), erros experimentais, entre outros [37].

Segundo um estudo efetuado por Goldsmith et al., propõe-se um perfil de velocidades que sugere que para soluções muito diluídas, com um hematócrito de cerca de 1%, o perfil se aproxime de uma parábola. No entanto, para hematócritos superiores o perfil de velocidade aparenta um perfil “pistão” (perfil horizontal perpendicular às paredes do vaso), como é possível verificar na Figura 10 [43].

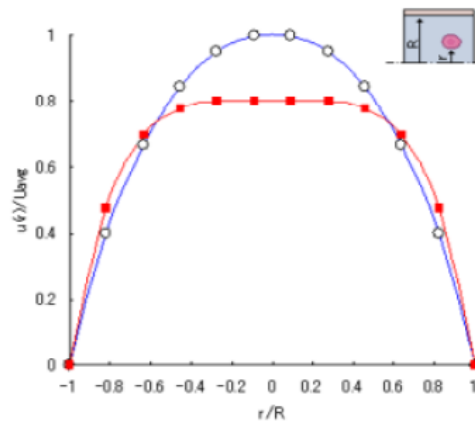


Figura 10 - Representação dos perfis de velocidades para Hct < 1% e Hct superior [37].

2.3.4. Comportamento reológico em microcanais

Ao estudar o comportamento do sangue em microcanais com diferentes diâmetros e para diferentes hematócritos (Hct) é possível observar o efeito de Fahraeus e o efeito de Fahraeus-Lindqvist [37]. No efeito de Fahraeus, que ocorre em microcanais com diâmetro inferior a 300 μm , observa-se que o comportamento sanguíneo e o hematócrito são bastante afetados, como se pode verificar na Figura 11. Este efeito mostra que para microcanais estreitos ocorre a migração axial das hemácias para o centro do microcanal e, juntos às paredes, forma-se uma camada livre de células (clc).

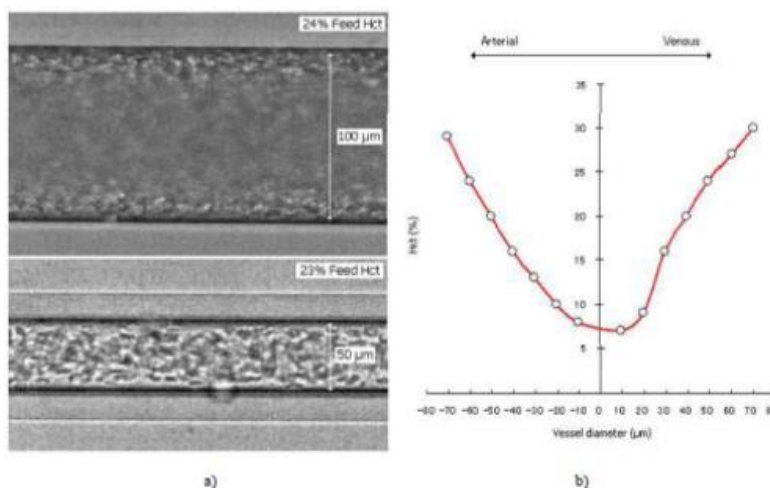


Figura 11 - a) Efeito de Fahraeus em capilares de vidro. b) Distribuição do Hct [37].

O efeito de Fahraeus-Lindqvist, que acontece em microcanais com diâmetro inferior a 300 μm , verifica-se uma diminuição da viscosidade aparente com a diminuição do diâmetro do canal. Todavia, como mostra a Figura 12, para microcanais com diâmetros inferiores a 7 μm o efeito de Fahraeus-Lindqvist é inverso devido aos eritrócitos apresentarem dificuldades em escoar em microcanais tão estreitos.

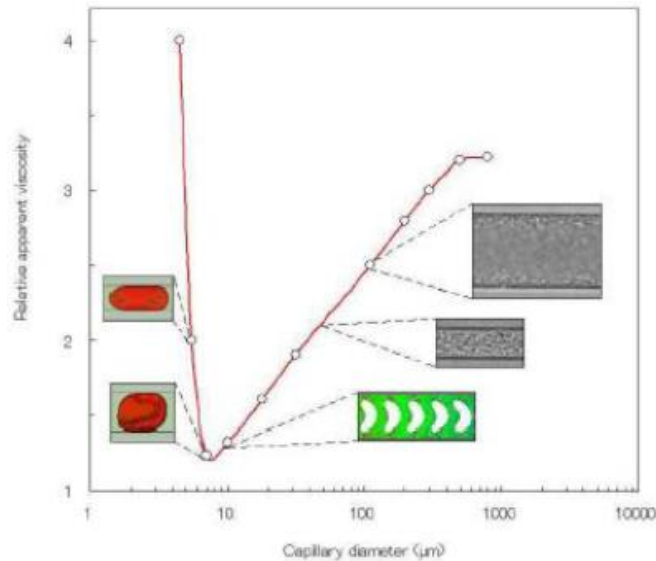


Figura 12 - Efeito de Fahraeus-Lindqvist. Variação da viscosidade em função do diâmetro do microcanal [37].

De um modo geral, o efeito de Fahraeus-Lindqvist pode ser descrito pela formação de uma camada livre de células junto às paredes do microcanal, pela diminuição do Hct e, conseqüentemente, uma diminuição da viscosidade. A existência da clc diminui o atrito entre as hemácias e as paredes do microcanal, o que leva a uma diminuição da resistência ao escoamento, reduzindo a viscosidade do sangue [37].

2.4. Deformabilidade dos Glóbulos Vermelhos

A deformabilidade dos GVs tem sido proposta como um indicador da qualidade do sangue e pode ser significativamente alterada por várias condições fisiopatológicas, afetando a pressão arterial, a viscosidade do sangue e, conseqüentemente, a circulação sanguínea.

Posto isto, foram desenvolvidas várias técnicas experimentais para medir a deformabilidade das hemácias com o objetivo de melhorar o estudo da fisiopatologia dos GVs [44-50].

Das várias técnicas para o estudo destas células, existem vários trabalhos em que os seus autores estudam a deformação e o movimento das células recorrendo ao efeito das geometrias em microcanais transparentes, fabricados através da técnica de litografia suave [51-55]. No trabalho realizado por Lima et al. é descrita a técnica de litografia suave para a fabricação de microcanais em polidimetilsiloxano (PDMS) [55].

Em contraste com a litografia suave, a xurografia é uma técnica de baixo custo utilizada para a fabricação de microcanais em PDMS [56-58]. Nesta técnica as geometrias são desenhadas, de seguida fabricam-se os moldes em vinil, utilizando uma *plotter* de corte que, posteriormente, serão usados para a fabricação de microcanais em PDMS. A xurografia é uma técnica bastante rápida e pouco dispendiosa [16].

Visto que no projeto em questão um dos objetivos é estudar o potencial da deformabilidade dos GVs como biomarcador de malária, sabe-se que estas células são mais deformáveis e têm um tamanho mais reduzido que os leucócitos, tendendo a migrar para o centro axial dos vasos devido ao gradiente de velocidade do fluxo, que por sua vez desloca os leucócitos para a parede do vaso. Hou et al. realizaram um projeto microfluídico para a separação dos GVs infetados com malária e demonstraram que as células infetadas comportam-se de forma semelhante aos leucócitos e migram em direção às paredes dos canais. Este estudo demonstrou que o hematócrito é o principal responsável pelo efeito de migração das células infetadas para as paredes dos vasos, o que permite uma separação eficiente das mesmas. A aplicação desta técnica é bastante vantajosa para o diagnóstico de doenças caracterizadas pela mudança de rigidez dos GVs [59].

É possível induzir quimicamente a rigidez dos GVs para mimetizar efeitos da malária utilizando, por exemplo, a diamida e glutaraldeído. Um estudo realizado por Rodrigues et al., apresenta um sistema microfluídico, composto por um microcanal de forma hiperbólica com uma contração, cujo objetivo era medir o índice de deformação (ID) dos GVs com o efeito destes dois químicos. Foi possível concluir que o ID dos eritrócitos tende a aumentar até que atinge o valor máximo antes da saída da contração. Os resultados mostram claramente que os GVs expostos a diamida e glutaraldeído tornam-se mais rígidos e

o seu índice de deformação diminui. Comparando estes dois químicos, o glutaraldeído tende a realizar uma redução mais eficaz na deformabilidade dos GVs do que a diamida [60].

Shin et al. investigaram a deformabilidade das hemácias e os seus efeitos na viscosidade do sangue recorrendo a um reómetro com difração de raios laser (LDSR). Expuseram os GVs com diferentes concentrações de glutaraldeído, para assim conseguirem alterar a capacidade de deformação destas células em estudo, e concluíram que quanto maior a concentração deste químico mais rígidas as hemácias se tornam, logo menos deformáveis. Os resultados obtidos com esta técnica indicam que quanto mais endurecidos são os GVs, maior a viscosidade do sangue, concluindo-se que a viscosidade é fortemente afetada pela deformabilidade dos GVs [61].

Além da diamida e do glutaraldeído, também a glucose afeta a deformabilidade das células vermelhas do sangue. O aumento da glucose causa danos nas membranas dos GVs ou até a morte dos mesmos. Vários estudos foram realizados com o intuito de determinar essa influência da glucose, concluindo que a hiperglicemia aumenta a viscosidade do sangue, aumenta a agregação eritrocitária e, assim sendo, há uma diminuição significativa da deformabilidade das hemácias [62] [63].

O trabalho de Yaginuma et al. [64] é mais uma demonstração de que o uso de dispositivos microfluídicos tem a grande vantagem de ser adequado para lidar com um conjunto de células e conseguir-se estudar a deformabilidade de apenas uma dessas células numa só execução. A capacidade de alto rendimento juntamente com a capacidade de atingir um fluxo controlado permite detetar pequenas deformações dos GVs de uma forma bastante eficiente e menos demorada do que nas técnicas de medição de deformabilidade convencionais. Com um sistema microfluídico, composto por um microcanal com uma contração hiperbólica seguida por uma expansão, pode-se obter o índice de deformação das hemácias bem como a velocidade ao longo do canal. Este estudo mostrou que os GVs são altamente deformáveis sob um forte fluxo, em que o grau de deformabilidade é altamente dependente da taxa de fluxo e apresenta um índice de deformação que converge para um valor máximo como o aumento do número de Reynolds [64].

Fazer uma avaliação correta dos fatores que atuam na deformabilidade dos GVs não é uma tarefa fácil devido à sua reduzida dimensão. Estas células, que apresentam uma

forma bicôncava, modificam-se progressivamente numa forma elíptica como resposta às forças feitas pelo escoamento sanguíneo [65].

A deformabilidade dos GVs demonstra a capacidade de estas células alterarem a sua forma, resultando essencialmente por forças aplicadas na sua superfície. Esta deformabilidade pode ser definida como a característica que faculta aos eritrócitos normais (7-8 μm de diâmetro), escoarem por capilares até 3 μm de diâmetro e representa a propriedade de adaptação dos GVs ao escoamento sanguíneo durante 120 dias, que é o tempo médio que estes permanecem na circulação [66-68].

A deformação das hemácias é dependente de diversos aspetos, como é o caso da geometria celular (dependendo da forma, do volume e da relação superfície/volume); da viscosidade interna, que advém da concentração de hemoglobina e de propriedades físico-químicas, sendo importante referir que as células desidratadas com densidade interna mais elevada apresentam uma capacidade de deformabilidade menor; e de propriedades visco-elásticas da membrana eritrocitária [66] [67] [68].

Este fenómeno da deformabilidade pode ser apontado como uma propriedade reológica dos GVs e pode ser ou não estudada isoladamente, dependendo da técnica de medição que se utiliza. Os estudos realizados sobre a deformação dos GVs têm como principal objetivo encontrar a relação experimental entre a força aplicada e a tensão da célula em termos de deformação e, para que este objetivo seja cumprido, a técnica para medir a deformabilidade tem de satisfazer dois critérios: tem de ser um fator quantificável e fisicamente definido, favorecendo uma modificação na forma do GV, e o grau de deformação tem de ser medido direta ou indiretamente de uma forma sensível e reprodutível [69].

2.4.1. Métodos de estudo da Deformabilidade dos Eritrócitos

A deformabilidade dos GVs pode ser significativamente alterada por várias condições fisiopatológicas, afetando a viscosidade do sangue e, conseqüentemente, a circulação sanguínea. Assim sendo, nos últimos anos foram desenvolvidas várias técnicas experimentais para medir a deformabilidade das hemácias com o objetivo de melhorar o estudo da fisiopatologia dos GVs.

As principais técnicas de medição da deformabilidade de hemácias individuais são:

- Aspiração por micropipeta: esta técnica tem sido extensivamente usada para medir as propriedades mecânicas das membranas dos GVs [70-72]. Este processo é executado por uma micropipeta de vidro que exerce uma pressão na membrana da célula em estudo, sendo aspirada e a quantidade dessa aspiração depende das propriedades viscoelásticas da membrana celular. Esta técnica consiste ainda na aplicação de uma pressão negativa sobre a membrana do GV, fazendo com que a célula entre no capilar de vidro. A deformabilidade pode ser visualizada por micro-cinematografia, possibilitando assim um estudo detalhado. É um processo lento e permite apenas o estudo de células individualizadas [73].

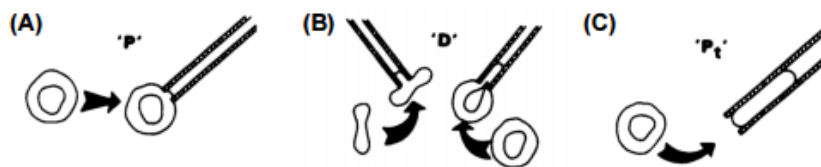


Figura 13 - Formas de aspiração da membrana das hemácias individuais [70].

Existem vários métodos de aspiração da membrana, como é possível verificar na Figura 13, em que essas técnicas de medição variam de acordo com a propriedade mecânica de interesse [70].

- Força de microscopia atômica (AFM): Este método é aplicado na avaliação quantitativa de micro deformação, particularizando uma zona específica do biomaterial [74]. Nesta técnica utiliza-se um microscópio de luz invertida que permite a visualização da superfície de interesse nas direções x, y e z [75] [76]. Dependendo da força a aplicar ou da sensibilidade do material em estudo, a sonda do AFM atua perto ou longe mediante um posicionador piezoelétrico de cerâmica que se deforma em resposta à tensão aplicada [74].

Como se pode observar na Figura 14, este método permite obter imagens topográficas dos GVs com alta resolução espacial e a estrutura do citoesqueleto da membrana [77].

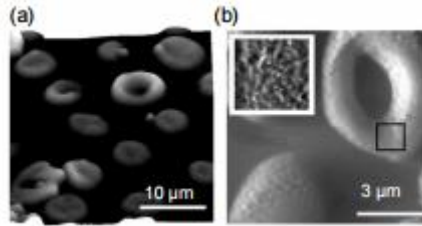


Figura 14 - a) Imagem topográfica de glóbulos vermelhos. b) Estrutura da superfície da membrana de uma hemácia [77].

- Pinça ótica: é um instrumento que utiliza lasers extremamente focalizados e a sua força de interceção é regida pelos índices de refração da amostra e o meio circundante. Este aparelho tem sido bastante utilizado em várias áreas, tais como biofísica e experiências de biologia celular, e permite a manipulação de micropartículas [78] [79].

Com todas as funções da pinça ótica, esta tem sido muito utilizada para medir as deformações das hemácias através de microesferas anexadas aos GVs, em que as microesferas estão em lados opostos da hemácia e estão ligadas por um feixe de laser que permite verificar as mudanças de diâmetro [80]; ou alongando as hemácias com feixes divergentes em direções opostas [81], em que o alongamento de células por pinça ótica é um método bastante popular para sondar a deformabilidade e extrair as propriedades elásticas das hemácias [82].

- Citometria de torção magnética: esta técnica aplica um campo magnético estático e oscilante a grânulos que estão fixos na superfície da membrana celular [83]. Dependendo do campo magnético aplicado na hemácia, os grânulos exibem um movimento translacional e rotacional, que é gravado e analisado. Como mostra a Figura 15, consoante a frequência de oscilação (0,1 a 100 Hz) e a magnitude do campo magnético aplicado (~ 1-10 Gauss), mede-se a rigidez dos GVs em diferentes frequências [84].

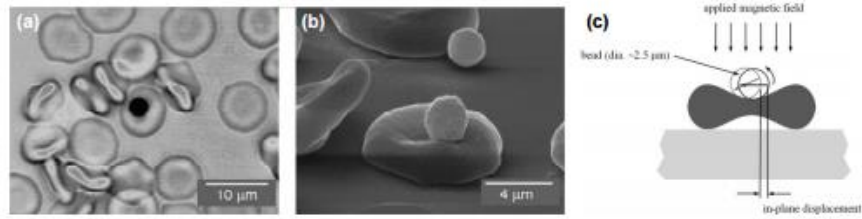


Figura 15 - (a) Exemplo de uma citometria de torção magnética. (b) Digitalização de uma imagem microscópica de hemácias com grânulos anexados. (c) Princípios da citometria de torção magnética [84].

Segundo Marinkovic et al., este procedimento revelou um drástico aumento da rigidez das hemácias infetadas pela malária na temperatura febril (41°C) [85].

- Técnica quantitativa de análise de imagem: este método permite obter interferogramas e imagens quantitativas de glóbulos vermelhos, como mostra a Figura 16 [86].

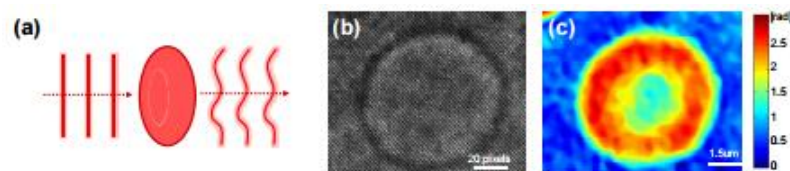


Figura 16 - (a) Esquema do princípio de uma imagem da fase quantitativa. (b) medida interferogramas. (c) imagem de uma hemácia utilizando imagens de fase quantitativa [86].

Esta técnica de imagem de fase quantitativa possibilita a medição de variações da membrana das hemácias [86-88]. O deslocamento da membrana dos GVs tem uma forte correlação com a sua deformabilidade e pode ser alterada por mudanças bioquímicas [89]. Medindo esse deslocamento da membrana das hemácias, é possível calcular o módulo de elasticidade e tensão destas células [90].

Microscopia de fase de difração é uma técnica altamente estável para a imagem latente de fase quantitativa, que tem sido amplamente utilizada para investigar a deformabilidade das hemácias. Recentemente, integrado com um modelo matemático, esta técnica fornece as propriedades mecânicas de hemácias individuais, tais como o módulo de expansão da área e viscosidade citoplasmática [91]. Também foram estudadas várias alterações na deformabilidade dos GVs, incluindo casos de malária [92].

- Ectacitometria: é uma técnica que concede a análise dos vários agentes que afetam a deformabilidade dos eritrócitos com o uso de um viscosímetro de escoamento laminar, em que as transformações da forma das hemácias são monitorizadas continuamente por um feixe de raio laser e processados por um micro computador, que determina o índice de deformabilidade. Este método viabiliza o estudo das células com diferentes condições de tonicidade, quando associadas a um gradiente de osmolalidade [93] [94] [68].

O ectacitómetro necessita apenas de uma reduzida porção de sangue e um coeficiente de variação próximo de 1%, o que aumenta a sua sensibilidade. Neste instrumento a tensão de corte é fixa, logo não há uma variação do recipiente onde a amostra é estudada, podendo-se afirmar que qualquer alteração observada depende de alterações próprias das hemácias. Segundo Johnson, quando os GVs estão em repouso, apresentam um padrão de difração circular no ectacitómetro, sucedendo a modificação elíptica e a orientação paralela ao fluxo, quando submetidos à tensão [95].

- Difusão dinâmica da luz: este procedimento fornece informações reológicas sobre os GVs [96] [97]. Apesar da difusão dinâmica da luz ser amplamente utilizada em combinação com ectacitometria, esta fornece sinais de muitas hemácias, dificultando assim o acesso a deformabilidade das hemácias individuais.

A dispersão de luz pode fornecer informações morfológicas e reológicas sobre células biológicas individuais. Analisando os sinais de difusão dinâmica da luz, é possível avaliar a tensão de superfície da membrana e a viscosidade de hemácias individuais [98]. Devido à sua capacidade de medir sinais de células individuais com alta relação sinal-ruído, esta técnica foi utilizada para estudar vários efeitos fisiopatológicos para a deformabilidade das hemácias, incluindo a infeção da malária [98] e doenças falciformes [99].

- Método de Visualização Microscópica: nesta técnica utiliza-se um viscosímetro, em que as hemácias estão suspensas num meio de grande viscosidade, como é o caso do Dextrano, e são visualizadas ao microscópio sob as divergentes forças de

corte induzidas no viscosímetro. Nestas condições, os GVs com o formato discóide passam a assumir uma forma elíptica, com o seu maior eixo, paralelo ao sentido do escoamento. Este método possibilita a observação direta das alterações da célula [100].

- Filtração: neste método as hemácias são induzidas a passar por um filtro através de uma pressão negativa e são medidos parâmetros como a velocidade de escoamento dos GVs ou, no caso de hemácias infetadas, o volume de células que atravessam o filtro num minuto. Num estudo realizado por Reid et al. [101] utilizou-se esta técnica para medir a deformabilidade de GVs e os autores afirmam que esta técnica é fiável, reproduzível e de baixo custo. No entanto, esta técnica implica um grande consumo de tempo porque é preciso aguardar que a amostra passe o filtro e, no caso de uma amostra de sangue infetado, é necessário esperar ainda mais tempo.
- Constricção ou estreitamento dos microcanais: este procedimento promove com facilidade a deformação dos eritrócitos, que por sua vez é captada através de uma câmara de alta velocidade. As imagens obtidas são gravadas para que depois possam ser analisadas com ferramentas de *software* específicas, que permitem determinar a deformabilidade das células. A forma geométrica, quer da constricção, quer da expansão do estreitamento do microcanal pode ser modificada consoante o autor. Zhao et al. [102] usaram um canal linear com uma contração abrupta seguida de uma zona de expansão também abrupta. Enquanto, Lee et al. [103], Yaginuma et al. [104] e Faustino et al. [105] utilizaram microcanais com uma contração de forma hiperbólica seguida de uma expansão. Ambos os estudos apresentaram uma alta deformabilidade dos GVs durante o escoamento pelo estreitamento.

De seguida, a Tabela 1 apresenta as principais vantagens e desvantagem dos métodos de estudo da deformabilidade dos GVs.

Tabela 1 - Principais vantagens e desvantagens das técnicas de medição da deformabilidade dos GVs.

Técnicas de medição da deformabilidade dos GVs	Vantagens	Desvantagens
Aspiração por micropipeta	Permite a medição das propriedades mecânicas e viscoelásticas das membranas dos GVs. É um método versátil e preciso.	É um processo lento e permite apenas o estudo de células individualizadas.
Força de microscopia atômica (AFM)	Permite obter imagens topográficas dos GVs com alta resolução espacial e a estrutura do citoesqueleto da membrana.	A presença de contaminantes na superfície pode conduzir a uma imagem alterada, pois esta técnica analisa apenas a camada mais superficial da amostra.
Pinça ótica	Método bastante popular para sondar a deformabilidade e extrair as propriedades elásticas dos GVs. Tem elevada sensibilidade.	Os raios refratados sofrem múltiplas refrações. Este método consome muito tempo e energia, uma vez que as células são analisadas individualmente.
Citometria de torção magnética	Aplica um campo magnético a grânulos apenas na superfície da membrana celular. Mede a rigidez dos GVs em diferentes frequências.	A miniaturização e a integração dos magnetos em sistemas microfluídicos é difícil. Implica o tratamento da superfície das células para que os grânulos e/ou marcadores magnéticos se liguem.
Técnica quantitativa de análise de imagem	Permite obter interferogramas e imagens quantitativas de GVs.	Implica equipamentos de recolha de imagens, com elevado custo.

Ectacitometria	Técnica fiável e que necessita apenas de uma reduzida porção de sangue.	Elevado custo do equipamento e elevado tempo de preparação das amostras. Técnica trabalhosa que implica um processo de manipulação das células.
Difusão dinâmica da luz	Fornecer informações reológicas sobre os GVs.	Fornecer sinais de muitas hemácias, dificultando assim o acesso a deformabilidade de GVs individuais.
Método de visualização microscópica	Possibilita a observação direta das alterações dos GVs.	Equipamento de elevado custo.
Filtração	Técnica é fiável, reproduzível e de baixo custo. O fabrico dos dispositivos é simples.	Implica um grande consumo de tempo. Quando as variações de deformabilidade são mínimas, por vezes, não conseguem ser detetadas.
Constricção ou estreitamento dos microcanais	Alta deformabilidade dos GVs durante o escoamento pelo estreitamento. Baixo custo e facilidade de fabrico dos microcanais. Análise rápida.	Pode ocorrer o entupimento dos microcanais. Requerem equipamento adicional: microscópio, câmara e computador, o que aumenta o custo associado à análise.

