



**ipb**

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA**  
Escola Superior de Tecnologia e Gestão

**Conceção de um dispositivo de  
micro-cromatografia hidrodinâmica  
para separação de células sanguíneas  
e visualização do mecanismo  
de separação**

**Bianca Catarina de Sousa Pires**

Relatório Final do Trabalho de Projeto apresentado à

**Escola Superior de Tecnologia e Gestão**

**Instituto Politécnico de Bragança**

para obtenção do grau Mestre em

**Tecnologia Biomédica**

Outubro de 2012



**Conceção de um dispositivo de  
micro-cromatografia hidrodinâmica para  
separação de células sanguíneas e  
visualização do mecanismo de separação**

**Bianca Catarina de Sousa Pires**

Relatório Final do Trabalho de Projeto apresentado à  
**Escola Superior de Tecnologia e Gestão**  
**Instituto Politécnico de Bragança**  
para obtenção do grau Mestre em  
**Tecnologia Biomédica**

Orientadores:

**Doutor Ricardo Dias**

**Doutor Rui Lima**

**Doutor António Ribeiro**

“Este Trabalho de Projeto dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas  
pelo júri.”

Outubro de 2012



# AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação não teria sido concluída sem o apoio, o incentivo e a colaboração daqueles que estiveram presentes ao longo da sua execução, às quais quero deixar um sincero agradecimento. Primeiramente quero agradecer aos orientadores deste projeto:

- ao Prof. Dr. Ricardo Dias, pelos ensinamentos e explicações transmitidos, pela orientação ao longo deste trabalho de projeto, e também pela disponibilidade e paciência;

- ao Prof. Dr. Rui Lima, pelas sugestões e contribuições na realização do trabalho prático.

Gostaria de deixar também um agradecimento especial à professora Prof. Dr.<sup>a</sup> Teresa Correia da Escola Superior Agrária e à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carina Rodrigues da Escola Superior de Saúde, que sempre se mostraram disponíveis tanto para a requisição de material, como na troca de informação.

À Prof. Técnica de Laboratório Maria João, assim como à colega Diana Pinho pela assistência, apoio técnico, e paciência que me prestaram nos laboratórios.

À minha família, em especial à minha mãe a quem dedico esta dissertação, por todo o apoio, dedicação e carinho.

Ao meu namorado pelo amor, paciência que teve para comigo, e pelas dicas muitas vezes úteis.

A todos os professores e colegas, a todos que de alguma forma conviveram comigo nestes dois anos de mestrado, não apenas pelas horas de trabalho, mas também pelos momentos de descontração e boa disposição.

Gostaria também de agradecer o apoio da FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia), do QREN, da União Europeia (FEDER) e do programa COMPETE, no âmbito dos projetos PTDC/SAU-BEB/105650/2008, PTDC/SAU-BEB/1087280/2008, PTDC/SAU-EME-MFE/099109/2008, e PTDC/SAU-ENB/116929/2010.



# RESUMO

As células que compõem o sangue apresentam tamanhos diferentes. Estudos anteriores revelam que esta diferença de tamanhos leva a diferentes velocidades de migração das diferentes células em canais com diâmetros próximos das arteríolas. Este trabalho teve como intuito o estudo das velocidades de migração de glóbulos vermelhos (GVs) numa rede de canais formados por empacotamentos de esferas de vidro, este método é conhecido por cromatografia hidrodinâmica.

Para tal procedeu-se ao empacotamento de várias colunas tubulares com esferas de vidro de diferentes diâmetros. Foram feitos 5 empacotamentos nos quais os diâmetros médios das esferas eram 115, 150, 337,5, 875 e 2000  $\mu m$ . Para cada coluna empacotada fez-se passar no seu interior uma suspensão de GVs de ovelha em soro fisiológico (1% em volume de GVs), do qual se retirou o tempo de residência dos GVs para diferentes caudais: 0,25 mL/min a 3 mL/min. Repetiu-se este procedimento para uma solução de sacarose a uma concentração de 1 g/L, também para os mesmos caudais, de forma a permitir o cálculo dos RRTs (a razão entre o tempo de residência dos GVs e o tempo de residência da sacarose), sendo estes valores menores que um na esmagadora maioria dos casos.

Os valores obtidos para os RRTs sugerem que alguns dos empacotamentos desenvolvidos podem ser utilizados para separar GVs de moléculas dissolvidas no sangue (como as proteínas), com dimensões da ordem de grandeza da sacarose, dado que os GVs se movem mais rapidamente no interior das colunas empacotadas do que moléculas dissolvidas de menor dimensão que os GVs. Determinou-se por microscopia que o diâmetro dos GVs de ovelha era cerca de 4,6  $\mu m$ .

Por fim, para haver uma maior perceção do fluxo sanguíneo no interior das colunas empacotadas produziram-se alguns microcanais em polidimetilsiloxano com características aproximadas às colunas empacotadas, onde se observou a formação de camadas livres de células e zonas de estagnação (em diferentes regiões dos microcanais). O primeiro fenómeno conduz a um aumento da velocidade de migração dos GVs enquanto o segundo conduz à retardação dos GVs.

**Palavras chave:** Glóbulos Vermelhos (GVs); RRT; Cromatografia hidrodinâmica (HDC); Microcanais.



# ABSTRACT

The cells that comprise the blood have different sizes. Previous studies have shown that this size difference can lead to different rates of migration of the cells in channels with diameters of the arterioles. This work aimed to study the migration velocities of red blood cells (GVs) through channels formed by the packing of glass beads, this method is known by hydrodynamic chromatography.

For this, different chromatographic columns were packed with glass beads of different diameters. Five packings were made for which the mean diameters of the spheres were 115, 150, 337.5, 875 and 2000  $\mu\text{m}$ . A suspension of GVs from sheep in physiological saline (with 1% Hct) was passed inside each packed column and the residence time of the GVs was calculated for different flow rates: 0.25  $\text{mL}/\text{min}$  to 3  $\text{mL}/\text{min}$ . This procedure was repeated for a sucrose solution at a concentration of 1g/l to allow the calculation of RRTs (the ratio between the residence time of the GVs and residence time of sucrose), this values being inferior to one in the majority of the experiments. With the values obtained for the RRTs it was concluded that some of the developed packed columns can be used to separate the GVs from small molecules dissolved in the blood plasma (such as proteins), with dimensions of the order of magnitude of sucrose, since the GVs migrate faster through the packed columns than molecules smaller than them. Using a microscope it was possible to calculate the diameter of the GVs (around 4,6  $\mu\text{m}$ ).

Finally, to have a greater perception of blood flow within the packed columns, it were produced microchannels constituted by polydimethylsiloxane with characteristics approximating the packed columns and it was possible to observe the formation of