2.5. Velocidade dos Glóbulos Vermelhos

Como referido anteriormente, a velocidade dos GVs é um fenómeno bastante complexo e a variabilidade dos resultados deve-se ao facto de a velocidade do fluxo sanguíneo ser

fortemente afetada por vários parâmetros, sendo que, vários estudos têm sido realizados para apurar a relação existente entre a velocidade e a deformabilidade dos glóbulos vermelhos, através de canais microfluídicos com estreitamentos.

Uma vez que a malária afeta os GVs, tornando-os mais rígidos, isso leva a um aumento da viscosidade sanguínea e conseqüentemente a uma diminuição da velocidade. Um estudo realizado por Handayani et al. comprova isso mesmo. Os autores fundamentaram o seu trabalho nas diferenças entre a deformabilidade obtida com hemácias infectadas por dois tipos de malária e mediram a velocidade de escoamento em microcanais com estreitamentos de 2 μm de largura [17].

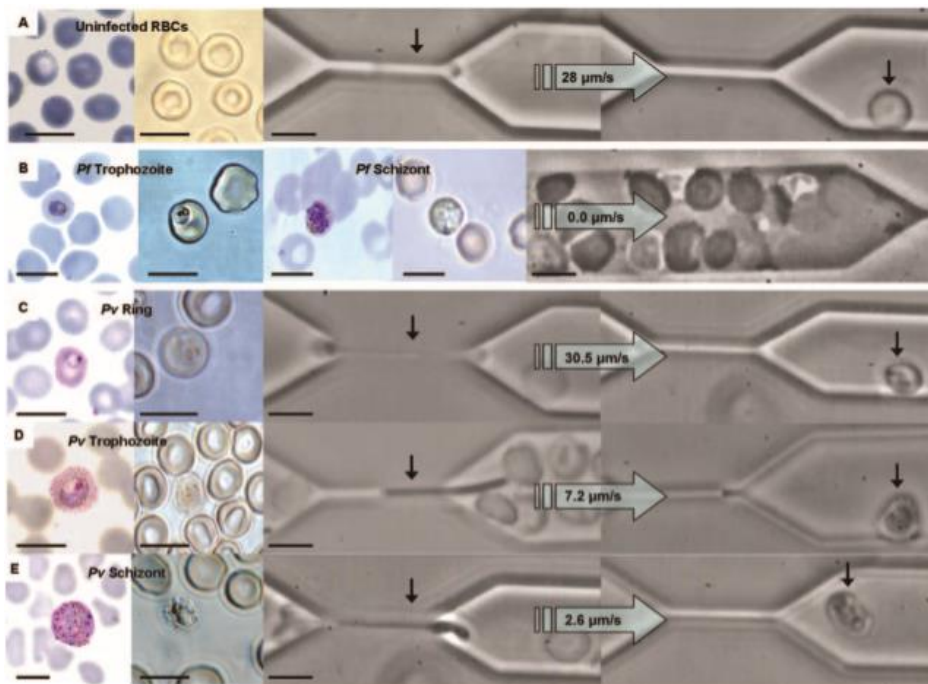


Figura 17 - Velocidades de escoamento obtidas pela passagem de GVs não infectados e GVs infectados com *P. falciparum* e *P. vivax* através de estreitamentos de 2 μm de largura. A) GVs saudáveis. B) GVs infectados por *P. falciparum* em estado trofozóite e esquizonte. C) GVs infectados por *P. vivax* em ring stage. D) GVs infectados por *P. vivax* em estado trofozóite. E) GVs infectados por *P. vivax* em estado esquizonte [17].

Na Figura 17 estão representadas as velocidades obtidas pela passagem de GVs saudáveis e GVs infectados com *P. falciparum* e *P. vivax* através de estreitamentos de 2 μm de lar-

gura. Do lado esquerdo apresentam-se imagens das amostras e do lado direito estão imagens obtidas por um microscópio de contraste de fase da passagem dos GVs pelo estreitamento.

Verificou-se uma diminuição significativa da deformabilidade das hemácias infectadas com *Plasmodium falciparum*, até que estas atingiram um estado de infecção elevado e provocaram a obstrução do estreitamento do canal. Por sua vez, as células infectadas por *Plasmodium vivax* mantiveram-se deformáveis e trespassaram o estreitamento do canal.

Estes resultados demonstram que, para estados iniciais da doença ou para infecções originadas por outros parasitas da malária, podem ser necessárias técnicas de diagnóstico complementares.

2.5.1. Métodos de medição da velocidade

Nos últimos anos têm sido desenvolvidas várias técnicas de medição da velocidade dos eritrócitos com o objetivo de contribuir para o estudo de fisiopatologias doestas células.

As principais técnicas de medição da velocidade dos GVs são:

- *Double-slit photometric (DSP)*: esta técnica consiste na medição contínua dos valores de saída obtidos por dois fotomultiplicadores ligados em dois pontos de uma imagem focada do sangue em circulação. Num estudo realizado por Wayland e Johnson, o sentido do fluxo sanguíneo é alinhado com os pontos referidos de maneira a que uma hemácia passe em ambos os pontos sucessivamente, originando uma variação no output de cada um dos fotomultiplicadores. A velocidade dos GVs é determinada a partir do tempo de atraso entre outputs semelhantes nos fotomultiplicadores [106].
- *Laser Doppler anemometer (LDA)*: este método é utilizado para a determinação da velocidade de partículas. Nesta técnica, pequenas partículas em suspensão num fluido são iluminadas por um laser e refletem parte da luz, sendo que essa luz refletida é detetada por um tubo fotomultiplicador que gera uma corrente em proporção com a energia absorvida, amplificando essa corrente [107]. *Doppler shift*

tem como definição a diferença entre as frequências da luz incidente e da luz refletida pelas partículas em movimento, e é dependente da velocidade das partículas. Segundo Seki et al. [108], através da utilização deste método é possível medir a velocidade de glóbulos vermelhos *in vivo* e *in vitro* em microvasos sanguíneos de mesentério de rato.

- Velocimetria de imagem e partículas (PIV) e/ou velocimetria de seguimento de partículas (PTV): estas técnicas fundamentam-se na análise do movimento de cada partícula individual entre cada *frame* e têm em consideração o campo de escoamento medido através de um corte bidimensional de modo a medir as velocidades das partículas [109-111]. O termo micro-PIV é utilizado em casos em que o sistema de PIV convencional é aplicado em conjunto com um microscópio de fluorescência invertido para deteção das velocidades de micropartículas quer em microcanais ou em microrreservatórios [111].

Quanto ao método de PTV, este é bastante mais simples e é utilizado principalmente em amostras com baixa densidade de partículas, permitindo medir a velocidade das mesmas ao longo do tempo. Em contrapartida, a técnica de PIV é utilizada para amostras de alta densidade e requer a utilização de técnicas e algoritmos de pós-processamento mais complexos, por vezes probabilísticos, para a identificação das partículas e determinação da sua velocidade à medida que estas se movimentam.

A Tabela 2 apresenta as principais vantagens e desvantagem dos métodos de medição da velocidade dos GVs.

Tabela 2 - Principais vantagens e desvantagens das técnicas de medição da velocidade dos GVs.

Técnicas de medição da velocidade dos GVs	Vantagens	Desvantagens
<i>Double-slit photometric</i> (DSP)	Medição precisa e com um custo por medição relativamente baixo.	Implica o alinhamento preciso dos fotomultiplicadores.

<p><i>Laser Doppler anemometer (LDA)</i></p>	<p>É fiável para medições de baixas velocidades.</p>	<p>Apresenta limitações para medições de altas velocidades, o que limita a gama de utilização. Implica calibração recorrente. O laser tem custo elevado.</p>
<p>PIV e PTV</p>	<p>É um método não intrusivo e é capaz de fornecer o sentido de deslocamento dos GVs durante o escoamento. Tem elevada sensibilidade.</p>	<p>As imagens das células têm que estar bem definidas e o algoritmo de processamento de imagem possui uma exigência computacional relativamente alta.</p>

Capítulo 3

3. Materiais e métodos utilizados

Este capítulo apresenta os materiais, equipamentos, métodos e técnicas utilizadas em laboratório para todo o processo experimental, que compreende: fabrico dos microcanais; preparação das soluções necessárias; escoamento das soluções nos microcanais e, simultaneamente, registo das imagens ou vídeos; tratamento das imagens obtidas e cálculo do índice de deformabilidade dos GVs utilizando o *software* de processamento de imagem – ImageJ; e por último o cálculo das velocidades dos GVs nos locais de interesse através do processamento das imagens previamente tratadas.

3.1. Fabrico dos microcanais

Para a realização do trabalho experimental criou-se um sistema microfluídico em que foram fabricados vários canais em polidimetilsiloxano (PDMS) com a forma apresentada na Figura 18.

Para facilitar a visualização do escoamento nos microcanais, optou-se pelo PDMS devido à sua transparência, ao seu baixo custo e, devido à sua facilidade de fabrico, permite obter microcanais com geometria de boa precisão.



Figura 18 - Desenho 2D das máscaras utilizadas para o fabrico dos microcanais, obtido no AutoCAD 2012. As regiões mais estreitas de cada máscara, na zona central do microcanal, têm larguras de 6, 8 e 10 μm , respetivamente.

Inicialmente, a geometria é desenhada através do *software* AutoCad, onde de seguida, com recurso a uma impressora, é impressa uma máscara de poliéster de alta resolução [15].

Para a fabricação do molde, primeiramente deposita-se, por centrifugação, uma fina camada de fotorresistor sobre o substrato, com o auxílio de um *spin coater*. De seguida, o fotorresistor é curado de maneira a que aconteça a evaporação do solvente e a solidificação do fotorresistor (Figura 19) [112].

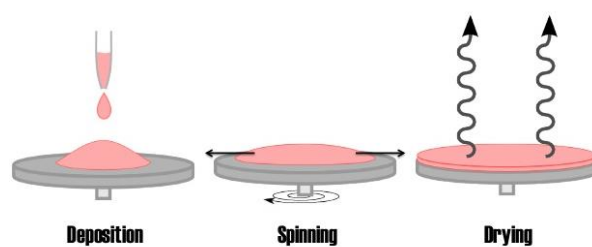


Figura 19 - Processo de aplicação do fotorresistor [113].

Após a obtenção do molde, o microcanal em PDMS foi fabricado por litografia suave nos laboratórios do Departamento de Eletrónica Industrial da Universidade do Minho. Através da mistura de dois componentes de PDMS na proporção de 10:1 (base do pré-polímero/agente de cura) resultou o pré-polímero de PDMS, que foi vazado sobre o molde e

curado no forno durante 45 minutos a 125°C. Posto isto, a estrutura curada foi destacada e selada com uma lâmina de vidro, obtendo o microcanal originado pelo padrão molde.

Por último, foram efetuados furos que correspondem à entrada e à saída de cada microcanal. Para isto utilizaram-se pontas metálicas de diâmetro interno e externo de 0,61 mm e 0,91mm, respetivamente. A Figura 20 apresenta uma fotografia de um conjunto de microcanais e a Figura 21 apresenta imagens da entrada e da saída de um microcanal observado pelo microscópio.



Figura 20 - Microcanais fabricados em PDMS.

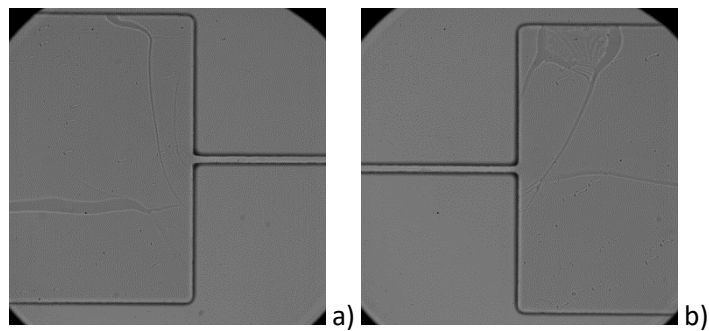


Figura 21 - Visualização ao microscópio de um microcanal com uma contração de 8 μm . a) entrada da contração do microcanal; b) saída da contração do microcanal. Objetiva: 40x.

Os microcanais fabricados apresentam três larguras diferentes de estreitamento para viabilizar a análise dos GVs em estreitamentos, quer com largura semelhante à sua dimensão média (aproximadamente 8 μm), quer com dimensões relativamente superiores (10 μm) e inferiores (6 μm). A altura dos canais deve ser reduzida, uma vez que isso impede que haja uma grande quantidade de GVs a atravessar em simultâneo os estreitamentos. Assim

sendo, os canais apresentam uma altura de 25 μm para facilitar a determinação das velocidades e das deformabilidades.

A Figura 22 apresenta a máscara de um microcanal e identifica as diferentes zonas de circulação de GVs, cujas dimensões são identificadas na Tabela 3.

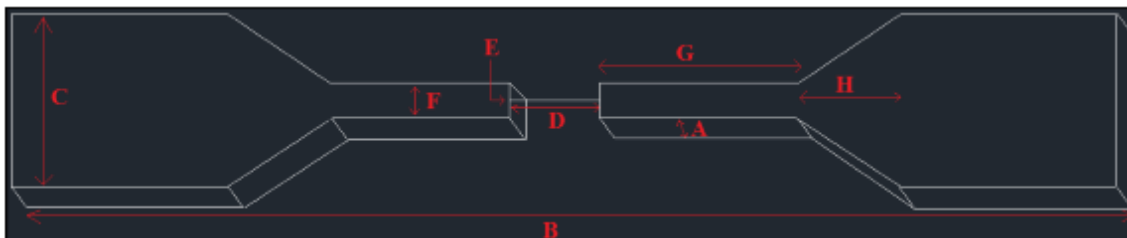


Figura 22 - Desenho tridimensional de um microcanal com letras de identificação das diferentes regiões de circulação dos GVs.

Tabela 3 - Características dos microcanais fabricados. As letras correspondem às diferentes zonas representadas na Figura 22.

Características dos microcanais fabricados	
Altura dos canais (A)	25 μm
Comprimento total do canal (B)	12,8 mm
Largura total do canal (C)	2 mm
Comprimento dos estreitamentos (D)	780 μm
Largura dos estreitamentos (E)	6, 8 e 10 μm
Largura da região de transição (F)	400 μm
Comprimento da região de transição (G)	2 mm
Comprimento da região de afunilamento (H)	1,2 mm

3.2. Soluções utilizadas

Numa fase inicial do trabalho experimental foi utilizado sangue ovino com um Hct de 1%. Não serão apresentados resultados relativamente a esta solução uma vez que foi utilizada apenas numa fase inicial de aprendizagem de preparação de soluções e das ferramentas de *software* utilizadas. Todos os resultados apresentados serão respeitantes a amostras de sangue humano.

3.2.1. Sangue saudável

Para a realização dos ensaios experimentais foi utilizado sangue humano. Após a colheita do sangue (amostras cedidas pelo Instituto Politécnico de Bragança e pelo Instituto Português do Sangue e da Transplantação - Porto) realizou-se uma centrifugação da amostra durante 15 minutos a 2000 rpm para separar os glóbulos vermelhos dos restantes constituintes do sangue, como se pode observar na Figura 23.

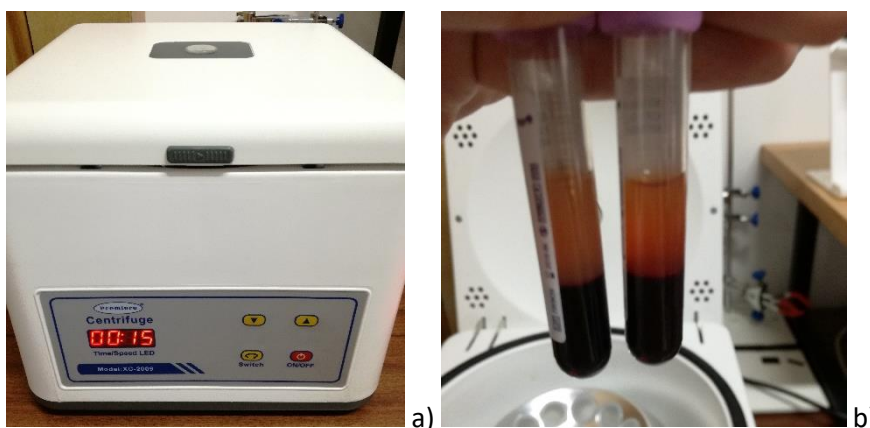


Figura 23 - (a) Centrifugadora do sangue; (b) Visualização da separação dos GVs dos restantes constituintes do sangue após a centrifugação.

Após a centrifugação, com recurso a uma micropipeta, retirou-se a parte superior correspondente ao plasma (zona amarelada) com bastante cuidado para não retirar glóbulos vermelhos. De seguida, acrescentou-se soro fisiológico aos GVs em volumes iguais (1:1)

e repetiu-se novamente a centrifugação, de modo a obter os GVs separados dos restantes componentes do sangue, como mostra a Figura 24.

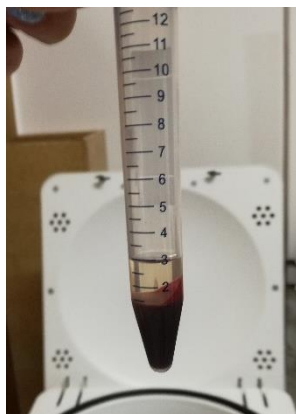


Figura 24 - Visualização das camadas de separação dos GVs dos restantes constituintes da amostra após a centrifugação.

Na fase seguinte preparou-se o Dextrano40 através da mistura de 68 μL de CaCl_2 com 201 μL de KC , 7,35 mL de NaCl e 5 g de Dex40 (para uma solução de 1M). Esta solução foi usada para suspender o volume pretendido de hemácias e tem como principal objetivo manter as condições fisiológicas ótimas para os GVs (condições osmóticas e de sedimentação).

Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur colocou-se num tubo de Falcon um pouco de Dextrano40 para, posteriormente, com o auxílio de uma micropipeta, colocar a quantidade de sangue necessária, conforme o hematócrito que se pretende estudar. Neste estudo foi usado 0,5 % de Hct, ou seja 0.5% de volume de GVs num volume total de 5 mL da amostra.

3.2.2. Glutaraldeído

As soluções de GVs foram modificadas com diferentes percentagens em volume de glutaraldeído (0; 0,00625; 0,0125; 0,025; 0,08) (Sigma-Aldrich). Para isto, os GVs foram re-

suspensos e lavados duas vezes em soro fisiológico com uma concentração de 0,9% durante 15 minutos a 2000 rpm. De seguida, as células foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente, lavadas novamente em PSS e re-suspensas em Dextrano40. Depois retirou-se o volume que se pretendia estudar, acrescentando as percentagens de glutaraldeído para um volume final da amostra de 5 mL.

3.2.3. Diamida

As soluções de GVs foram modificadas com diferentes percentagens em volume de diamida (0; 0,00625; 0,0125; 0,025; 0,08; 0,32 e 1) (Sigma-Aldrich). A preparação destas amostras foi realizada da mesma forma que as amostras de glutaraldeído anteriormente referidas, mudando apenas o químico, sendo neste caso a diamida.

3.2.4. Glucose

Outra solução utilizada para a alteração da rigidez dos GVs foi uma solução com glucose. Para a preparação desta amostra, inicialmente foi necessário preparar uma solução tampão *phosphate buffered saline* (PBS: pH 7.4), para diluir a glucose.

Seguidamente, as soluções foram alteradas com diferentes concentrações de glucose (2%, 5%, 10% e 20%) e foram incubadas durante 20 minutos à temperatura ambiente. De seguida as células foram lavadas com soro fisiológico de forma a remover os restos de glucose na amostra.

3.3. Equipamento de visualização dos escoamentos em microcanais

Para a visualização da atividade experimental foi utilizado um microscópio invertido Olympus IX71 e uma câmara de alta velocidade Phantom v7.1. Estes e outros equipamentos constam da Figura 25, da Figura 26 e da Figura 27.

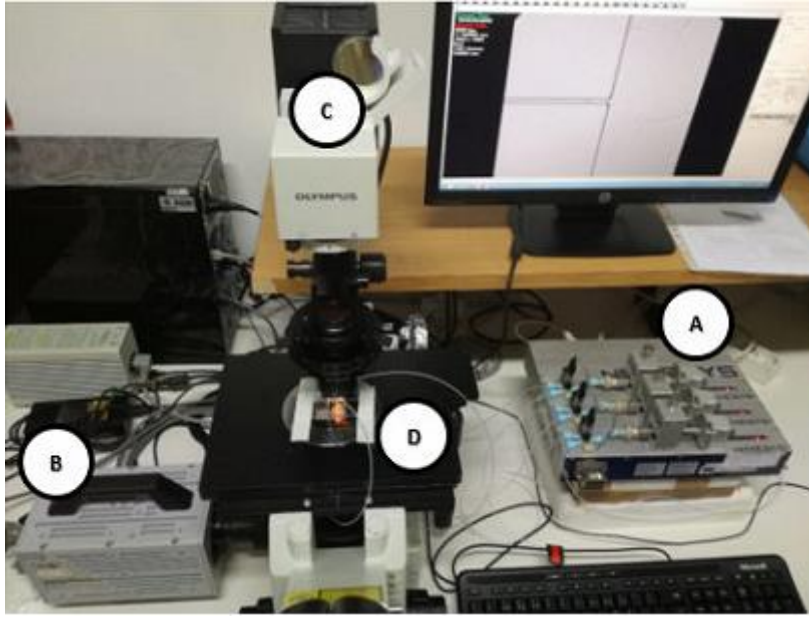


Figura 25 - Circuito utilizado para o escoamento sanguíneo. A) Bomba de seringa; B) Câmara de alta velocidade; C) Microscópio invertido; D) Microcanais fabricados



Figura 26 - Sistema de bombeamento (NEMESYS Syringe Pump).

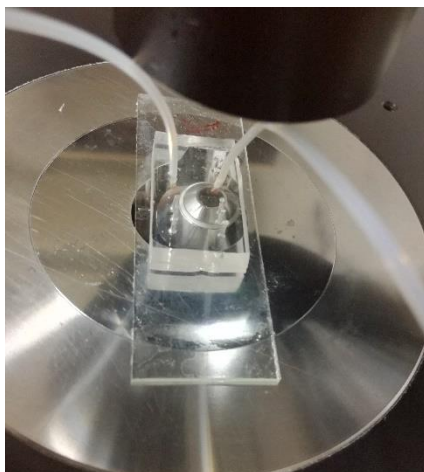


Figura 27 - Detalhe da ligação dos tubos à entrada e à saída do microcanal.

3.4. Software de análise de imagem

Após a obtenção das imagens transferidas da câmara de alta velocidade para o computador, estas foram tratadas e analisadas recorrendo a duas ferramentas de *software*, nomeadamente, ImageJ e Pivlab. O ImageJ foi utilizado para o pré-tratamento das imagens e para a análise das dimensões dos GVs para posterior cálculo do índice de deformação. O Pivlab foi usado para determinar as velocidades das células em estudo.

3.4.1. ImageJ

De forma a tratar as imagens obtidas, nomeadamente, reduzir o ruído, eliminar artefactos e convertê-las em imagens binárias utilizou-se o software ImageJ [114] [115]. A interface gráfica deste software está representada na Figura 28.

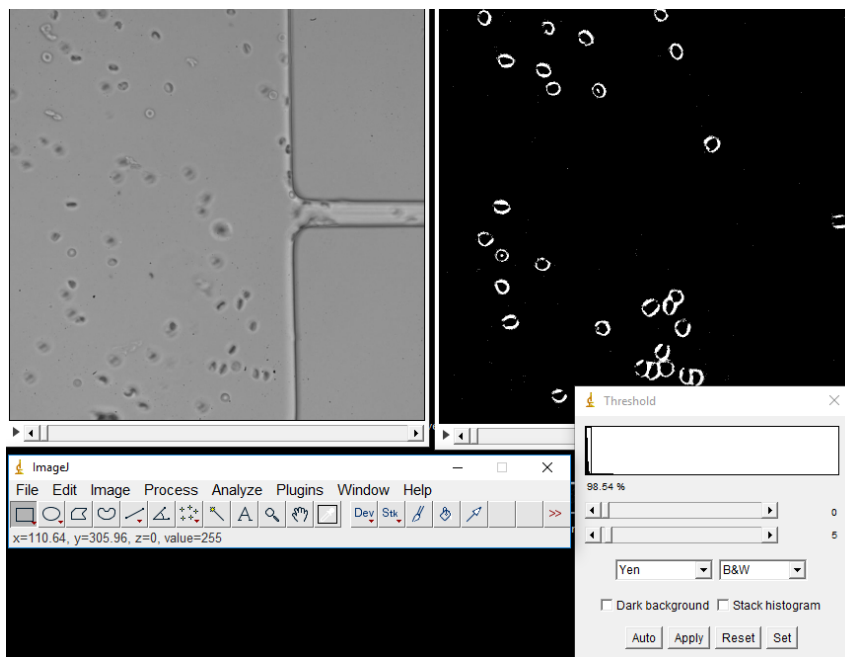


Figura 28 - Interface gráfica de utilizador do programa ImageJ.

Como já referido anteriormente, o ImageJ foi usado para realizar um tratamento das imagens obtidas e determinar a deformabilidade dos GVs. Para isto, começou-se por importar a sequência de imagens pretendida com um incremento de uma imagem e através da função *Crop* definiu-se a região de interesse (entrada e a saída do estreitamento abrupto dos microcanais), como mostra a Figura 29.

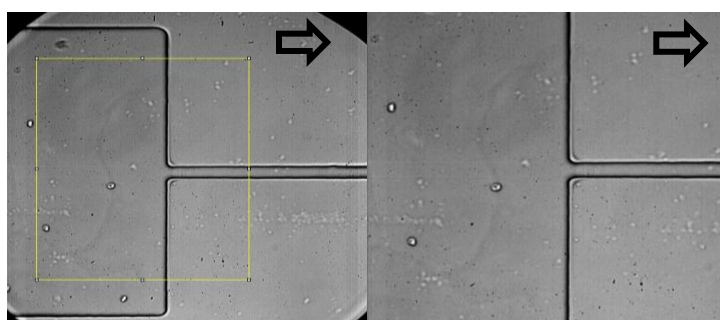


Figura 29 - Exemplo de um recorte da zona de interesse (308 x 332 μm) na entrada do estreitamento do microcanal utilizando a função *Crop* (as setas indicam o sentido do fluxo).

De seguida, recorreu-se à função *Z-Project*, para a criação da média da imagem original. Posto isto, por meio da função *Image Calculator*, a sequência de imagens sob análise

foram subtraídas pela média, eliminando todos os objetos estáticos, como por exemplo as paredes dos microcanais. Após esta etapa, as imagens resultantes apresentam apenas os GVs visíveis que, através da função *threshold*, foram convertidas em imagens binárias, tendo-se especial cuidado com esta função, pois permite ainda delinear os GVs sem que estes percam a sua configuração inicial.

Posteriormente, com recurso à função *ROI Manager* foi possível realizar o seguimento dos GVs saudáveis e modificados, como está representado na Figura 30.

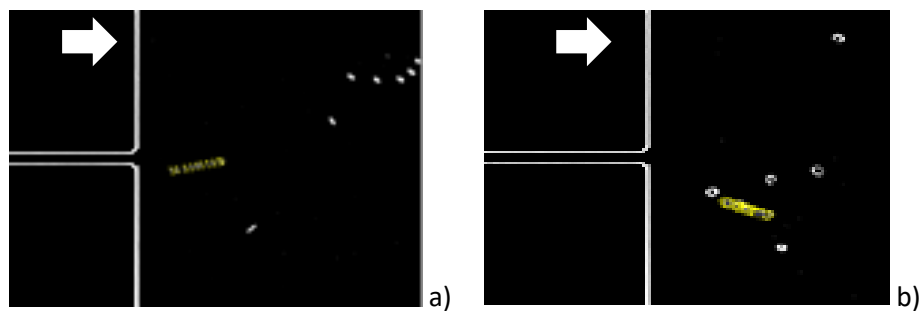


Figura 30 - Seguimento dos GVs na saída da contração de 10 μm . a) GVs não modificados; b) GVs modificados com 0,08% de glutaraldeído.

Através do seguimento das células e da função *Measure* do ImageJ, obteve-se um ficheiro que com a informação da posição (x, y) e o tamanho do maior (X) e menor (Y) eixo dos GVs, considerando as células com uma forma elipsoide.

Posto isto, é possível calcular o índice de deformação definido pela equação 1, onde X e Y correspondem, respetivamente, ao maior e menor eixo da elipse que representa o GV em análise. Os valores de ID das hemácias variam entre 0 e 0,8 em que as células que apresentam um ID de 0 são células não deformadas (rígidas) e as células que apresentam um ID de 0,8 são células totalmente deformadas com um alongamento máximo. As curvas do ID abrangem informação sobre a área de superfície dos GVs, a razão entre a área de superfície/volume e a viscosidade interna [116].

$$ID = \frac{(X - Y)}{(X + Y)} \quad (1)$$

3.4.2. PivLab

Após a obtenção das imagens pré-tratadas no *software* anteriormente referido, estas foram analisadas através do *software* de análise de imagem PivLab, integrado no Matlab [117] [118]. Através deste programa é possível determinar os valores da velocidade média dos GVs à entrada e à saída dos estreitamentos nos canais microfluídicos. A interface de utilização deste *software* está apresentada na Figura 31.

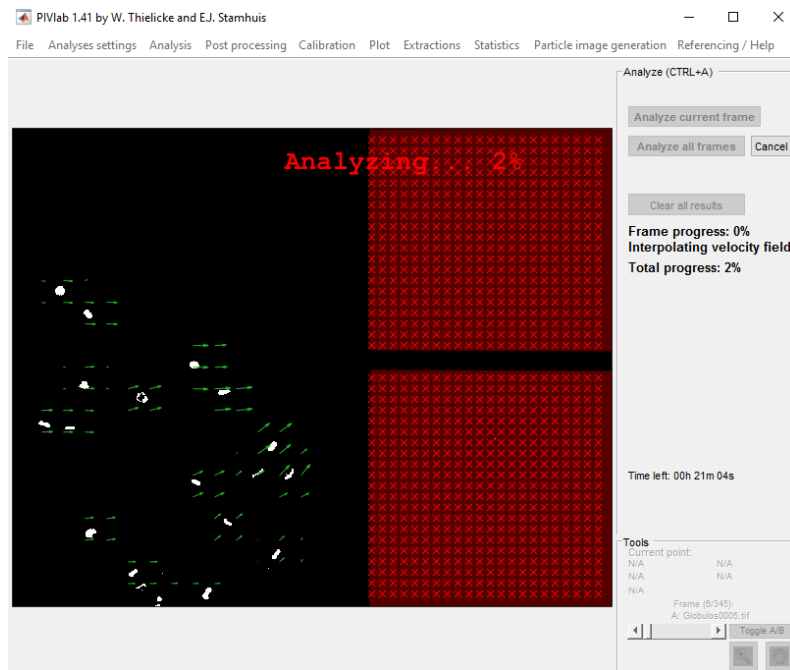


Figura 31 - Interface gráfica do utilizador do software PivLab.

Primeiramente as imagens são importadas para o *software* e calibradas em termos de dimensões e de intervalos temporais entre *frames*. No exemplo representado na Figura 32, foi aplicada uma calibração de dimensão real de 0,006 mm (que corresponde ao estreitamento do microcanal) e um intervalo entre imagens de 0,5 ms.



Figura 32 - Aplicação da calibração na entrada do canal de 6 μm .

De seguida, são aplicadas máscaras de exclusão em zonas em que não há a passagem de GVs, ficando apenas com a área de interesse. A Figura 33 mostra um exemplo da aplicação dessas máscaras.

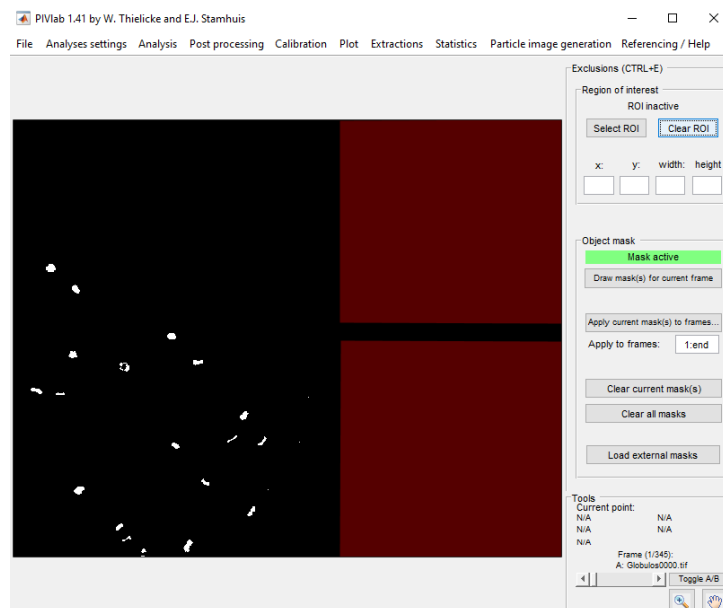


Figura 33 - Aplicação das máscaras de exclusão na entrada do canal de 6 μm .

Posto isto, realizou-se a análise do movimento das células entre todas as *frames* e calcularam-se as velocidades instantâneas pela variação da distância percorrida pelos GVs entre cada intervalo de tempo.

A partir das várias velocidades instantâneas, calcularam-se os vetores médios, assim como os valores da velocidade de escoamento nas direções x e y e determinou-se o campo de velocidades de cada amostra. Por fim, as componentes x e y da velocidade média para cada pixel analisado foram exportadas para o Microsoft Excel e os valores globais da velocidade de escoamento foram calculados com base na equação 2.

$$|U_{xy}| = \sqrt{U_x^2 + U_y^2}$$

Foi possível constatar que nas áreas de interesse, entrada e saída dos estreitamentos dos microcanais, a velocidade dos GVs atingia o valor máximo, enquanto nas regiões do canal mais afastadas das zonas de alteração brusca de geometria a velocidade era consideravelmente menor. Assim, os valores de velocidade de cada amostra foram obtidos pela média dos valores dos 1000 pixels da imagem da região com maior velocidade. Este critério de seleção dos 1000 valores foi estabelecido devido a cada imagem analisada no PivLab conter 3970 elementos e, ao optar pelos 1000 valores, são eliminadas todas as zonas menos relevantes, pois apresentam uma velocidade menor, garantindo ao mesmo tempo que valores isolados não serão considerados. Por conseguinte, a velocidade de cada elemento da imagem foi importada para o Microsoft Excel, ordenada por ordem decrescente, sendo selecionados apenas os 1000 primeiros valores e calculado o seu valor médio.

Capítulo 4

4. Resultados e discussão

Ao longo deste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos pelo processamento dos dados registados durante o trabalho laboratorial desenvolvido.

4.1. Estudo da deformabilidade dos GVs

A determinação da deformabilidade dos GVs nos microcanais de PDMS seguiu os passos indicados no capítulo dos materiais e métodos utilizados (secção 3.4.1).

Não foi possível realizar um estudo completo da análise da deformabilidade dos GVs uma vez que não se executou o estudo das células no interior do estreitamento dos microcanais. Com o equipamento disponível, não foi possível obter uma combinação de parâmetros capazes de captar imagens no interior do estreitamento em que os GVs estivessem suficientemente nítidos para se conseguirem distinguir após a binarização da imagem. Assim, as medições de deformabilidade foram feitas apenas nas zonas da entrada e saída dos estreitamentos dos microcanais.

4.1.1. GVs alterados com glutaraldeído

A Figura 34, a Figura 35 e a Figura 36 apresentam os resultados dos índices de deformabilidade obtidos experimentalmente em função de diferentes percentagens de glutaraldeído nos canais com estreitamentos de 6, 8 e 10 μm de largura, respetivamente, com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Nas amostras em que os canais entupiram, a deformabilidade dos GVs foi considerada zero uma vez que não foi possível obter informação deste parâmetro.

Os restantes resultados com os diferentes caudais utilizados (0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$, 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 5 $\mu\text{L}/\text{min}$) estão apresentados no Anexo 1.

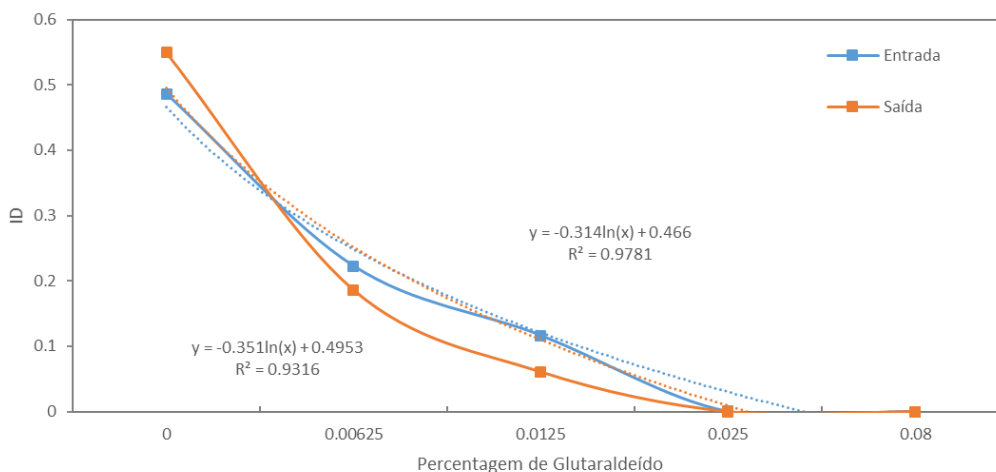


Figura 34 - Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glutaraldeído utilizado na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.

Os resultados apresentados na Figura 34 foram obtidos utilizando o microcanal com o estreitamento de 6 μm . Através da análise do gráfico previamente apresentado é possível verificar que os GVs expostos ao glutaraldeído tornam-se mais rígidos e o seu ID diminui, quando comparados com os GVs saudáveis, que apresentam um ID mais elevado. À medida que se aumenta a concentração deste químico, as células vão endurecendo e, consequentemente, tornam-se menos deformáveis.

Também é possível observar que para as duas concentrações de glutaraldeído mais elevadas (0,025% e 0,08%) houve um entupimento do microcanal, como mostra o exemplo da Figura 37 a) e b), uma vez que as células não conseguiam deformar-se o suficiente para atravessar o canal mais estreito. Os resultados permitem ainda observar que o comportamento do ID dos GVs encontra-se muito próximo da linha de tendência logarítmica (R^2 de 0,9316 e 0,9781).

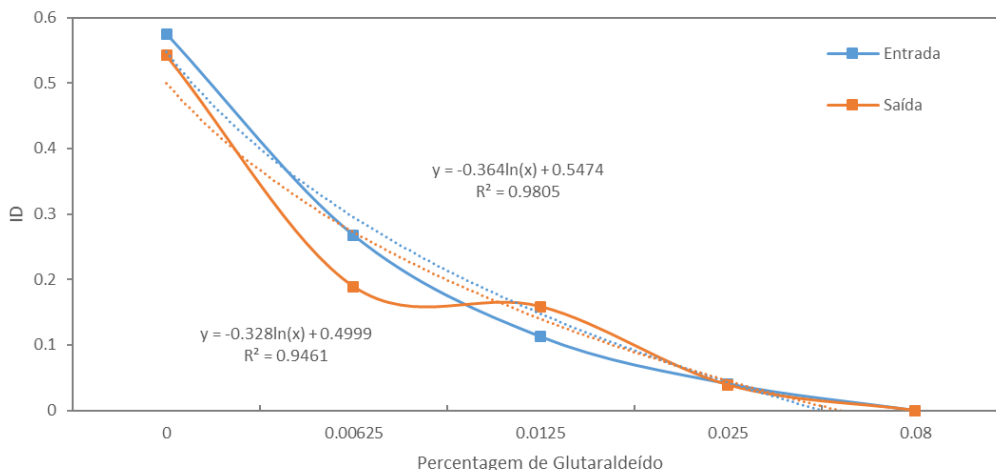


Figura 35 - Variação do ID (adimensional) em função da porcentagem de glutaraldeído utilizado na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 8 µm de largura. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.

No caso apresentado na Figura 35, o canal utilizado foi o microcanal com o estreitamento de 8 µm e os resultados são semelhantes aos resultados anteriormente apresentados, uma vez que se observa uma diminuição do ID com o aumento da concentração de glutaraldeído, tal como esperado. Verificou-se também que os GVs expostos a uma concentração de 0,08% de glutaraldeído não foram capazes de atravessar o estreitamento. Uma vez mais, foram obtidos valores de R^2 bastante elevados, que provam a aproximação significativa dos resultados à linha de tendência.

Neste caso utilizou-se o microcanal com um estreitamento de 10 µm. Através da análise da Figura 36, verifica-se que foi possível calcular o ID dos GVs para todas as concentrações de glutaraldeído, sendo que para a menor concentração deste químico o ID apresenta o valor mais alto e para a maior concentração o ID apresenta o valor mais baixo, tal como esperado e observado nos canais de 6 e 8 µm. De um modo geral, para os três canais analisados, observa-se que a variação da deformabilidade dos GVs quando alterados com glutaraldeído tem um comportamento muito próximo de uma função logarítmica.

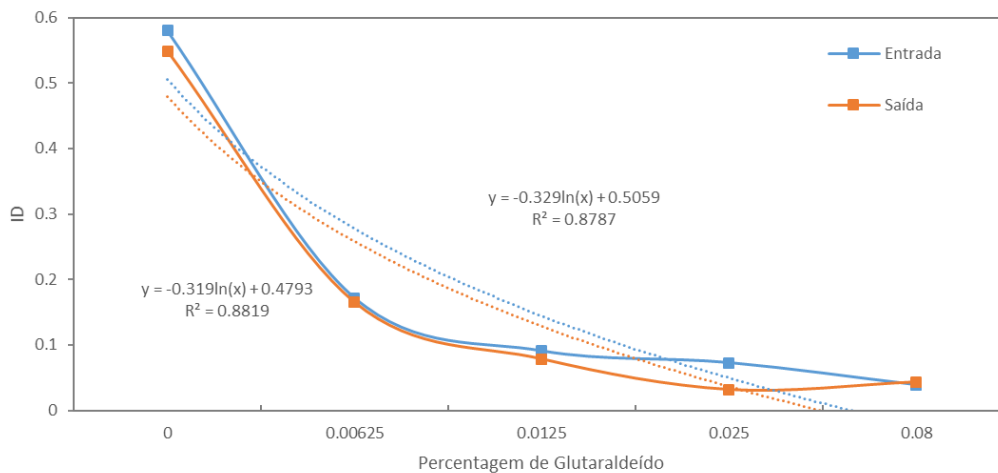


Figura 36 - Variação do ID (adimensional) em função da porcentagem de glutaraldeído utilizado na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 10 μm de largura. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.

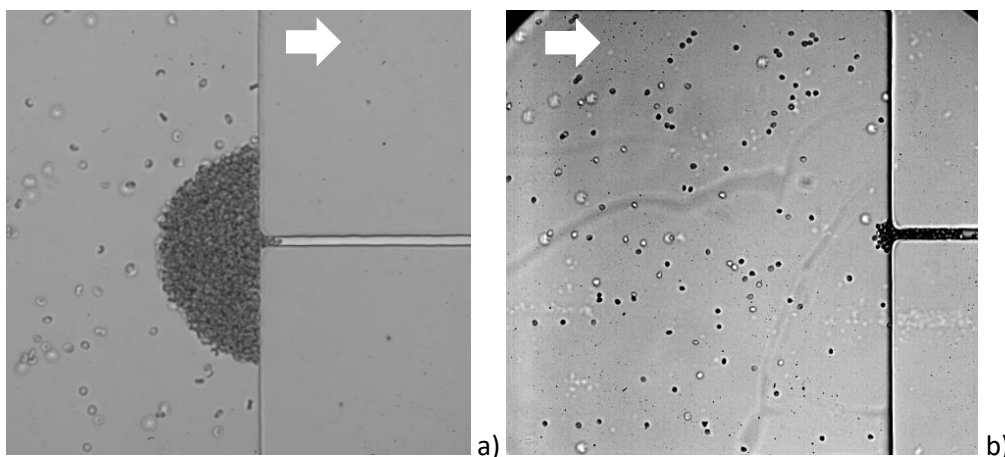


Figura 37 – Entupimento do microcanal na entrada da contração de 6 μm . a) com GVs expostos a uma concentração de 0,025% de glutaraldeído; b) com GVs expostos a uma concentração de 0,08% de glutaraldeído.

Na Figura 35 e na Figura 36 é possível verificar que os GVs saudáveis (porcentagem 0% nos gráficos) apresentam um valor de ID superior na entrada relativamente à saída. Isto sustenta a ideia de que na entrada de um estreitamento abrupto as hemácias iniciam um processo de deformação para conseguirem atravessar o estreitamento, aumentando assim o ID, e na saída as células recuperam rapidamente a sua forma original, e consequentemente o ID diminui. Na Figura 34 é possível verificar que o ID das células saudáveis é superior na saída contrariando a explicação anteriormente apresentada. Uma possível jus-

tificação para este acontecimento pode ser o facto de o seguimento dos GVs ter sido efetuado um pouco antes da entrada e assim, não foi possível obter a informação da posição em que a célula estava totalmente deformada.

4.1.2. GVs alterados com diamida

A Figura 38, a Figura 39 e a Figura 40 apresentam os resultados dos índices de deformabilidade obtidos experimentalmente em função de diferentes percentagens de diamida nos canais com estreitamentos de 6, 8 e 10 μm de largura, respetivamente, com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Os restantes resultados com os diferentes caudais utilizados (0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$, 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 5 $\mu\text{L}/\text{min}$) estão apresentados no Anexo 2.

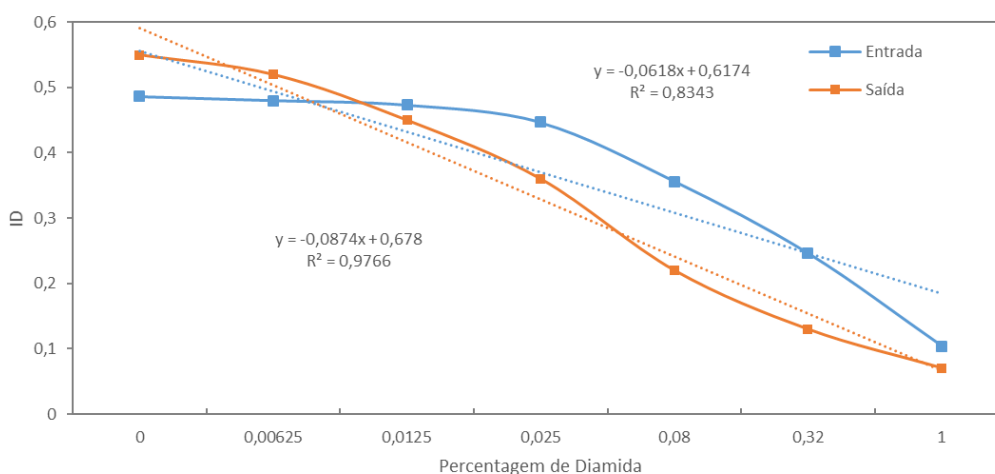


Figura 38 - Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de diamida utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A traçado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.

Os resultados apresentados na Figura 38 foram obtidos utilizando o microcanal com o estreitamento de 6 μm . Através da análise do gráfico é possível verificar que os GVs expostos a baixas concentrações de diamida não sofrem grandes alterações enquanto que para as concentrações mais elevadas os GVs tornam-se mais rígidos e o seu ID diminui. À medida que se aumenta a concentração deste químico, as células vão endurecendo e, conseqüentemente, tornam-se menos deformáveis.

Os resultados permitem ainda observar que o comportamento do ID dos GVs encontra-se muito próximo da linha de tendência linear.

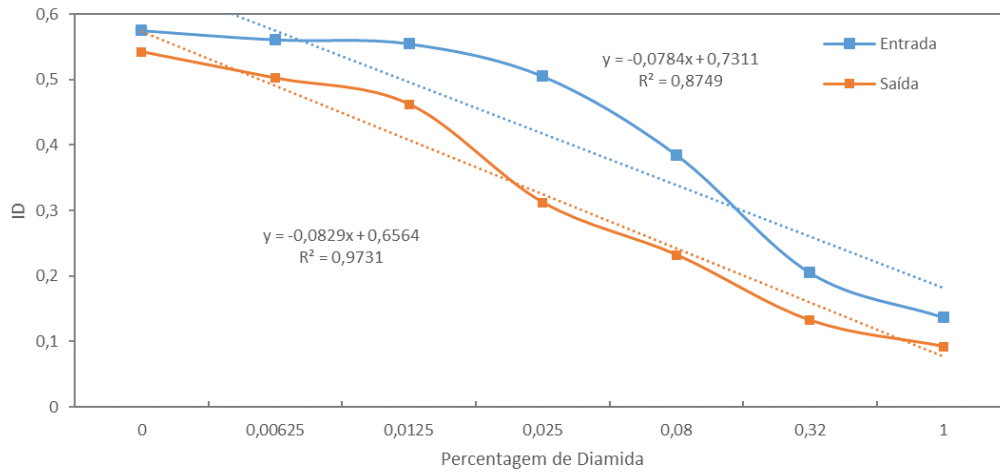


Figura 39 - Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de diamida utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 8 µm de largura com um caudal de 3 µL/min. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.

No caso apresentado na Figura 39, o canal utilizado foi o microcanal com o estreitamento de 8 µm e os resultados são semelhantes aos resultados anteriormente apresentados, uma vez que só se observa uma diminuição do ID para as concentrações de diamida mais elevadas, tal como esperado. Uma vez mais, foram obtidos valores de R^2 bastante elevados, que provam a aproximação significativa dos resultados à linha de tendência (R^2 de 0.8749 e 0.9731).

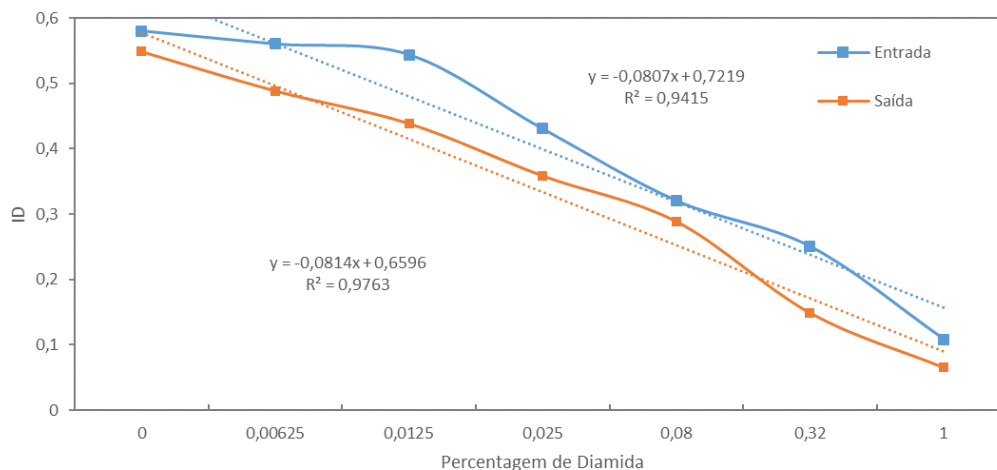


Figura 40 - Variação do ID (adimensional) em função da porcentagem de diamida utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. As tracejadas estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.

Neste caso utilizou-se o microcanal com um estreitamento de 10 μm . Através da análise da Figura 40, verifica-se que para a menor concentração deste químico o ID apresenta o valor mais alto e para a maior concentração o ID apresenta o valor mais baixo, tal como esperado e observado nos canais de 6 e 8 μm . Novamente, os resultados permitem observar que o comportamento do ID dos GVs encontra-se muito próximo da linha de tendência linear (R^2 de 0.9415 e 0.9763). De um modo geral, para os três canais analisados, observa-se que a variação da deformabilidade dos GVs quando alterados com diamida tem um comportamento próximo de uma função linear.

4.1.3. GVs alterados com glucose

A Figura 41, a Figura 42 e a Figura 43 apresentam os resultados dos índices de deformabilidade obtidos experimentalmente em função de diferentes porcentagens de glucose nos canais com estreitamentos de 6, 8 e 10 μm de largura, respectivamente, com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Os restantes resultados com os diferentes caudais utilizados (0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$, 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 5 $\mu\text{L}/\text{min}$) estão apresentados no Anexo 3.

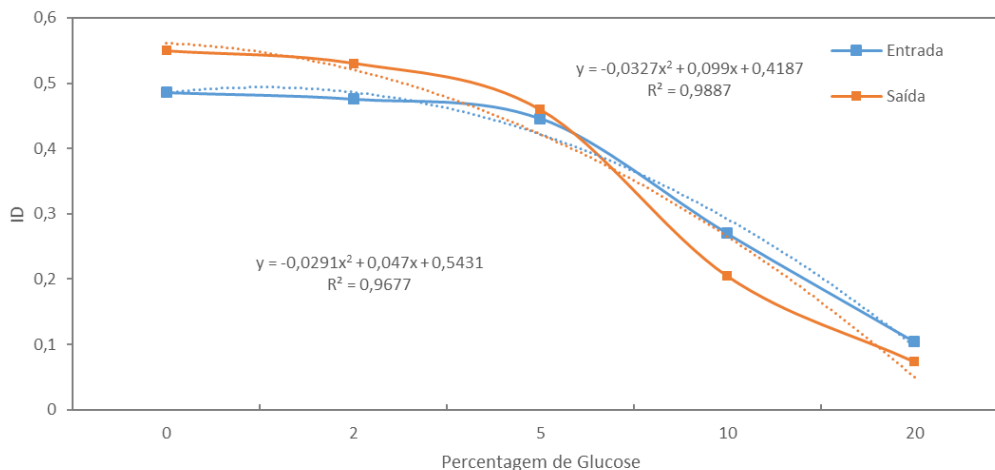


Figura 41 - Variação do ID (adimensional) em função da porcentagem de glicose utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 6 µm de largura com um caudal de 3 µL/min. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.

Os resultados apresentados na Figura 41 foram obtidos utilizando o microcanal com o estreitamento de 6 µm. Através da análise do gráfico é possível verificar que os GVs expostos a baixas concentrações de glicose (0%, 2% e 5%) não sofrem grandes alterações enquanto que para as concentrações mais elevadas (10% e 20%) os GVs tornam-se mais rígidos e o seu ID diminui. À medida que se aumenta a concentração deste químico, as células vão endurecendo, logo tornam-se menos deformáveis.

Também é possível observar que o comportamento do ID dos GVs encontra-se muito próximo da linha de tendência polinomial de grau 2 (R^2 de 0.9677 e 0.9887).

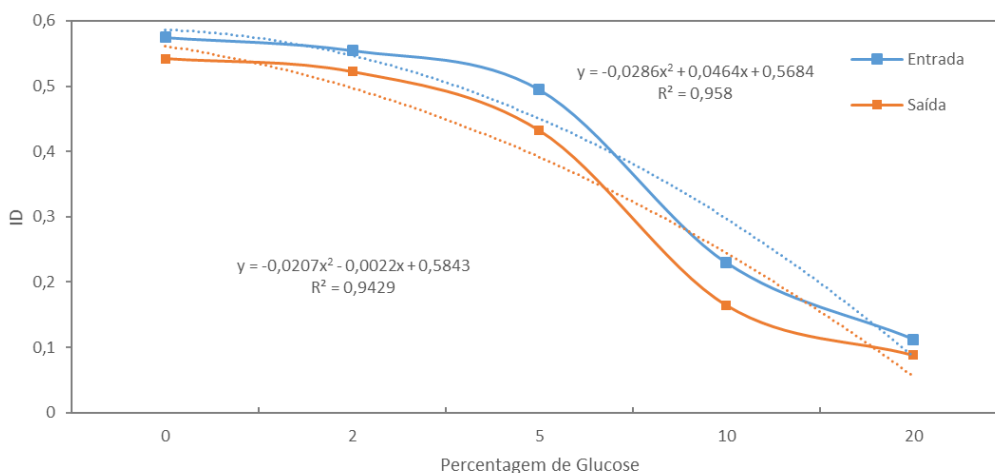


Figura 42 - Variação do ID (adimensional) em função da porcentagem de glicose utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 8 µm de largura com um caudal de 3 µL/min. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.

No caso apresentado na Figura 42, o canal utilizado foi o microcanal com o estreitamento de 8 μm e os resultados são semelhantes aos resultados anteriormente apresentados, uma vez que só ocorre uma diminuição acentuada do ID para as concentrações de glucose mais elevadas, tal como esperado. Mais uma vez, o comportamento do ID dos GVs encontra-se muito próximo da linha de tendência.

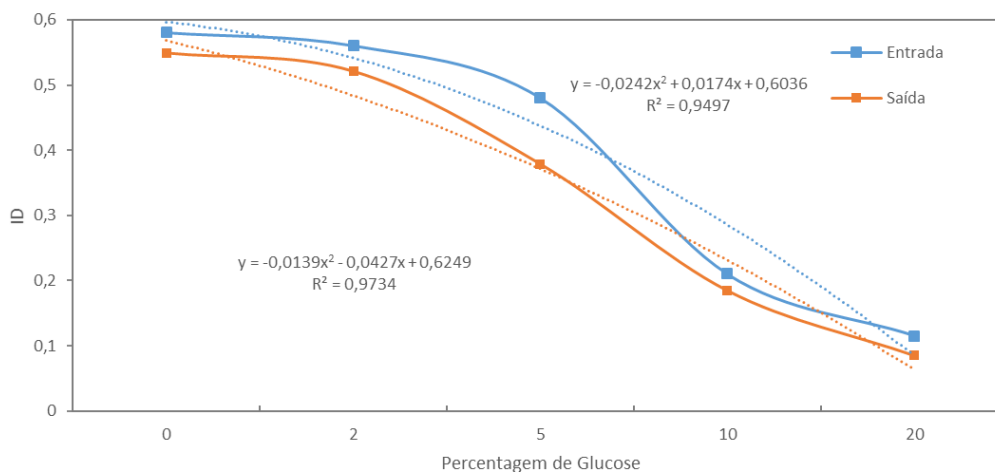


Figura 43 - Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glucose utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A traçado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.

Neste caso utilizou-se o microcanal com um estreitamento de 10 μm . Através da análise da Figura 43, verifica-se que para a menor concentração deste químico o ID apresenta o valor mais alto e para a maior concentração o ID apresenta o valor mais baixo, tal como esperado e observado nos canais de 6 e 8 μm . Foram obtidos novamente valores de R^2 bastante elevados, que provam a aproximação significativa dos resultados à linha de tendência. Assim, observa-se que, para os três canais analisados, a variação da deformabilidade dos GVs quando alterados com glucose tem um comportamento que pode ser representado por uma função polinomial quadrática.

4.2. Estudo da velocidade dos GVs

A determinação da velocidade dos GVs nos microcanais de PDMS seguiu os passos indicados no capítulo dos materiais e métodos utilizados (secção 3.4.2).

Neste trabalho, e tal como nos ensaios da deformabilidade, o tratamento dos GVs com diferentes percentagens de diferentes químicos pretendia mimetizar os diferentes estágios da malária, sendo que maiores percentagens implicariam maior rigidez dos GVs. Com isto pretendia-se verificar se o aumento da rigidez alterava a velocidade de escoamento dos GVs, e no caso de o fazer, se havia alguma relação entre as duas propriedades.

Através deste estudo pode-se verificar que a velocidade dos GVs é significativamente superior na zona do estreitamento, como mostra a Figura 44 e a Figura 45, pelo que se pode concluir que a transição abrupta provoca o aumento da velocidade dos GVs.

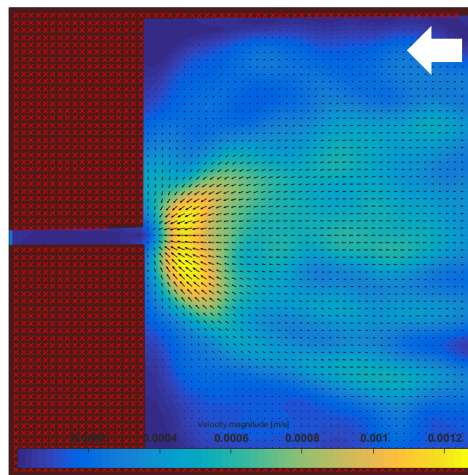


Figura 44 - Distribuição da velocidade dos GVs saudáveis num canal com um estreitamento de 6 μm . A seta indica o sentido do fluxo. A zona representada a amarelo demonstra valores de velocidade superiores às restantes zonas.

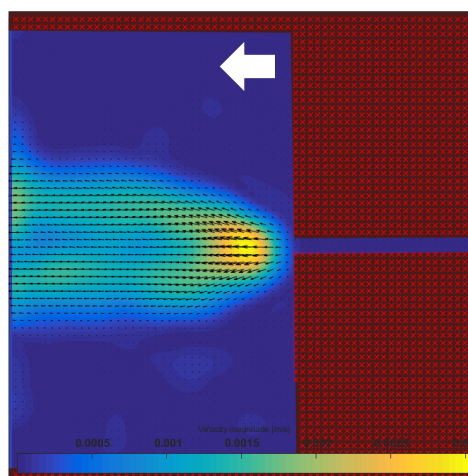


Figura 45 - Distribuição da velocidade dos GVs saudáveis num canal com um estreitamento de 6 μm . A seta indica o sentido do fluxo. A zona representada a amarelo demonstra valores de velocidade superiores às restantes zonas.

4.2.1 Gvs alterados com glutaraldeído

A Figura 46, a Figura 47 e a Figura 48 apresentam os resultados da velocidade dos GVs em função de diferentes percentagens de glutaraldeído nos canais com estreitamentos de 6, 8 e 10 μm de largura, respetivamente, com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Os restantes resultados com os diferentes caudais utilizados (0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$, 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 3 $\mu\text{L}/\text{min}$) estão apresentados no Anexo 4.

Nas amostras em que os canais entupiram, a velocidade dos GVs foi considerada zero.

Neste caso os resultados obtidos não foram tão próximos das linhas de tendência como no caso da deformabilidade.

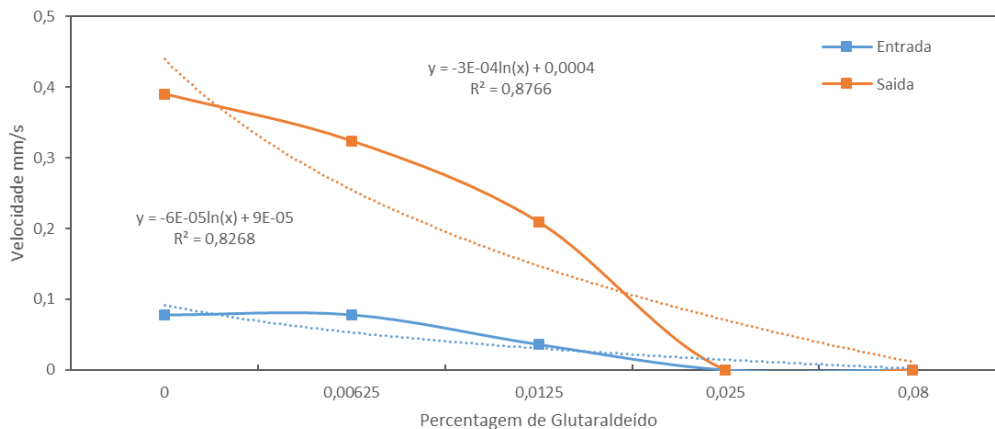


Figura 46 - Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glutaraldeído utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.

Os resultados apresentados na Figura 46 foram obtidos utilizando o microcanal com o estreitamento de 6 μm . Com o gráfico apresentado é possível verificar que os GVs expostos ao glutaraldeído tornam-se mais rígidos e a sua velocidade diminui. Verifica-se também que com o aumento da concentração deste químico ocorre uma diminuição da velocidade.

Também é possível observar que para as duas concentrações de glutaraldeído mais elevadas (0,025% e 0,08%) houve um entupimento do microcanal.

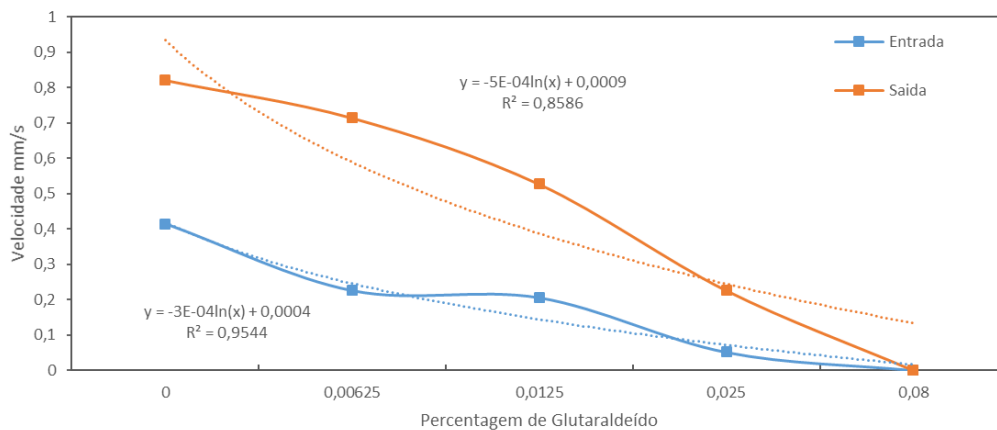


Figura 47 - Variação da velocidade com o aumento da porcentagem de glutaraldeído utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.

No caso apresentado na Figura 47, o canal utilizado foi o microcanal com o estreitamento de 8 μm e os resultados são semelhantes aos resultados anteriormente apresentados, uma vez que se observa uma diminuição da velocidade com o aumento da concentração de glutaraldeído.

Verificou-se também que os GVs expostos a uma concentração de 0,08% de glutaraldeído não foram capazes de atravessar o estreitamento.

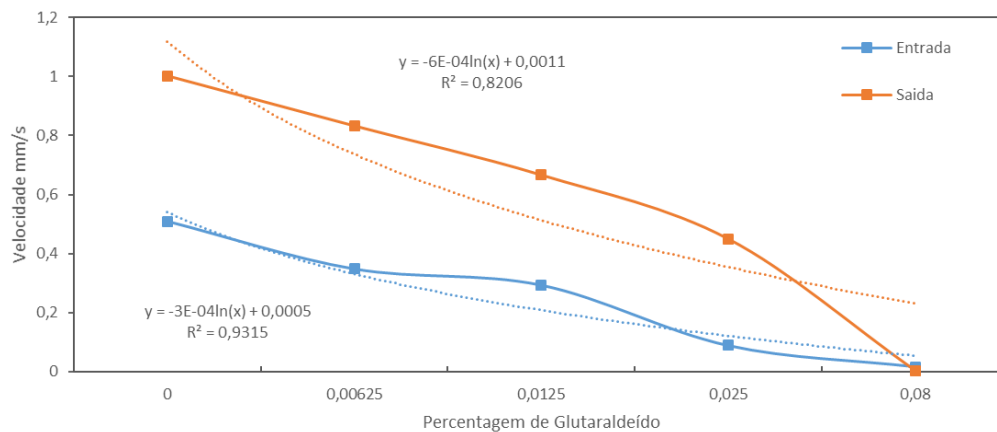


Figura 48 - Variação da velocidade com o aumento da porcentagem de glutaraldeído utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.

Neste caso utilizou-se o microcanal com um estreitamento de 10 μm . Através da análise da Figura 48, verifica-se que foi possível medir a velocidade dos GVs para todas as concentrações de glutaraldeído, sendo que estas células apresentam uma velocidade maior quando expostos à menor concentração deste químico e uma velocidade menor quando alterados com uma maior concentração de glutaraldeído.

De uma forma geral, os resultados obtidos pela análise da velocidade média dos GVs na entrada e saída das diferentes contrações dos microcanais, permite-nos aferir acerca do efeito do glutaraldeído nos GVs, em que os GVs modificados apresentam velocidades inferiores às dos GVs saudáveis e concentrações mais elevadas deste químico provocam o entupimento dos canais. Isto leva à conclusão que o aumento da rigidez das hemácias provoca um aumento da viscosidade e, conseqüentemente, uma diminuição da velocidade.

Conclui-se ainda, da análise dos gráficos apresentados, que quanto menor a largura do estreitamento do microcanal, maior o risco de entupimento por GVs modificados por glutaraldeído, o que vem de encontro aos resultados esperados.

Nestes três casos apresentados, tal como esperado, os valores da velocidade média na saída dos estreitamentos são superiores aos valores da velocidade média na entrada dos estreitamentos. Mas o mesmo não acontece em alguns casos apresentados no Anexo 4.

4.2.2 Gvs alterados com diamida

A Figura 49, a Figura 50 e a Figura 51 apresentam os resultados da velocidade dos GVs em função de diferentes percentagens de diamida nos canais com estreitamentos de 6, 8 e 10 μm de largura, respetivamente, com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Os restantes resultados com os diferentes caudais utilizados (0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$, 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 3 $\mu\text{L}/\text{min}$) estão apresentados no Anexo 5.

Neste caso os resultados obtidos foram ligeiramente mais próximos das linhas de tendência lineares do que no caso da deformabilidade.

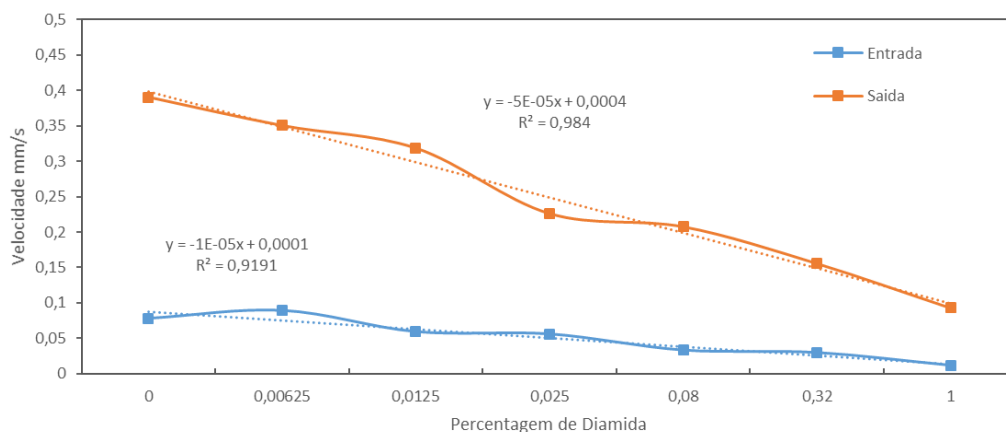


Figura 49 - Variação da velocidade com o aumento da percentagem de diamida utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.

Os resultados apresentados na Figura 49 foram obtidos utilizando o microcanal com o estreitamento de 6 μm . Com o gráfico apresentado é possível verificar que os GVs expostos a diamida tornam-se mais rígidos e a sua velocidade diminui. Verifica-se também que com o aumento da concentração deste químico ocorre uma diminuição da velocidade.

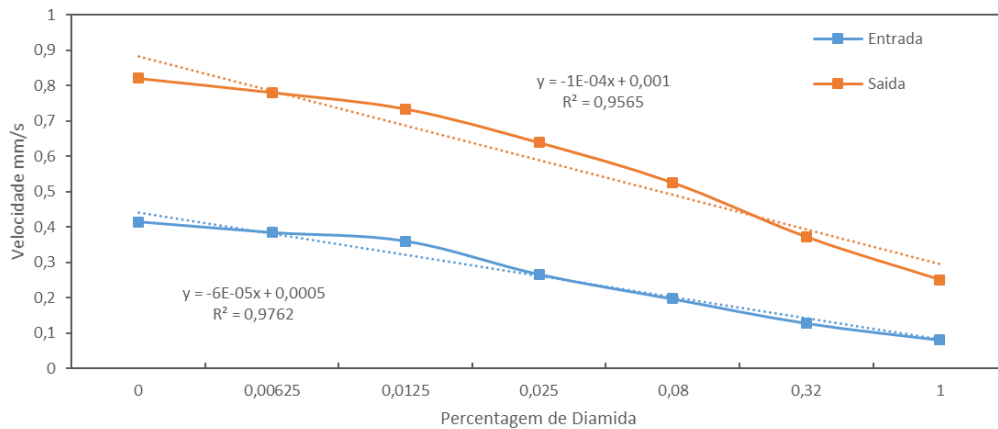


Figura 50 - Variação da velocidade com o aumento da porcentagem de diamida utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 8 µm de largura com um caudal de 5 µL/min. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.

No caso apresentado na Figura 50, o canal utilizado foi o microcanal com o estreitamento de 8 µm e os resultados são semelhantes aos resultados anteriormente apresentados, uma vez que com o aumento da concentração de diamida observa-se uma diminuição da velocidade.

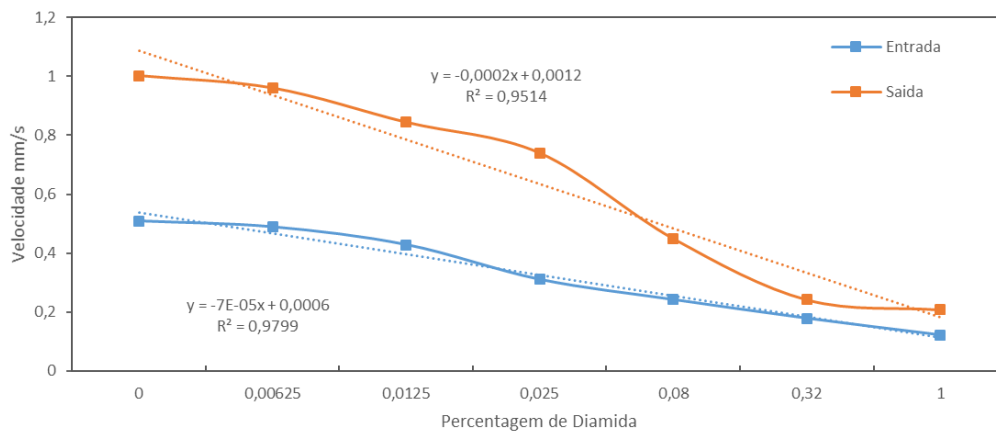


Figura 51 - Variação da velocidade com o aumento da porcentagem de diamida utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 10 µm de largura com um caudal de 5 µL/min. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.

Neste caso utilizou-se o microcanal com um estreitamento de 10 μm . Através da análise da Figura 51, verifica-se que as células apresentam uma velocidade maior quando expostas à menor concentração deste químico e uma velocidade menor quando alterados com uma maior concentração de diamida.

Nestes três casos apresentados, tal como esperado, os valores da velocidade média na saída dos estreitamentos são superiores aos valores da velocidade média na entrada dos estreitamentos. Mas o mesmo não acontece em alguns casos apresentados no Anexo 5.

4.2.3 Gvs alterados com glucose

A Figura 52, Figura 53 e Figura 54 apresentam os resultados da velocidade dos GVs em função de diferentes percentagens de glucose nos canais com estreitamentos de 6, 8 e 10 μm de largura, respetivamente, com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Os restantes resultados com os diferentes caudais utilizados (0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$, 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 3 $\mu\text{L}/\text{min}$) estão apresentados no Anexo 6.

Neste caso os resultados obtidos foram igualmente próximos das linhas de tendência polinomiais de grau 2 comparativamente aos resultados obtidos na deformabilidade.

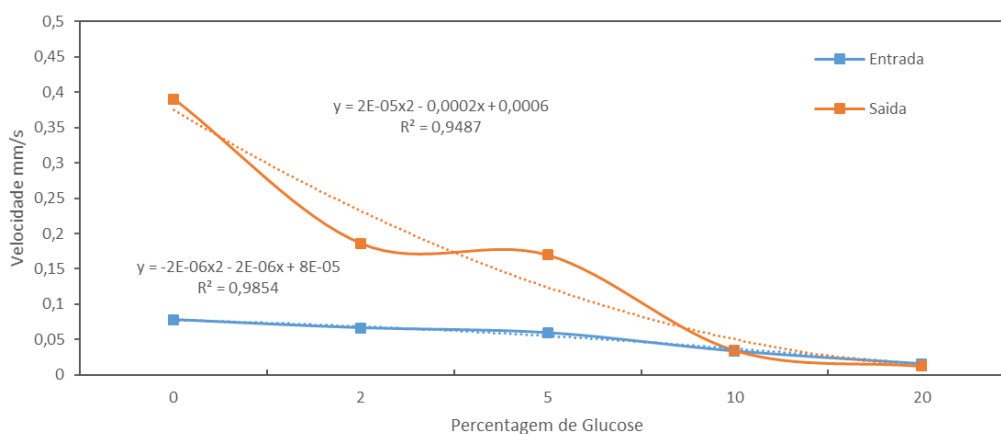


Figura 52 - Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glucose utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.

Os resultados apresentados na Figura 52 foram obtidos utilizando o microcanal com o estreitamento de 6 μm . Com o gráfico apresentado é possível verificar que os GVs expostos a glucose tornam-se mais rígidos e a sua velocidade diminui. Verifica-se também que com o aumento da concentração deste químico ocorre uma diminuição da velocidade.

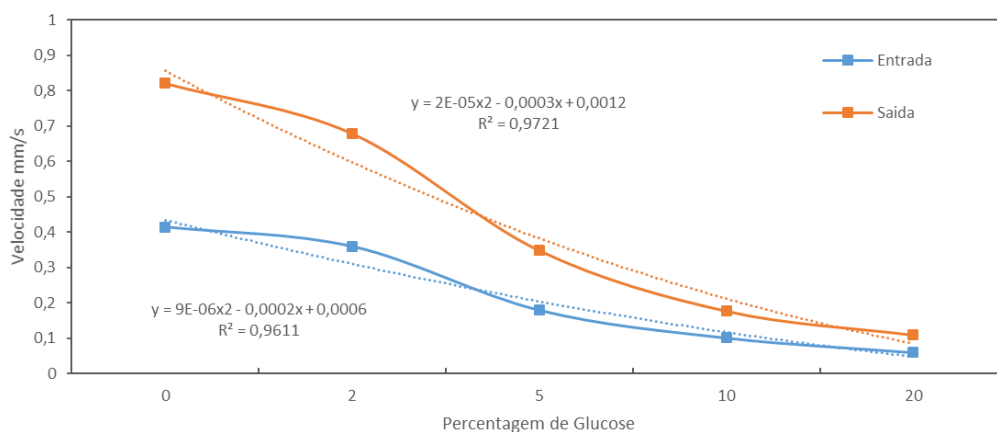


Figura 53 - Variação da velocidade com o aumento da porcentagem de glucose utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.

No caso apresentado na Figura 53, o canal utilizado foi o microcanal com o estreitamento de 8 μm e os resultados são semelhantes aos resultados anteriormente apresentados, uma vez que com o aumento da concentração de glucose há uma diminuição da velocidade.

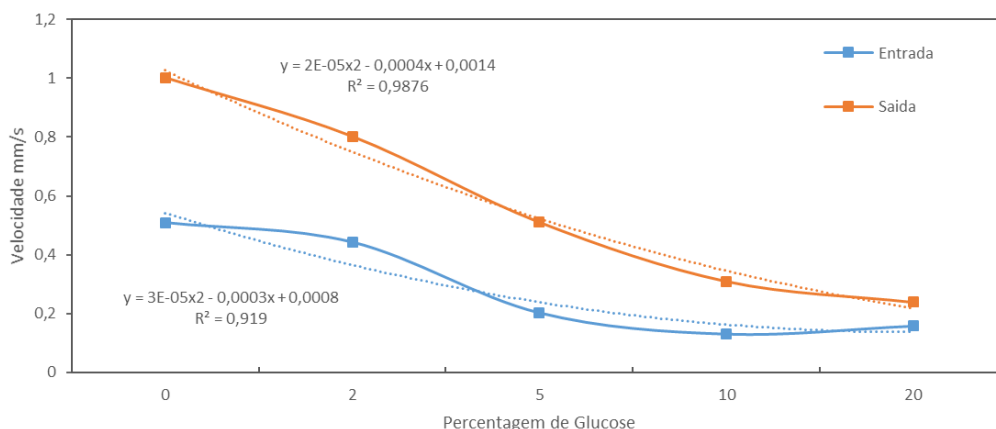


Figura 54 - Variação da velocidade com o aumento da porcentagem de glucose utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.

Neste caso utilizou-se o microcanal com um estreitamento de 10 μm . Através da análise da Figura 54, verifica-se que as células apresentam uma velocidade maior quando expostos à menor concentração deste químico e uma velocidade menor quando alterados com uma maior concentração de glucose.

Nestes três casos apresentados, os valores da velocidade média na saída dos estreitamentos são superiores aos valores da velocidade média na entrada dos estreitamentos. Mas o mesmo não acontece em alguns casos apresentados no Anexo 6.

4.3. Estudo da relação deformabilidade vs velocidade

Sendo um dos principais objetivos deste trabalho estabelecer uma relação entre a deformabilidade e a velocidade dos GVs, no sentido de obter uma curva de calibração, a Figura 55, a Figura 56 e a Figura 57 apresentam os resultados desta relação para os GVs modificados com glutaraldeído, diamida e glucose.

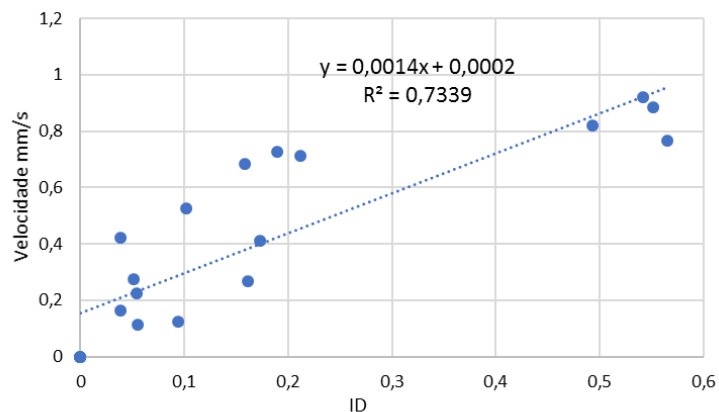


Figura 55 – Relação entre deformabilidade e velocidade com o aumento da percentagem de glutaraldeído utilizado no tratamento dos GVs, no microcanal com o estreitamento de 8 μm de largura. A tracejado está apresentada a linha de tendência linear.

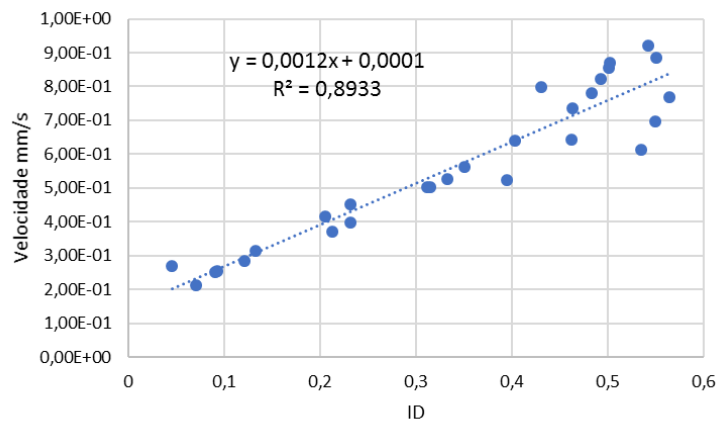


Figura 56 - Relação entre deformabilidade e velocidade com o aumento da percentagem de diamida utilizada no tratamento dos GVs, no microcanal com o estreitamento de 8 μm de largura. A tracejado está apresentada a linha de tendência linear.

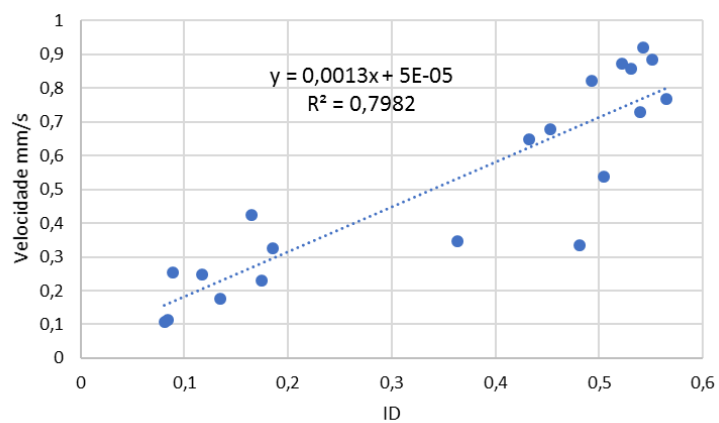


Figura 57 - Relação entre deformabilidade e velocidade com o aumento da percentagem de glucose utilizada no tratamento dos GVs, no microcanal com o estreitamento de 8 μm de largura. A tracejado está apresentada a linha de tendência linear.

Com a análise dos gráficos anteriormente apresentados verifica-se que, para todos os químicos utilizados para alterar as propriedades dos GVs, com o aumento da deformabilidade há um aumento da velocidade, o que vem de encontro aos resultados esperados.

Capítulo 5

5. Conclusões e trabalho futuro

Este capítulo apresenta as principais conclusões retiradas do trabalho realizado, e expõe algumas sugestões para trabalho a desenvolver no futuro, de modo a complementar os resultados obtidos.

5.1. Conclusões do trabalho

Neste trabalho foi estudado o potencial da utilização da deformabilidade e da velocidade de GVs para serem utilizados como biomarcadores de malária.

Ao longo desta dissertação, estudou-se o índice de deformabilidade e a velocidade de escoamento de glóbulos vermelhos humanos normais e de glóbulos vermelhos humanos modificados com diferentes percentagens de glutaraldeído, de diamida e de glucose em microcanais de PDMS com estreitamentos abruptos de diferentes larguras (6, 8 e 10 μm). As ferramentas computacionais utilizadas (ImageJ e PIVLab) demonstraram grande utilidade relativamente ao apoio no processamento de imagem e à análise de velocidades e deformações de GVs.

Ao estudar os GVs saudáveis estes apresentaram uma deformabilidade elevada e com a modificação dos mesmos com diferentes concentrações dos químicos utilizados (glutaraldeído, diamida e glucose) a deformabilidade diminuiu. Assim sendo, é possível concluir que estes químicos são eficazes no aumento da rigidez da membrana das células em estudo. No caso dos químicos utilizados, o glutaraldeído mostrou-se mais eficaz na tarefa de aumentar a rigidez dos GVs uma vez que com concentrações mais baixas deste químico obteve-se valores de ID mais baixos e, em alguns casos, ocorreu o entupimento dos

microcanais. Quanto à diamida e à glucose, também permitiram endurecer os GVs mas foi necessário aumentar a concentração destes químicos comparativamente ao glutaraldeído.

Relativamente aos resultados do estudo do índice de deformabilidade, verificou-se que os GVs saudáveis apresentam um valor de ID na entrada relativamente à saída. Isto sustenta a ideia de que na entrada de um estreitamento abrupto as hemácias iniciam um processo de deformação para conseguirem atravessar o estreitamento, aumentando assim o ID, e na saída as células recuperam rapidamente a sua forma original, e conseqüentemente o ID diminui. Em alguns casos verificou-se que o ID das células saudáveis é superior na saída contrariando a explicação anteriormente apresentada. Uma possível justificação para este acontecimento pode ser o facto de o seguimento dos GVs ter sido efetuado um pouco antes da entrada e assim, não foi possível obter a informação da posição em que a célula estava totalmente deformada.

Com a análise dos resultados obtidos, verificou-se que os GVs saudáveis apresentam velocidades superiores às dos GVs modificados. Posto isto, conclui-se que o aumento da rigidez dos GVs provoca um aumento da viscosidade do fluido e, conseqüentemente, uma diminuição da velocidade de escoamento do mesmo.

Quanto ao efeito da largura do estreitamento dos microcanais, observou-se que a velocidade dos GVs aumenta com o aumento da largura dos estreitamentos. Estes resultados não são os esperados uma vez que contrariam a teoria da mecânica dos fluidos. Assim, no futuro, deverão ser realizados estudos mais específicos em microcanais com diferentes larguras de estreitamento.

Adicionalmente, este trabalho permitiu aproximar o comportamento da deformabilidade dos GVs e da sua velocidade de escoamento, sob diversas condições, a funções matemáticas (lineares, logarítmicas ou polinomiais, tal como discutido no capítulo anterior), sendo um ponto de partida relevante para a obtenção de curvas de calibração necessárias para os métodos de determinação automáticos das propriedades dos GVs.

Por fim, este trabalho assume-se como um ponto de partida para o desenvolvimento de novos sistemas de diagnóstico de malária. Tendo em conta as microtecnologias já existentes, será possível integrar, num único chip, sensores, microeletrónica e plataformas microfluídicas, de forma a criar um método de diagnóstico simples, rápido, preciso, quantitativo e de baixo custo para deteção precoce da malária.

5.2. Trabalhos futuros

De uma forma geral, os resultados obtidos neste estudo permitiram tirar conclusões que vão de encontro ao que era esperado, no entanto existem certos aspetos a considerar em trabalhos futuros de forma a colmatar as falhas que existiram.

De forma a obter resultados mais fiáveis, é importante que a realização dos ensaios sejam feitos com condições mais próximas do comportamento do sangue na microcirculação *in vivo*, uma vez que a deformabilidade das células é alterada em resposta a fatores ambientais logo desde o momento em que as células são recolhidas.

Para estudos futuros, é importante a separação entre o pré-tratamento das imagens para os estudos da deformabilidade e o pré-tratamento das imagens para a análise da velocidade. Isto iria evitar a eliminação de informação necessária para o estudo destes parâmetros. Para além disso, a utilização de métodos automáticos ou semi-automáticos para medir as dimensões dos GVs é importante de forma a evitar erros humanos associados à análise de imagem.

Outros aspetos que devem ser considerados em trabalhos futuros são o melhoramento das imagens obtidas; a utilização de métodos que permitam um melhor controlo do caudal no interior dos microcanais; a fabricação de microcanais com diferentes tipos de contrações (por exemplo, contrações hiperbólicas) e diferentes larguras de estreitamento.

Finalizando, deverão ser efetuados estudos mais intensivos com o propósito de integrar sensores no sistema microfluídico, para que seja possível a medição automática da velocidade e deformabilidade dos GVs e extrair automaticamente informação sobre a presença de malária e estágio da mesma nas amostras. Este passo seria fundamental para o desenvolvimento de um sistema de deteção de malária autónomo, preciso, de elevada

sensibilidade, portátil, de baixo consumo energético e baixo custo, resolvendo assim a questão essencial prevista na motivação deste trabalho.

Bibliografia

- [1] K. Chen, C. Perlaki, A. Xiong, P. Preiser e Q. Liu, “Review of Surface Enhanced Raman Spectroscopy for Malaria Diagnosis and a New Approach for the Detection of Single Parasites in the Ring Stage,” *IEEE JOURNAL OF SELECTED TOPICS IN QUANTUM ELECTRONICS*, vol. 22, p. 6900509, 2016.
- [2] W. H. Organization, “World Malaria Report 2008,” *World Health Organization*, 2008.
- [3] D. Paço, “ESTUDO DA DEFORMAÇÃO DE GLÓBULOS VERMELHOS COMO BIOMARCADOR DE MALÁRIA,” *Dissertação de Mestrado*, p. Universidade do Minho, 2016.
- [4] M. W. Maichomo, J. J. McDermott, S. M. Arimi, P. B. Gathura, T. J. Mugambi e S. M. Muriuki, “Study of brucellosis in a pastoral community and evaluation of the usefulness of clinical signs and symptoms in differentiating it from other flu-like diseases.,” *African Journal of Health Sciences*, vol. 7, pp. 114-119, 2000.
- [5] J. Chipeta, S. Mharakurwa, P. Thuma e N. Kumar, “A Synopsis of Current Malaria Diagnosis Trends,” *Medical Journal of Zambia*, vol. 36, pp. 95-101, 2009.
- [6] K. Chen, C. Perlaki, A. Xiong, P. Preiser e Q. Liu, “Review of Surface Enhanced Raman Spectroscopy for Malaria Diagnosis and a New Approach for the Detection of Single Parasites in the Ring Stage,” *IEEE JOURNAL OF SELECTED TOPICS IN QUANTUM ELECTRONICS*, vol. 22, 2016.
- [7] “Global Health Observatory (GHO) data,” World Health Organization, [Online]. Available: <http://www.who.int/gho/malaria/en/>.
- [8] V. V. Makkapati e R. M. Rao, “Segmentation of malaria parasites in peripheral blood smear images,” *IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal*, pp. 1361-1364, 2009.

- [9] H. A. Nugroho, S. A. Akbar e E. E. H. Murhandarwati, "Feature extraction and classification for detection malaria parasites in thin blood smear," *IEEE Xplore*, pp. 197-201, 2016.
- [10] P. Perlmann e M. Troye-Blomberg, "Malaria blood-stage infection and its control by the immune system.," *Folia Biologica*, vol. 46, pp. 210-218, 2000.
- [11] A. M. Dondorp, B. J. Angus, M. R. Hardeman, K. Thanikkul, K. Silamut, R. Ruangveerayuth, P. A. Kager, N. J. White e J. Vreeken, "Prognostic significance of reduced red cell deformability in severe falciparum malaria," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 57, pp. 507-511, 1997.
- [12] C. K. Murray, R. A. Gasser Jr., A. J. Magill e R. S. Miller, "Update on Rapid Diagnostic Testing for Malaria," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 21, pp. 97-110, 2008.
- [13] H. W. Hou, A. A. Bhagat, A. G. Chong, P. Mao, K. S. Tan, J. Han e C. T. Lim, "Deformability based cell margination--a simple microfluidic design for malaria-infected erythrocyte separation.," *Lab on a Chip*, vol. 10, pp. 2605-2613, 2010.
- [14] D. Paço, R. Lima, G. Minas e S. O. Catarino, "Red blood cells deformability as a malaria biomarker," *Proceedings of the IEEE 5th Portuguese Meeting on Bioengineering (ENBENG)*, pp. 16-18, 2017.
- [15] J. Calejo, "Desenvolvimento de Fluidos Bifásicos Análogos ao Sangue: Estudo Reológico, Escoamento em Microcanais e Simulações Numéricas," *Dissertação de Mestrado*, p. Instituto Politécnico de Bragança, Novembro 2013.
- [16] D. Pinho, "Determinação e Caracterização das Trajectórias dos Glóbulos Vermelhos: Um Método Semi-Automático," *Dissertação de Mestrado*, p. Instituto Politécnico de Bragança, Julho 2011.
- [17] S. Handayani, D. T. Chiu, E. Tjitra, J. S. Kuo, D. Lampah, E. Knangalem, L. Renia, G. Snounou, R. N. Price, N. M. Anstey e B. Russel, "High Deformability of Plasmodium vivax - Infected Red Blood Cells under Microfluidic Conditions," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 199, pp. 445-450, Dezembro 2008.
- [18] R. Suwanarusk, B. M. Cooke, A. M. Dondorp, K. Silamut, J. Sattabongkot, N. J. White e R. Udomsangpetch, "The Deformability of Red Blood Cells Parasitized by Plasmodium falciparum and P. vivax," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 189, pp. 190-194, Janeiro 2004.

- [19] P. Schlagenhauf-Lawlor, *Travelers' Malaria*, Hamilton, 2008.
- [20] “TodaMatéria,” 10 Novembro 2016. [Online]. Available: <https://www.todamateria.com.br/malaria/>.
- [21] S. E. Francis, D. J. Sullivan, Jr. e D. E. Goldberg, “HEMOGLOBIN METABOLISM IN THE MALARIA PARASITE PLASMODIUM FALCIPARUM,” *Annual Review of Microbiology*, vol. 51, pp. 97-123, 1997.
- [22] I. W. Sherman, “Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites,” *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 55, pp. 265-276, 1977.
- [23] A. G. Maier, B. M. Cooke, A. F. Cowman e L. Tilley, “Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 7, pp. 341-354, 2009.
- [24] M. Ho e N. J. White, “Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria,” *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, vol. 276, pp. C1231-C1242, 1999.
- [25] M. Paulitschke e G. B. Nash, “Membrane rigidity of red blood cells parasitized by different strains of Plasmodium falciparum,” *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, vol. 122, pp. 581-589, 1993.
- [26] A. M. Dondorp, E. Pongponratn e N. J. White, “Reduced microcirculatory flow in severe falciparum malaria: pathophysiology and electron-microscopic pathology,” *Acta Tropica*, vol. 89, pp. 309-317, 2004.
- [27] A. M. Dondorp, B. J. Angus, K. Chotivanich, K. Silamut, R. Ruangveerayuth, M. R. Hardeman, P. A. Kager, J. Vreeken e N. J. White, “Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria,” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 60, pp. 733-737, 1999.
- [28] S. Bhuvanendran Nair Gourikutty, C.-P. Chang e P. D. Puiu, “Microfluidic immunomagnetic cell separation from whole blood,” *Journal of Chromatography B*, vol. 1011, pp. 77-88, 2016.
- [29] S. Roman, A. Merlo, P. Duru, F. Risso e S. Lorthois, “Going beyond 20 μm-sized channels for studying red blood cell phase separation in microfluidic bifurcations,” *BIOMICROFLUIDICS*, vol. 10, p. 034103, 2016.

- [30] K. Gester, S. V. Jansen, M. Stahl e U. Steinseifer, "A Simple Method for the Investigation of Cell Separation Effects of Blood With Physiological Hematocrit Values," *Artificial Organs*, vol. 39, pp. 432-440, 2015.
- [31] J. Chen, D. Chen, T. Yuan, X. Chen, Y. Xie, H. Fu, D. Cui, X. Fan e M. K. K. Oo, "Blood plasma separation microfluidic chip with gradual filtration," *Microelectronic Engineering*, vol. 128, pp. 36-41, 2014.
- [32] X. Chen, D. F. Cui, C. C. Liu e H. Li, "Microfluidic chip for blood cell separation and collection based on crossflow filtration," *Sensors and Actuators B*, vol. 130, pp. 216-221, 2008.
- [33] A. R. A. Fattah, S. Ghosh e I. K. Puri, "High gradient magnetic field microstructures for magnetophoretic cell separation," *Journal of Chromatography B*, vol. 1027, pp. 194-199, 2016.
- [34] C. Wongsrichanalai, M. J. Barcus, S. Muth, A. Sutamihardja e W. H. Wernsdorfer, "A Review of Malaria Diagnostic Tools: Microscopy and Rapid Diagnostic Test (RDT)," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 77, pp. 119-127, 2007.
- [35] M. J. W. Pinto, S. R. Rodrigues, R. Desouza e M. P. Verenkar, "Usefulness of quantitative buffy coat blood parasite detection system in diagnosis of malaria," *Indian Journal of Medical Microbiology*, vol. 19, pp. 219-221, 2001.
- [36] A. Moody, "Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 15, pp. 66-78, 2002.
- [37] R. Lima, T. Ishikawa, Y. Imai e T. Yamaguchi, "BLOOD FLOW BEHAVIOR IN MICROCHANNELS: PAST, CURRENT AND FUTURE TRENDS," *Single and two-Phase Flows on Chemical and Biomedical Engineering*, pp. 513-547, 2012.
- [38] R. R. Seeley, T. D. Stephens e P. Tate, *Anatomia e Fisiologia*, 8ª ed., Lusociência, 2011, pp. 668-679.
- [39] A. Curralo, "Desenvolvimento de um Método Semi-Automático em MatLab para Calcular o Coeficiente de Dispersão de Eritrócitos em Microcanais," *Dissertação de Mestrado*, p. Instituto Politécnico de Bragança, Novembro 2013.
- [40] E. Pinto, "Estudo experimental de escoamentos fisiológicos em microcanais fabricados por xurografia," *Dissertação de Mestrado*, p. Instituto Politécnico de Bragança, Dezembro 2012.

- [41] S. Rosa, “Sebenta Teórica de Biofluidos,” *Instituto Politécnico de Bragança*.
- [42] B. Taboada, “Seguimento de Células e Cálculo da sua Deformação em Microcanais: Um Método Automático,” *Dissertação de Mestrado*, p. Instituto Politécnico de Bragança, Dezembro 2013.
- [43] H. Goldsmith e V. Turitto, “Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications.,” *ICTH-Report-Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Hemostasis*, vol. 55, pp. 415-443, 1986.
- [44] X. Yin, T. Thomas e J. Zhang, “Multiple red blood cell flows through microvascular bifurcations: Cell free layer, cell trajectory, and hematocrit separation,” *Microvascular Research*, vol. 89, pp. 47-56, 2013.
- [45] N. F. Zeng, J. E. Mancuso, A. M. Zivkovic, J. T. Smilowitz e W. D. Ristenpart, “Red Blood Cells from Individuals with Abdominal Obesity or Metabolic Abnormalities Exhibit Less Deformability upon Entering a Constriction,” *PLOS ONE*, pp. 1-12, 2016.
- [46] K. Matthews, M.-E. Myrand-Lapierre, R. R. Ang, S. P. Duffy, M. D. Scott e H. Ma, “Microfluidic deformability analysis of the red cell storage lesion,” *Journal of Biomechanics* , vol. 48, pp. 4065-4072, 2015.
- [47] Q. Guo, S. P. Duffy, K. Matthews, A. T. Santoso, M. D. Scott e H. Ma, “Microfluidic analysis of red blood cell deformability,” *Journal of Biomechanics*, vol. 47, pp. 1767-1776, 2014.
- [48] E. Konstantinova, L. Ivanova, T. Tolstaya e E. Mironova, “Rheological properties of blood and parameters of platelets aggregation in arterial hypertension,” *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol. 35, pp. 135-138, 2006.
- [49] R. Agrawal, J. Sherwood, J. Chhablani, A. Ricchariya, S. Kim, P. H. Jones, S. Balabani e D. Shima, “Red blood cells in retinal vascular disorders,” *Blood Cells, Molecules and Diseases* , vol. 56, pp. 53-61, 2016.
- [50] G. Tomaiuolo, L. Lanotte, R. D’Apolito e A. Cassinese, “Microconfined flow behavior of red blood cells,” *Medical Engineering and Physics* , vol. 38, pp. 11-16, 2016.

- [51] M. Abkarian, M. Faivre, R. Horton, K. Smistrup, C. A. Best-Popescu e H. A. Stone, “Cellular-scale hydrodynamics,” *BIOMEDICAL MATERIALS*, vol. 3, pp. 1-13, Setembro 2008.
- [52] V. Faustino, D. Pinho, T. Yaginuma, R. C. Calhelha, G. Man-Kim, S. Arana, R. Lima, I. Ferreira e M. Oliveira, “Measurement of red blood cells deformation index in a hyperbolic microchannel,” *5th Portuguese Congress on Biomechanics*, pp. 341-344, 2013.
- [53] H. Fujiwara, T. Ishikawa, R. Lima, N. Matsuki, Y. Imai, H. Kaji, M. Nishizawa e T. Yamaguchi, “Red blood cell motions in high-hematocrit blood flowing through a stenosed microchannel,” *Journal of Biomechanics*, vol. 42, pp. 838-84, 2009.
- [54] V. Leble, R. Lima, R. Dias, C. Fernandes, T. Ishikawa, Y. Imai e T. Yamaguchi, “Asymmetry of red blood cell motions in a microchannel with a diverging and converging bifurcation,” *Biomicrofluidics*, vol. 5, p. 044120, 2011.
- [55] R. Lima, M. S. N. Oliveira, T. Ishikawa, H. Kaji, S. Tanaka, M. Nishizawa e T. Yamaguchi, “Axisymmetric polydimethylsiloxane microchannels for in vitro hemodynamic studies,” *Biofabrication*, vol. 1, 2009.
- [56] D. A. Bartholomeusz, R. W. Boulté e J. D. Andrade, “Xurography: rapid prototyping of microstructures using a cutting plotter,” *Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 14, pp. 1364-1374, 2005.
- [57] E. Pinto, B. Taboada, V. Faustino, D. Cidre, R. Rodrigues, J. Miranda, V. Garcia, R. Dias e R. Lima, “Blood flow in microchannels manufactured by a low cost technique: xurography,” *Perspectives in Fundamental and Applied Rheology*, pp. 285-290, 2013.
- [58] R. O. Rodrigues, V. Faustino, D. Pinho, E. Pinto, D. Cidre, T. Yaginuma, B. Taboada, D. Bento e R. Lima, “Separation and deformation of red blood cells in PDMS microchannels,” *Perspectives in Fundamental and Applied Rheology*, 2013.
- [59] H. W. Hou, A. A. S. Bhagat, A. G. L. Chong, P. Mao, K. S. W. Tan, J. Han e C. T. Lim, “Deformability based cell margination - A simple microfluidic design for malaria-infected erythrocyte separation,” *The Royal Society of Chemistry*, vol. 10, p. 2605–2613, Agosto 2010.
- [60] R. Rodrigues, V. Faustino, E. Pinto, D. Pinho e R. Lima, “Red Blood Cells deformability index assessment in a hyperbolic microchannel: the diamide and

- glutaraldehyde effect,” *WebmedCentral BIOMEDICAL ENGINEERING* , vol. 4, 2013.
- [61] S. Shin, Y. Ku, M.-S. Park e J.-S. Suh, “Measurement of red cell deformability and whole blood viscosity using laser-diffraction slit rheometer,” *Korea-Australia Rheology Journal*, vol. 16, pp. 85-90, Junho 2004.
- [62] S. Shin, Y.-H. Ku, J.-S. Suh e M. Singh, “Rheological characteristics of erythrocytes incubated in glucose media,” *IOS Press*, vol. 38, pp. 153-161, 2008.
- [63] N. Babu e M. Singh, “Influence of hyperglycemia on aggregation, deformability and shape parameters of erythrocytes,” *IOS Press*, vol. 31, pp. 273-280, 2004.
- [64] T. Yaginuma, M. S. N. Oliveira, R. Lima, T. Ishikawa e T. Yamaguchi, “Human red blood cell behavior under homogeneous extensional flow in a hyperbolic shaped microchannel,” *Biomicrofluidics*, vol. 7, p. 054110, Stembro 2013.
- [65] R. R. Seeley, T. D. Stephens e F. Tate, *Anatomia & Fisiologia*, 3ª ed., Lusodidacta, 1997.
- [66] W. H. Reinhart e A. Sing, “Erythrocyte aggregation: the roles of cell deformability and geometry,” *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 20, pp. 458-462, Agosto 1990.
- [67] N. Mohandas e J. Chassis, “Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids.,” *Seminars in Hematology*, vol. 30, pp. 171-192, Julho 1993.
- [68] G. M. Patavino, P. A. Silveira, S. F. M. Gualandro, I. K. Yokomizo e D. M. T. Moromizato, “Deformabilidade eritrocitária na anemia ferropriva Erythrocyte deformability in iron deficiency,” *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, vol. 28, pp. 253-257, 2006.
- [69] M. Musielak, “Red blood cell-deformability measurement: Review of techniques,” *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol. 42, pp. 47-64, 2009.
- [70] E. A. Evans e P. L. La Celle, “Intrinsic material properties of the erythrocyte membrane indicated by mechanical analysis of deformation,” *Blood*, vol. 45, pp. 29-43, Janeiro 1975.
- [71] R. M. Hochmuth, “Micropipette aspiration of living cells,” *Journal of Biomechanics*, vol. 33, pp. 15-22, Janeiro 2000.

- [72] T. Shiga, N. Maeda e K. Kon, "Erythrocyte rheology," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 10, pp. 9-48, 1990.
- [73] N. Mohandas e J. Chasis, "Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids.," *Seminars in Hematology*, vol. 30, pp. 171-192, 1993.
- [74] P. Parot, Y. F. Dufrêne, P. Hinterdorfer, C. Grimellec, D. Navajas, J.-L. Pellequer e S. Scheuring, "Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine," *Journal of Molecular Recognition*, vol. 20, pp. 418-431, 2007.
- [75] B. Bhushan, *Springer Handbook of Nanotechnology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004, p. 361.
- [76] G. Binnig, C. F. Quate e C. Gerber, "Atomic Force Microscope," *Physical Review Letters*, vol. 56, pp. 930-933, Março 1986.
- [77] A. Kamruzzahan, F. Kienberger, C. Stroh, J. Berg, R. Huss, A. Ebner, R. Zhu, C. Rankl, H. Gruber e P. Hinterdorfer, "Imaging morphological details and pathological differences of red blood cells using tapping-mode AFM.," *Biological Chemistry*, pp. 955-960, Outubro 2004.
- [78] D. G. Grier, "A revolution in optical manipulation," *Nature*, vol. 424, pp. 810-816, Agosto 2003.
- [79] S.-H. Lee e D. G. Grier, "Holographic Microscopy of Holographically Trapped Three-Dimensional Structures," *Optics Express*, vol. 15, pp. 1505-1512, Fevereiro 2007.
- [80] M. Dao, C. T. Lim e S. Suresh, "Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers," *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, vol. 51, pp. 2259-2280, 2003.
- [81] J. Guck, R. Ananthakrishnan, H. Mahmood, T. J. Moon, C. C. Cunningham e J. Kas, "The Optical Stretcher: A Novel Laser Tool to Micromanipulate Cells," *Biophysical Journal*, vol. 81, pp. 767-784, Agosto 2001.
- [82] S. M. Hosseini e J. J. Feng, "How Malaria Parasites Reduce the Deformability of Infected Red Blood Cells," *Biophysical Journal*, vol. 103, pp. 1-10, Julho 2012.

- [83] N. Wang, J. Butler e D. Ingber , “Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton,” *Science*, vol. 260, pp. 1124-1127, Maio 1993.
- [84] M. Marinkovic, K. Turner, J. Butler, J. Fredberg e S. Suresh, “Viscoelasticity of the human red blood cell,” *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, vol. 293, pp. 597-605, Agosto 2007.
- [85] M. Marinkovic, M. Diez-Silva, I. Pantic, J. Fredberg, S. Suresh e J. Butler, “Febril temperature leads to significant stiffening of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes,” *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, vol. 296, pp. 59-64, Janeiro 2009.
- [86] Y. Park, C. A. Best, T. Kuriabova, M. L. Henle, M. S. Feld, A. J. Levine e G. Popescu, “Measurement of the nonlinear elasticity of red blood cell membranes,” *Physical Review*, vol. 83, p. 051925, Maio 2011.
- [87] G. Popescu, T. Ikeda, C. A. Best, K. Badizadegan, R. R. Dasari e M. S. Feld, “Erythrocyte structure and dynamics quantified by Hilbert phase microscopy,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 10, p. 060503, Dezembro 2005.
- [88] G. Popescu, Y. Park, W. Choi, R. R. Dasari, M. S. Feld e K. Badizadegan, “Imaging red blood cell dynamics by quantitative phase microscopy,” *Blood Cells, Molecules and Diseases*, vol. 41, pp. 10-16, Abril 2008.
- [89] R. Waugh e E. A. Evans, “Thermoelasticity of red blood cell membrane,” *Biophysical Journal*, vol. 26, pp. 115-132, Abril 1979.
- [90] G. Popescu, T. Ikeda, K. Goda, C. A. Best, M. Laposata, S. Manley, R. R. Dasari, K. Badizadegan e M. S. Feld, “Optical Measurement of Cell Membrane Tension,” *Physical Review Letters*, vol. 97, p. 218101, Novembro 2006.
- [91] Y. Park, C. A. Best, K. Badizadegan, R. R. Dasari, M. S. Feld, T. Kuriabova, M. L. Henle, A. J. Levine e G. Popescu, “Measurement of red blood cell mechanics during morphological changes,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, pp. 6731-6736, Fevereiro 2010.
- [92] R. Chandramohanadas, Y. Park, L. Lui, A. Li, D. Quinn, K. Liew, M. Diez-Silva, Y. Sung, M. Dao, C. T. Lim, P. Rainer-Preiser e S. Suresh, “Biophysics of Malarial Parasite Exit from Infected Erythrocytes,” *PLoS ONE*, vol. 6, p. e20869, Junho 2011.

- [93] G. J. Streekstra, A. G. Hoekstra e R. M. Heethaar, "Anomalous diffraction by arbitrarily oriented ellipsoids: applications in ektacytometry," *Applied Optics*, vol. 33, pp. 7288-7296, 1994.
- [94] S. Shin, Y. Ku, M.-S. Park, J.-H. Jang e J.-S. Suh, "Rapid cell-deformability sensing system based on slit-flow laser diffractometry with decreasing pressure differential," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, pp. 1291-1297, 2005.
- [95] R. M. Johnson, "Ektacytometry of red blood cells," *Methods in enzymology*, vol. 173, pp. 35-54, 1989.
- [96] R. B. Tishler e F. D. Carlson, "Quasi-elastic light scattering studies of membrane motion in single red blood cells," *Biophysical Journal*, vol. 51, pp. 993-997, Junho 1987.
- [97] M. S. Amin, Y. Park, N. Lue, R. R. Dasari, K. Badizadegan, M. S. Feld e G. Popescu, "Microrheology of red blood cell membranes using dynamic scattering microscopy," *Optics Express*, vol. 15, pp. 17001-17009, Dezembro 2007.
- [98] Y. Park, M. Diez-Silva, D. Fu, G. Popescu, W. Choi, I. Barman, S. Suresh e M. S. Feld, "Static and dynamic light scattering of healthy and malaria-parasite invaded red blood cells," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 15, p. 020506, Abril 2010.
- [99] Y. Kim, J. M. Higgins, R. R. Dasari, S. Suresh e Y. Park, "Anisotropic light scattering of individual sickle red blood cells," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 17, p. 040501, Abril 2012.
- [100] P. Silveira, T. Cynober, D. Dhermy, N. Mohandas e G. Tchernia, "Red blood cell abnormalities in hereditary elliptocytosis and their relevance to variable clinical expression," *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 108, pp. 391-399, 1997.
- [101] H. L. Reid, A. J. Barnes, P. J. Lock, J. A. Dormandy e T. L. Dormandy, "A simple method for measuring erythrocyte deformability," *Journal of Clinical Pathology*, vol. 29, pp. 855-858, 1976.
- [102] R. Zhao, J. F. Antaki, T. Naik, T. N. Bachman, M. V. Kameneva e Z. J. Wu, "Microscopic investigation of erythrocyte deformation dynamics," *Biorheology*, vol. 43, pp. 747-765, 2006.
- [103] S. S. Lee, Y. Yim, K. H. Ahn e S. J. Lee, "Extensional flow-based assessment of red blood cell deformability using hyperbolic converging microchannel," *Biomedical Microdevices*, vol. 11, pp. 1021-1027, 2009.

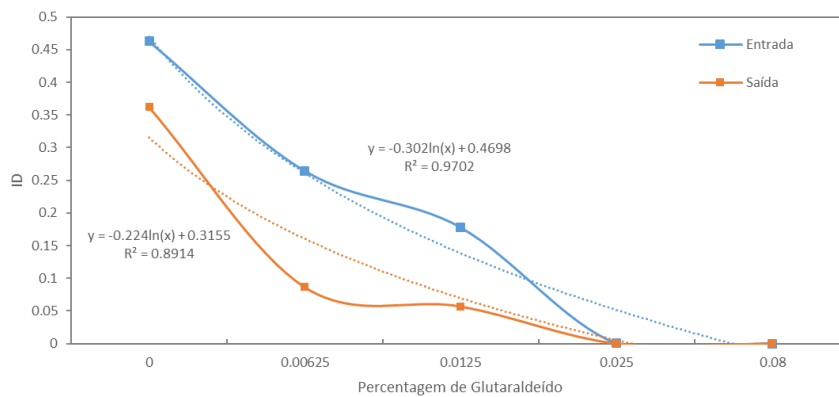
- [104] T. Yaginuma, M. S. N. Oliveira, R. Lima, T. Ishikawa e T. Yamaguchi, “Red blood cell deformation in flows through a PDMS hyperbolic microchannel,” *Proceedings of techconnect world 2011—microtech conference and expo*, 2011.
- [105] V. Faustino, D. Pinho, T. Yaginuma, R. C. Calhella, I. C. Ferreira e R. Lima, “Extensional flow-based microfluidic device: deformability assessment of red blood cells in contact with tumor cells,” *BioChip Journal*, vol. 8, pp. 42-47, Março 2014.
- [106] H. Wayland e P. Johnson, “Erythrocyte velocity measurement in microvessels by a correlation method,” *Bibliotheca Anatomica*, vol. 9, pp. 160-163, 1966.
- [107] F. Durst, A. Melling e J. Whitelaw, “Principles and practice of laser-Doppler anemometry,” *NASA STI/Recon Technical Report A*, vol. 76, p. 47019, 1976.
- [108] J. Seki, “Fiber-optic laser-Doppler anemometer microscope developed for the measurement of microvascular red cell velocity,” *Microvascular Research*, vol. 40, p. 302–316, 1990.
- [109] S. Devasenathipathy, J. G. Santiago, S. T. Wereley, C. D. Meinhart e K. Takehara, “Particle imaging techniques for microfabricated fluidic systems,” *Experiments in Fluids*, vol. 34, pp. 504-514, 2003.
- [110] N. A. Malik, T. Dracos e D. A. Papantoniou, “Particle tracking velocimetry in three-dimensional flows,” *Experiments in Fluids*, vol. 15, pp. 279-294, 1993.
- [111] R. Lima, T. Ishikawa, Y. Imai, M. Takeda, S. Wada e T. Yamaguchi, “Measurement of Individual Red Blood Cell Motions Under High Hematocrit Conditions Using a Confocal Micro-PTV System,” *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 37, pp. 1546-1559, 2009.
- [112] S. Silva, “Embolias Gasosas em Microcanais e Técnica de Focagem de Fluxo na Produção de Micropartículas de PDMS,” *Dissertação de Mestrado*, 2015.
- [113] “SlideShare,” 2014. [Online]. Available: <https://www.slideshare.net/seta667/hints-elfos-forslidesahre>.
- [114] “ImageJ - Image processing and analysis in java,” Março 2017. [Online]. Available: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.
- [115] M. D. Abramoff, P. J. Magalhães e S. J. Ram, “Image processing with ImageJ,” *Biophotonics International*, vol. 11, pp. 36-42, 2004.

- [116] G. Tomaiuolo, “Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics,” *Biomicrofluidics*, vol. 8, p. 051501, 2014.
- [117] W. Thielicke e E. J. Stamhuis, “PIVlab - Time-Resolved Digital Particle Image Velocimetry Tool for MATLAB,” [Online]. Available: https://figshare.com/articles/PIVlab_version_1_35/1092508. [Acedido em Março 2017].
- [118] W. Thielicke, “The flapping flight of birds: Analysis and application,” *Rijksuniversiteit Groningen*, 2014.
- [119] R. Suwanarusk, B. M. Cooke, A. M. Dondorp, K. Silamut, J. Sattabongkot, N. J. White e R. Udomsangpetch, “The Deformability of Red Blood Cells Parasitized by Plasmodium falciparum and P. vivax,” *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 189, pp. 190-194, Janeiro 2004.
- [120] S. Shin, Y.-H. Ku, J.-S. Suh e M. Singh, “Rheological characteristics of erythrocytes incubated in glucose media,” *IOS Press*, vol. 38, pp. 153-161, 2008.
- [121] T. Yaginuma, M. S. N. Oliveira, R. Lima, T. Ishikawa e T. Yamaguchi, “Human red blood cell behavior under homogeneous extensional flow in a hyperbolic shaped microchannel,” *Biomicrofluidics*, vol. 7, p. 054110, Setembro 2013.
- [122] D. Paço, R. Lima, G. Minas e S. O. Catarino, “Red blood cells deformability as a malaria biomarker,” *Proceedings of the IEEE 5th Portuguese Meeting on Bioengineering (ENBENG)*, pp. 16-18, 2017.

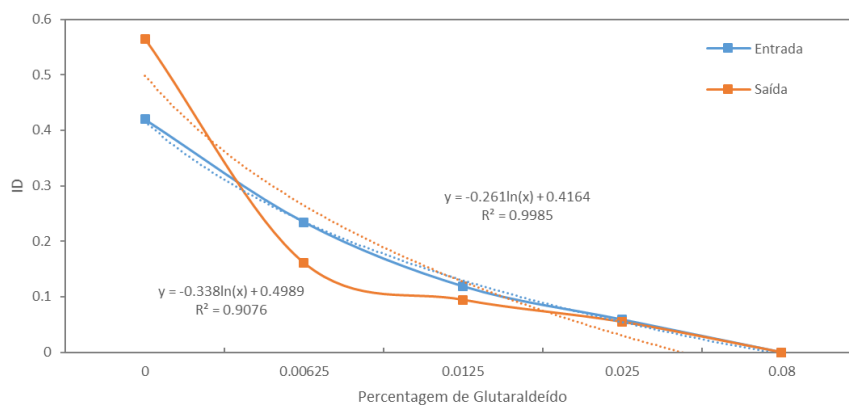
Anexos

Anexo 1

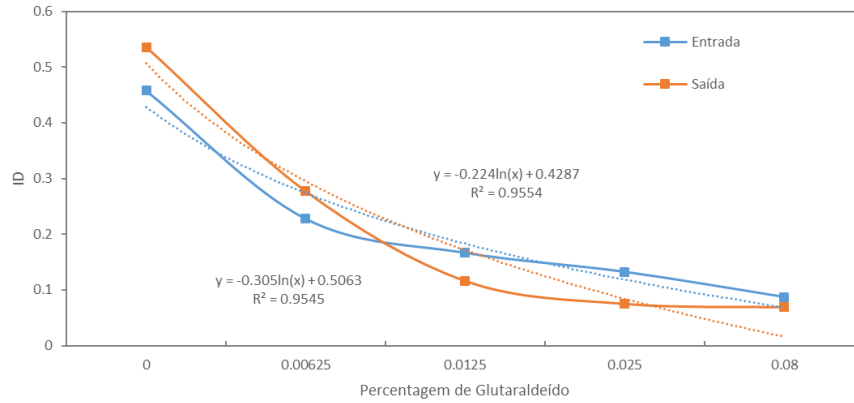
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glutaraldeído utilizado na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



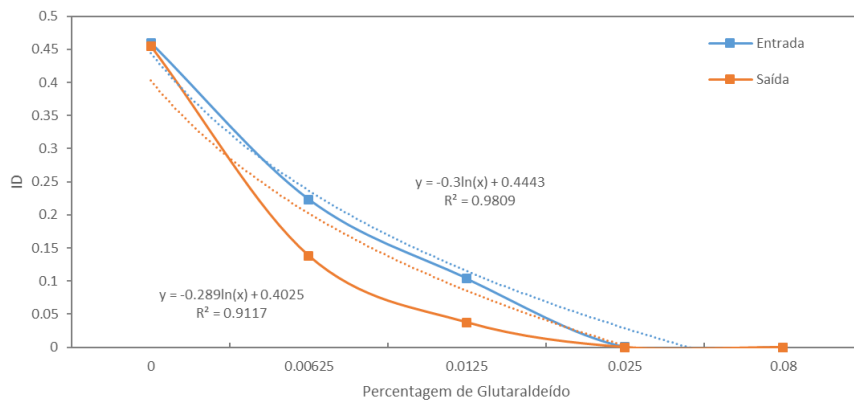
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glutaraldeído utilizado na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



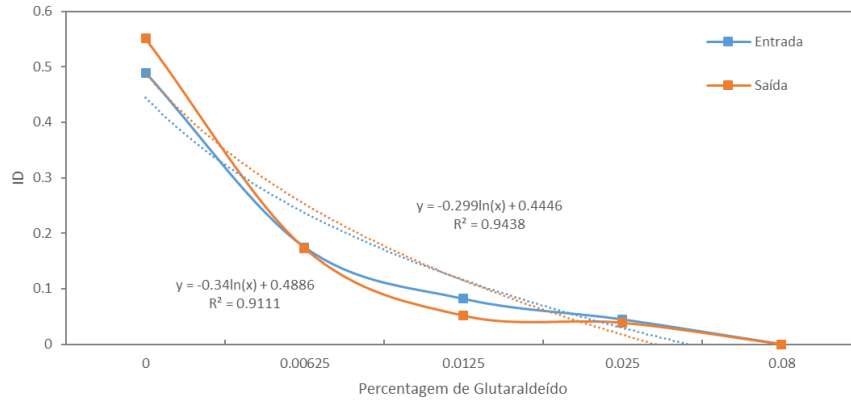
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glutaraldeído utilizado na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



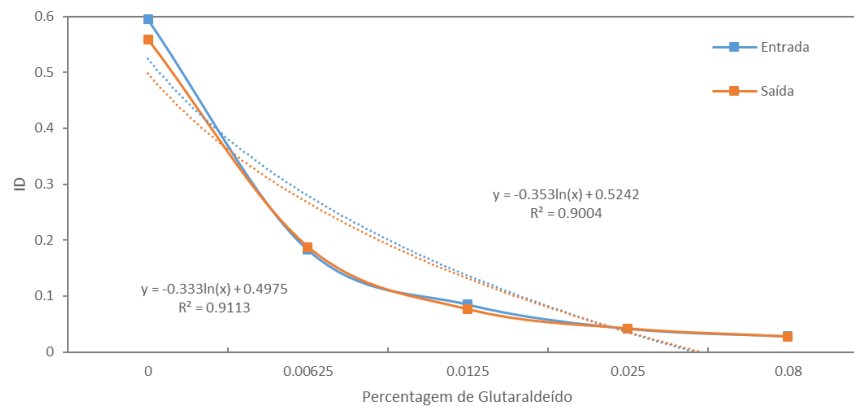
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glutaraldeído utilizado na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



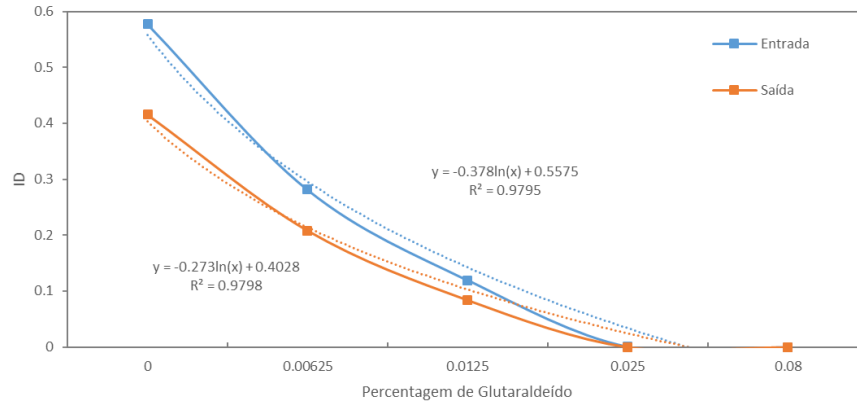
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glutaraldeído utilizado na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



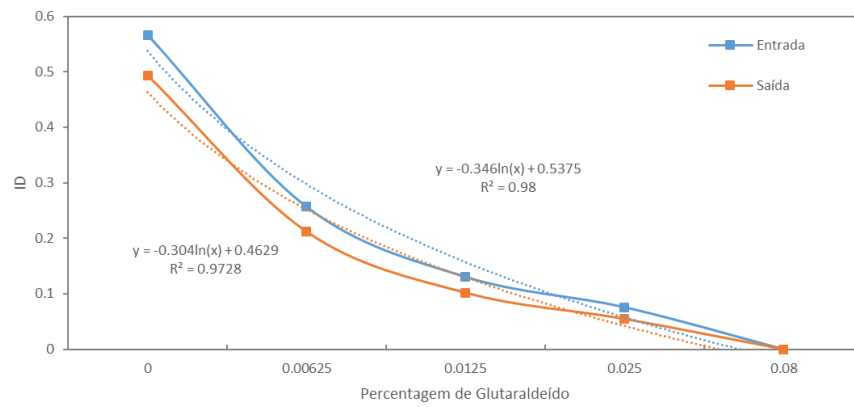
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glutaraldeído utilizado na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



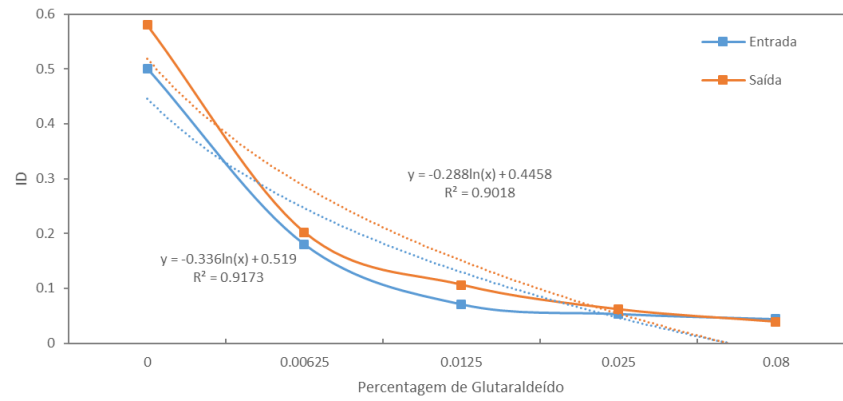
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glutaraldeído utilizado na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glutaraldeído utilizado na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.

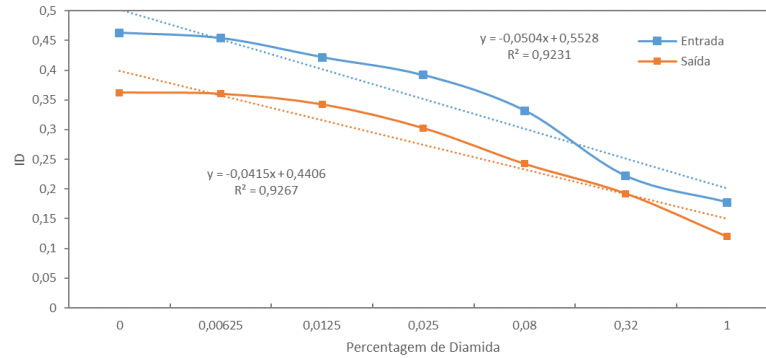


- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glutaraldeído utilizado na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.

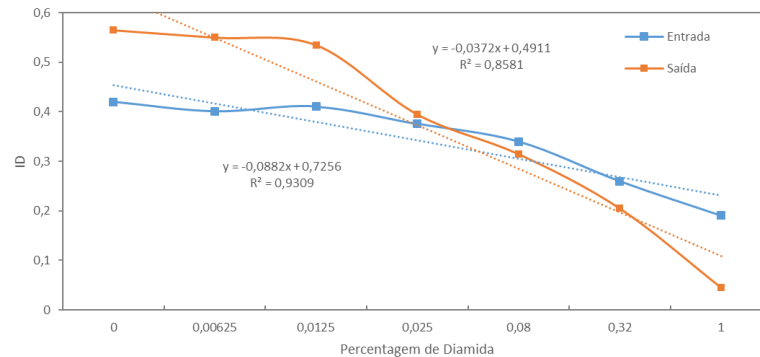


Anexo 2

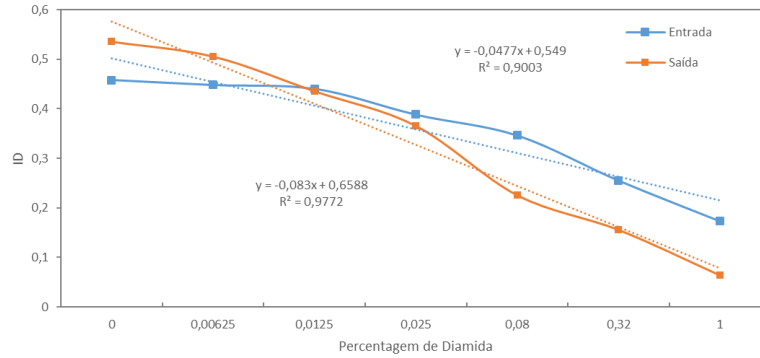
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de diamida utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



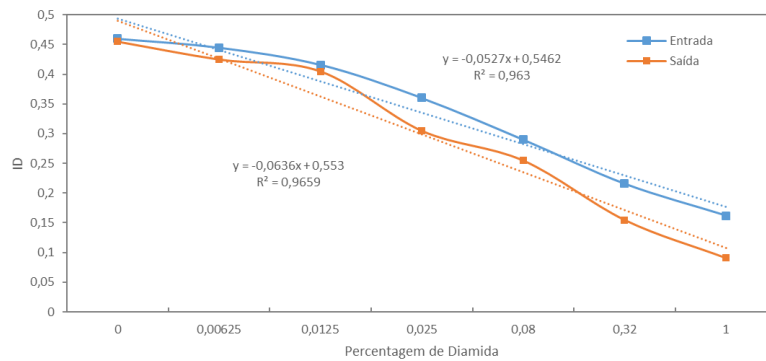
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de diamida utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



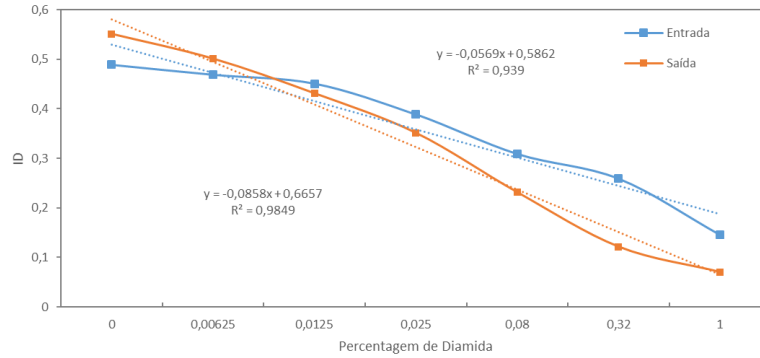
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de diamida utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 10 µm de largura com um caudal de 0.1 µL/min. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



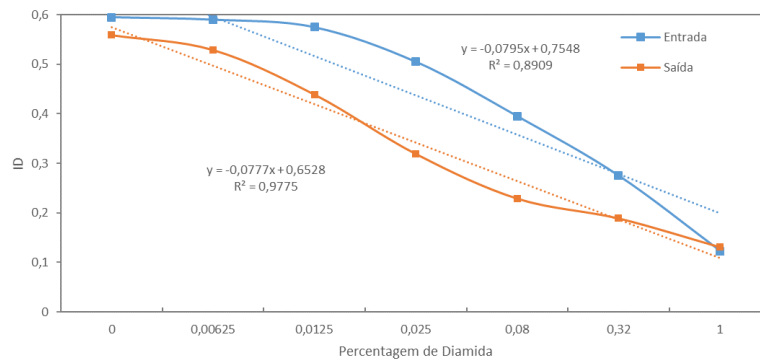
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de diamida utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 6 µm de largura com um caudal de 1 µL/min. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



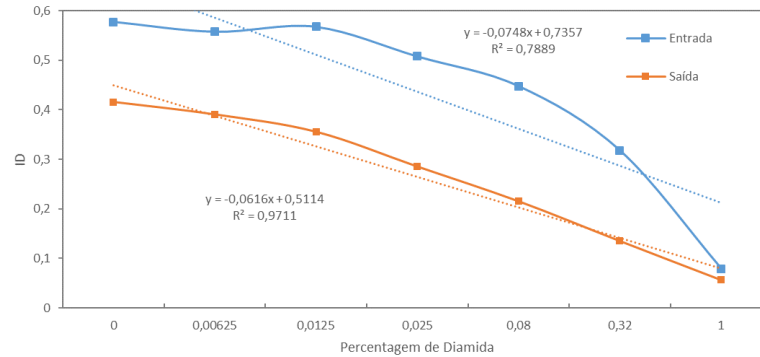
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de diamida utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



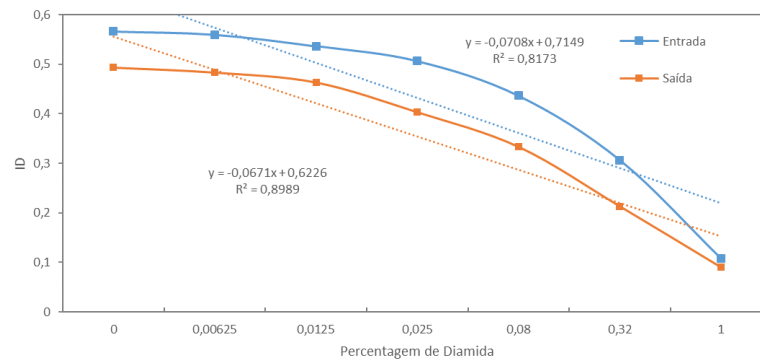
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de diamida utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



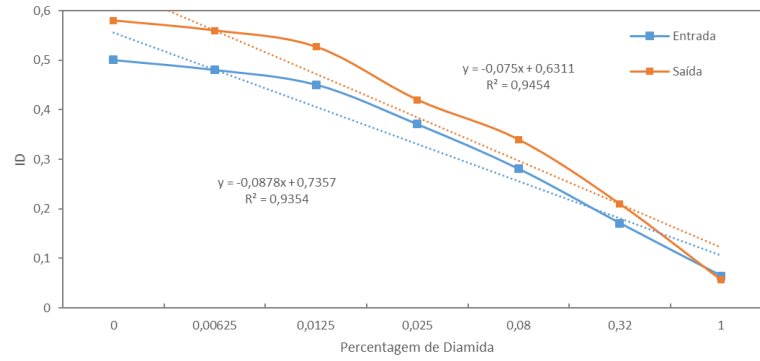
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de diamida utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de diamida utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.

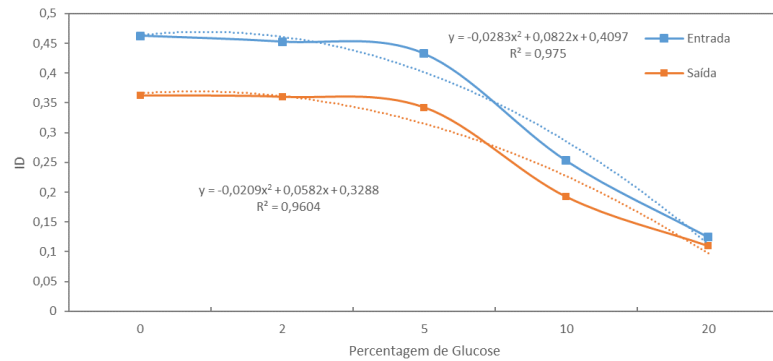


- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de diamida utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.

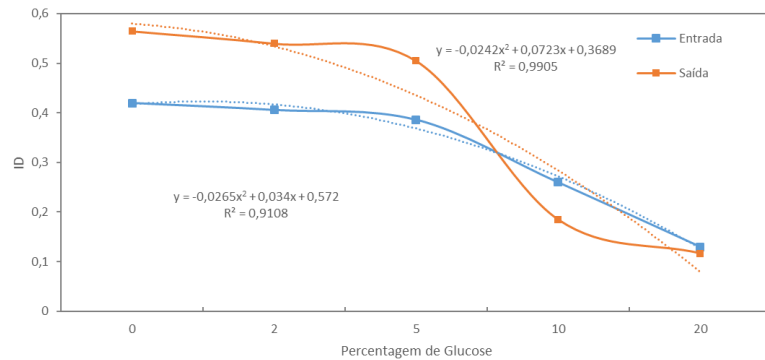


Anexo 3

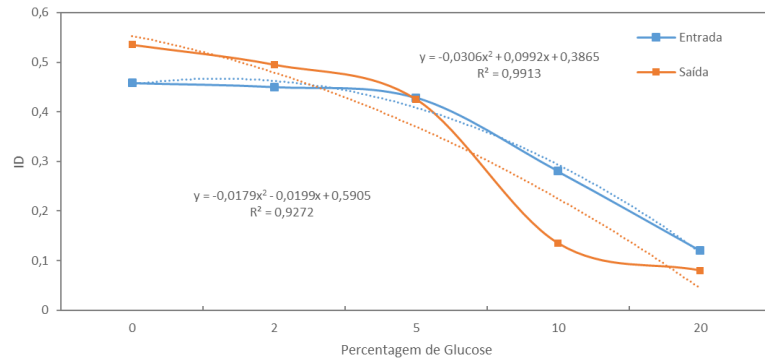
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glucose utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



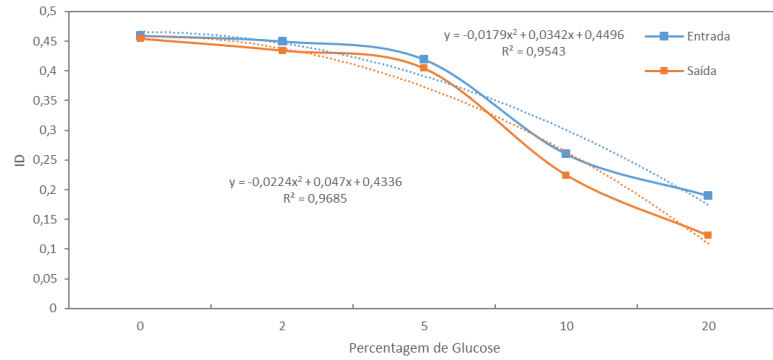
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glucose utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



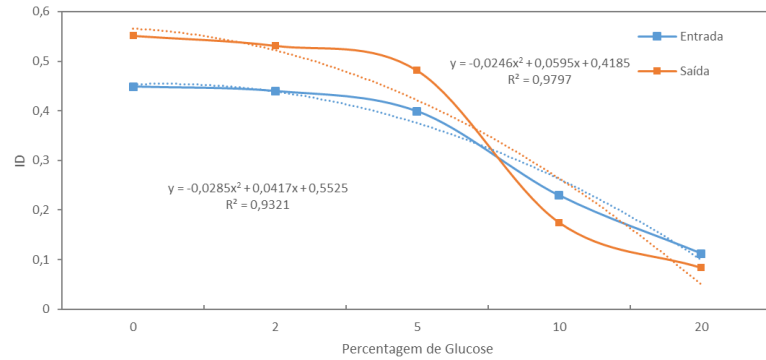
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glucose utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



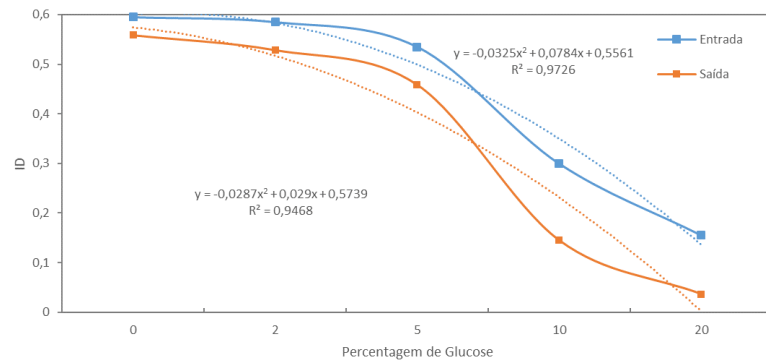
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glucose utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



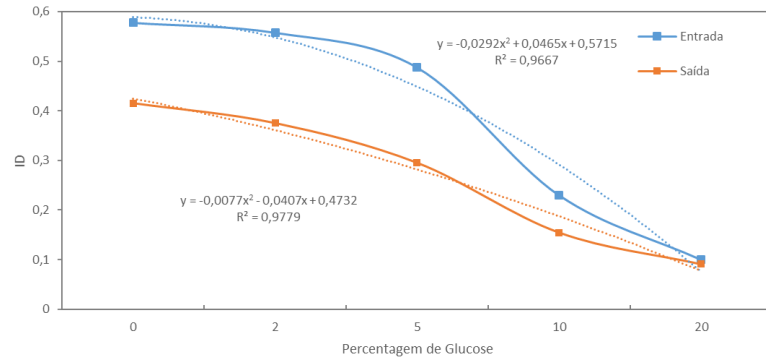
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glucose utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



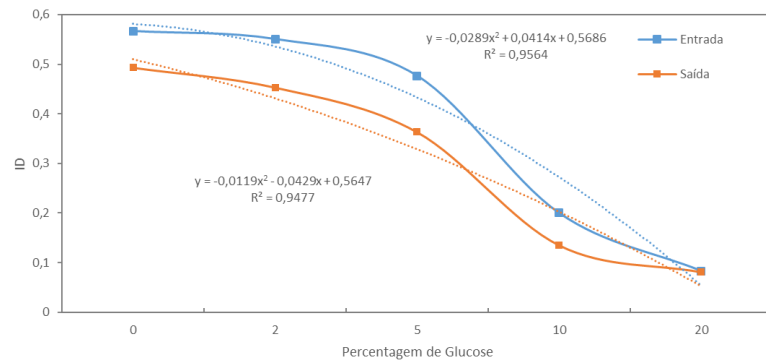
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glucose utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



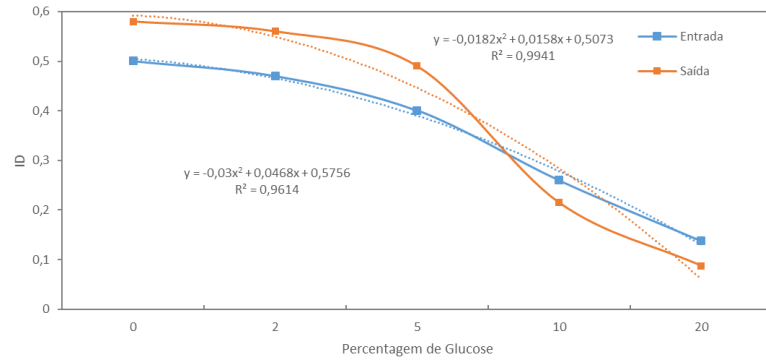
- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glucose utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.



- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glucose utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.

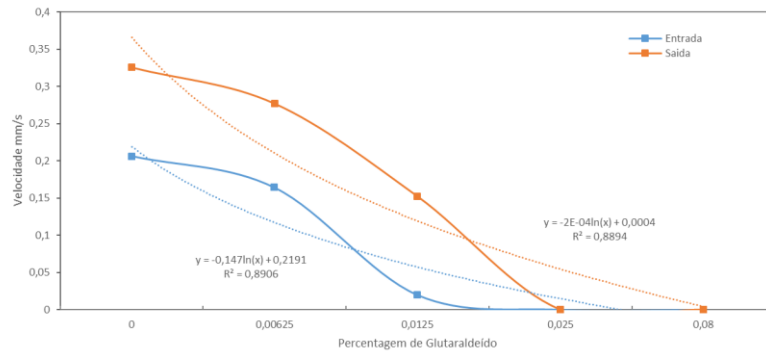


- Variação do ID (adimensional) em função da percentagem de glucose utilizada na modificação dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva laranja) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo do ID dos GVs.

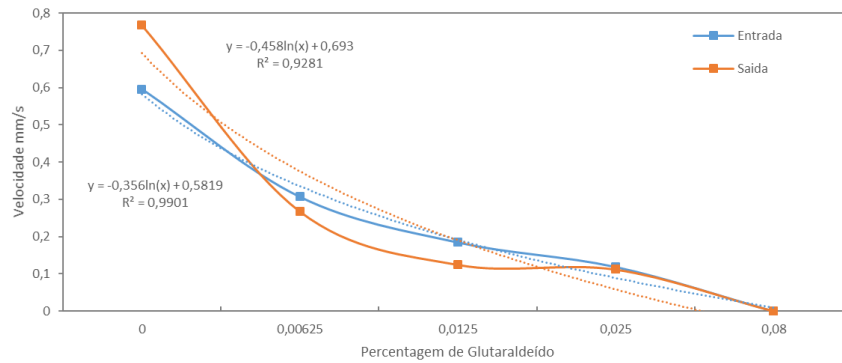


Anexo 4

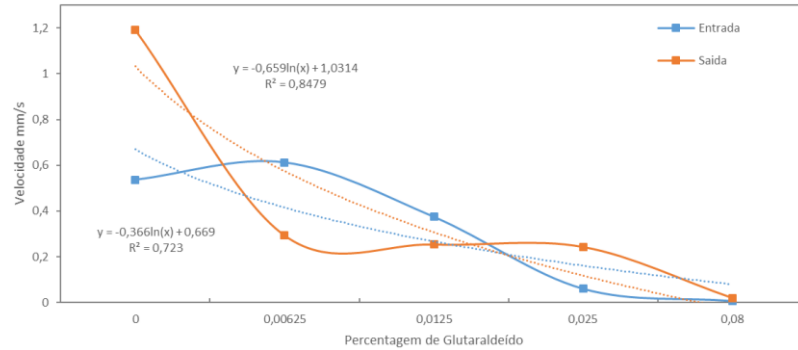
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glutaraldeído utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



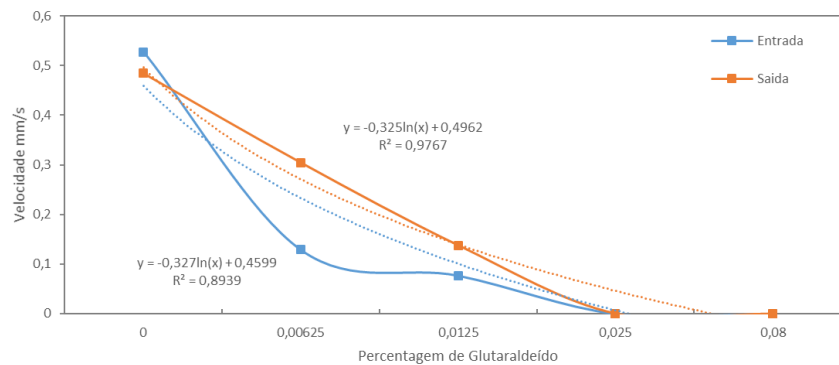
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glutaraldeído utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



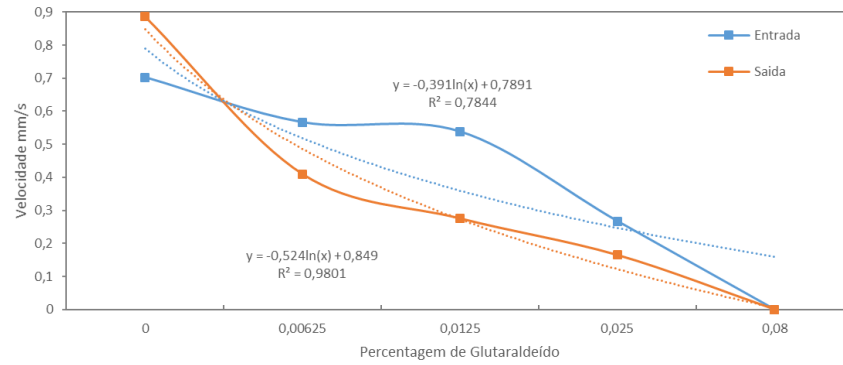
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glutaraldeído utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 10 µm de largura com um caudal de 0.1 µL/min. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



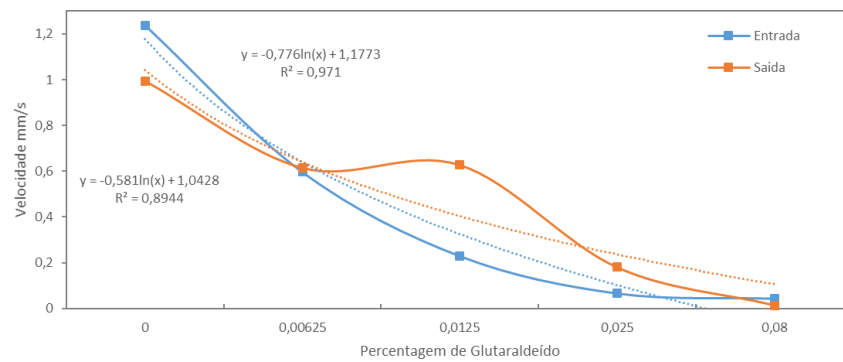
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glutaraldeído utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 6 µm de largura com um caudal de 1 µL/min. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



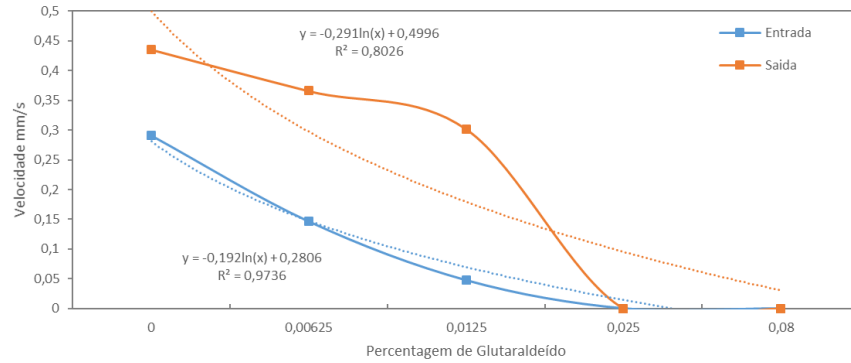
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glutaraldeído utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



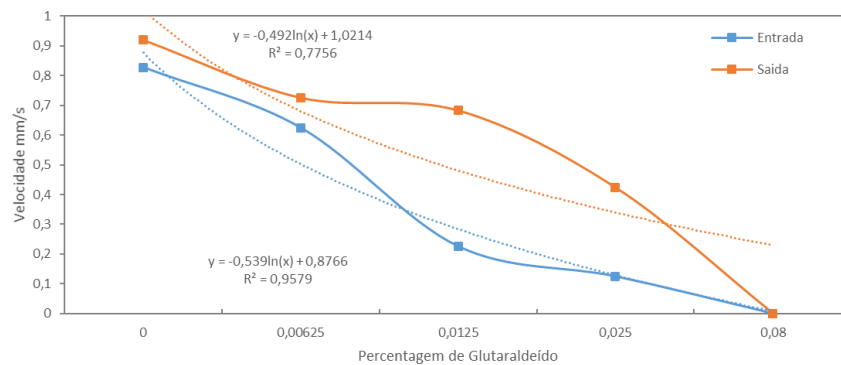
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glutaraldeído utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



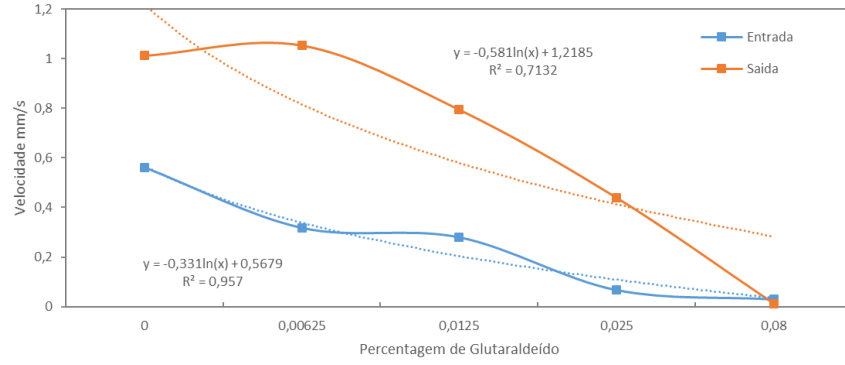
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glutaraldeído utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 3 μL/min. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glutaraldeído utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 3 μL/min. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.

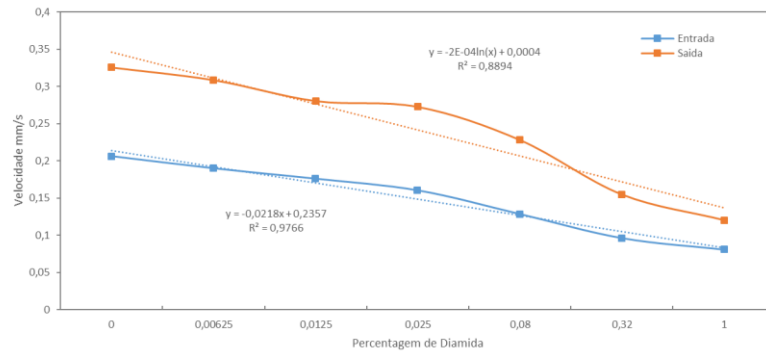


- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glutaraldeído utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência logarítmicas para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.

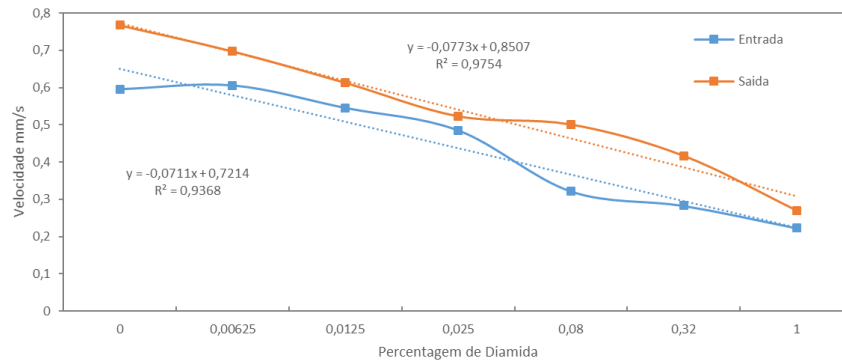


Anexo 5

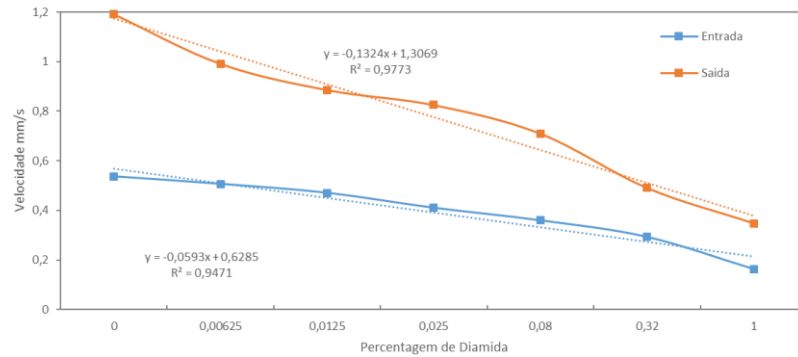
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de diamida utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



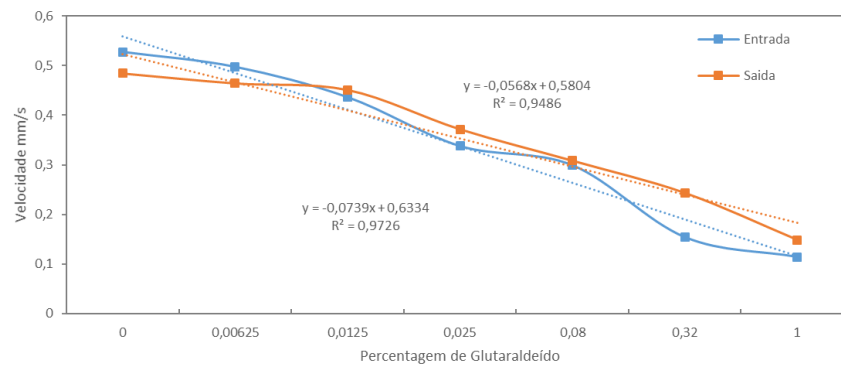
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de diamida utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



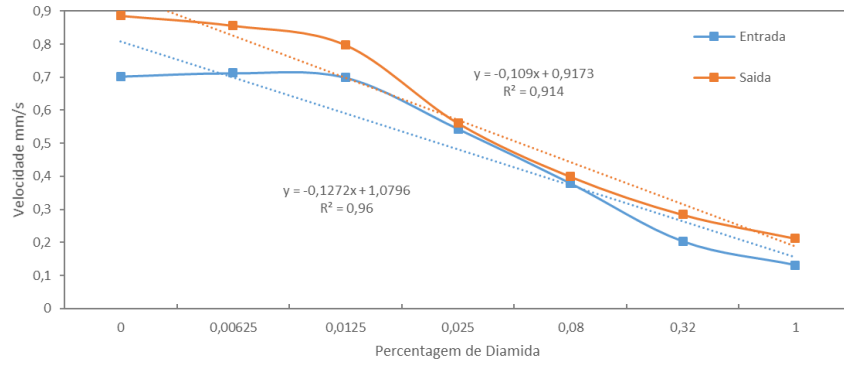
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de diamida utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



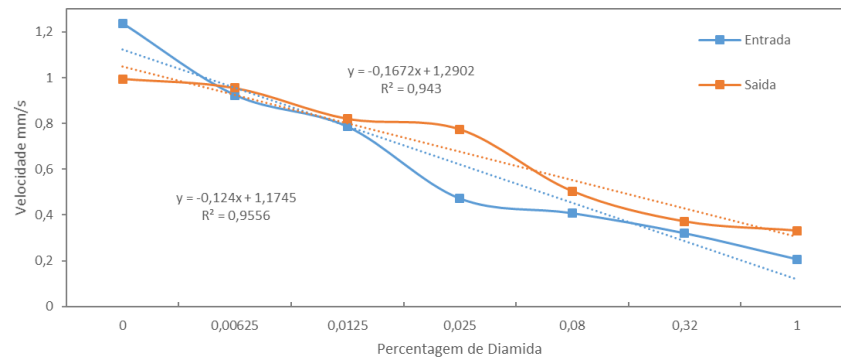
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de diamida utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



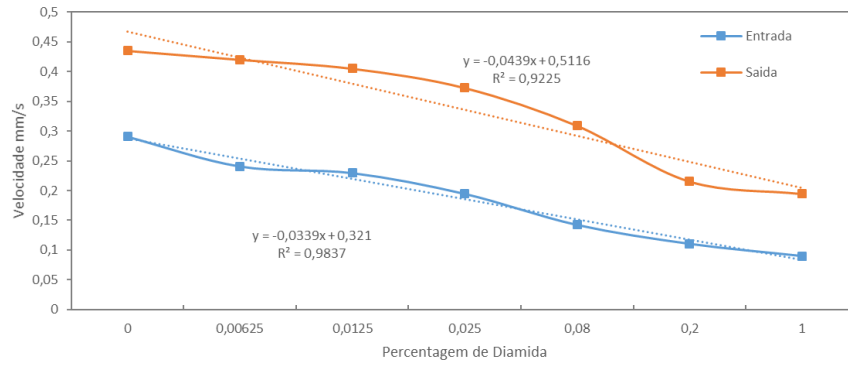
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de diamida utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



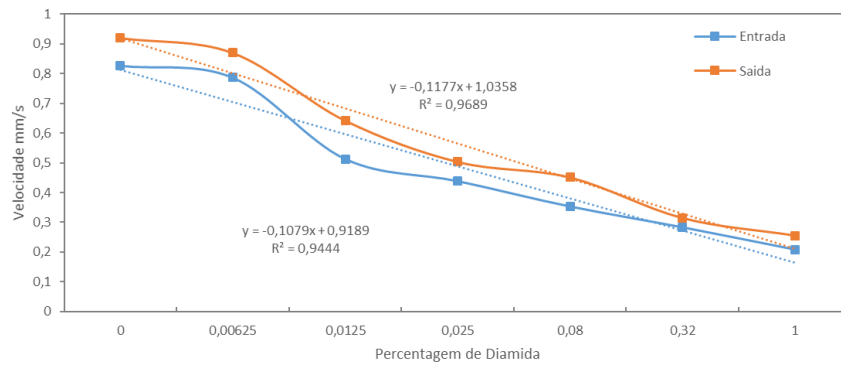
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de diamida utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



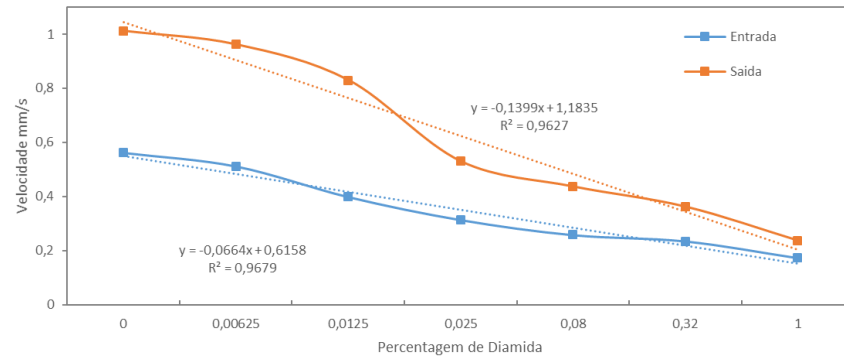
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de diamida utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de diamida utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.

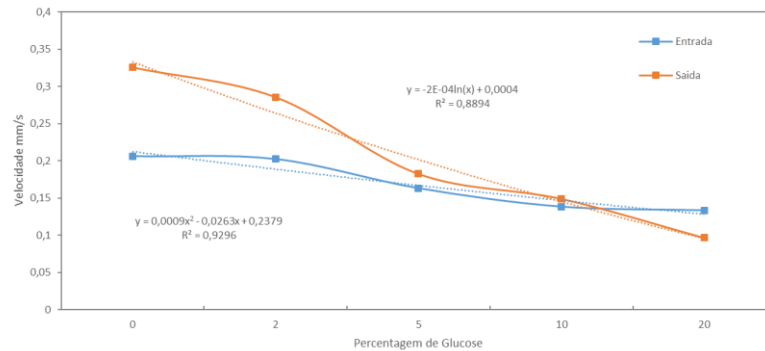


- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de diamida utilizado no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência lineares para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.

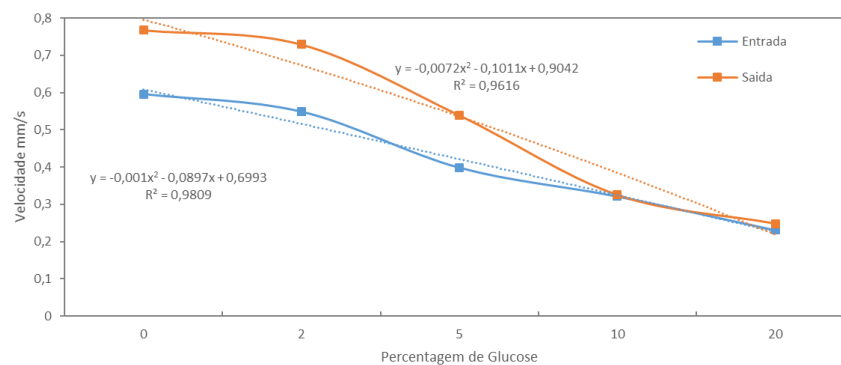


Anexo 6

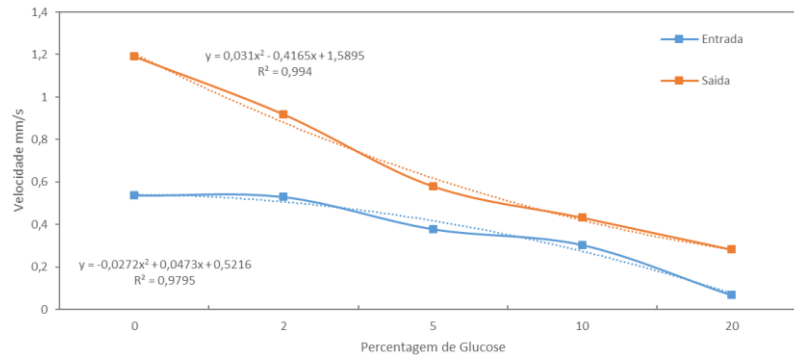
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glucose utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



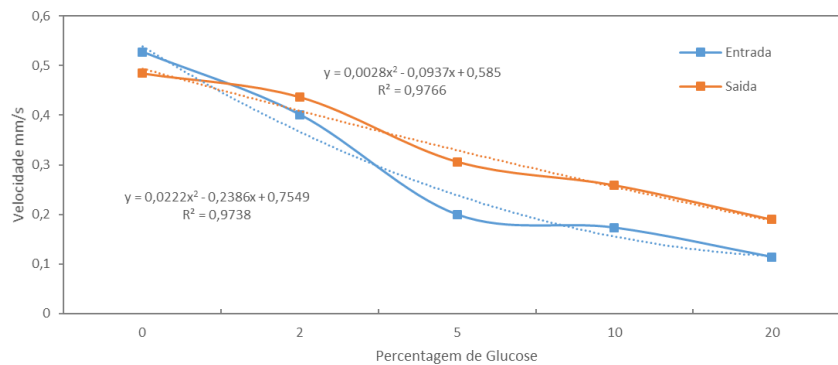
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glucose utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



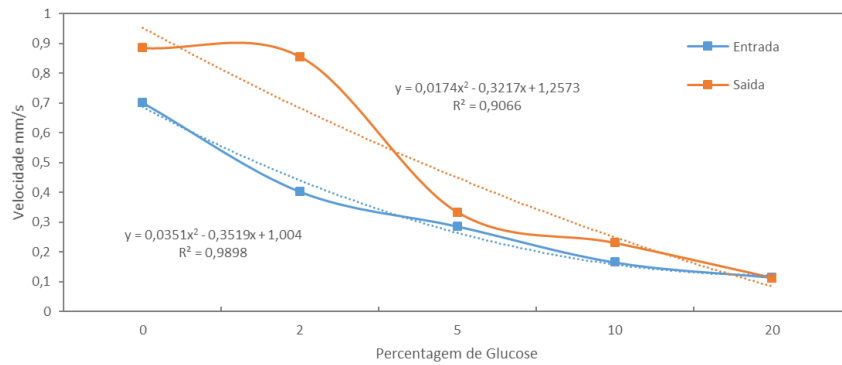
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glucose utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



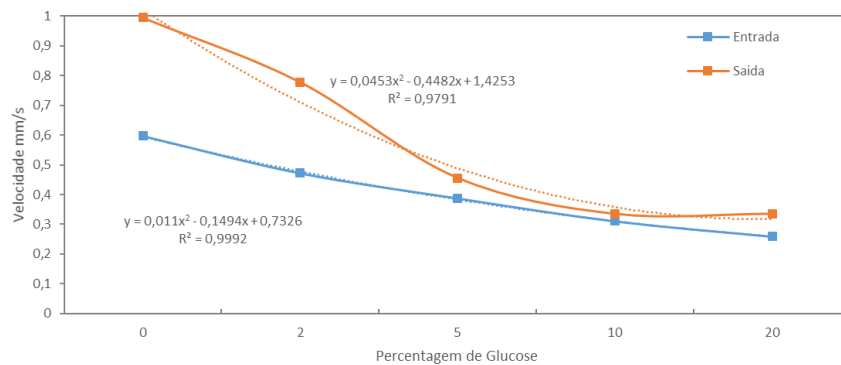
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glucose utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



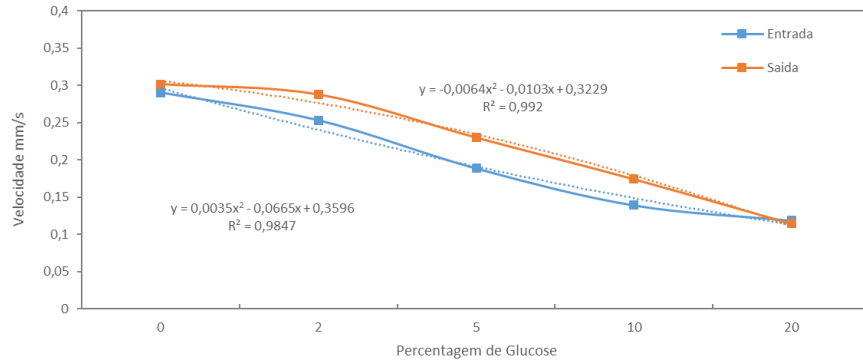
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glucose utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



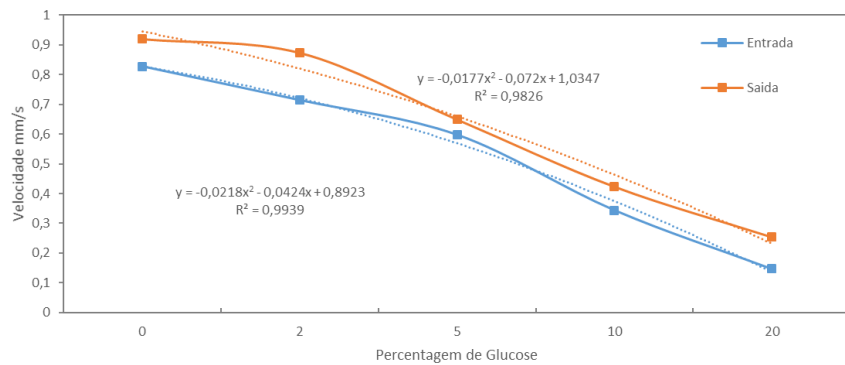
- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glucose utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glucose utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 6 μm de largura com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glucose utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 8 μm de largura com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.



- Variação da velocidade com o aumento da percentagem de glucose utilizada no tratamento dos GVs, à entrada (curva azul) e à saída (curva vermelha) do microcanal de 10 μm de largura com um caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tracejado estão apresentadas as linhas de tendência polinomiais de grau 2 para ilustrar o decréscimo da velocidade dos GVs.

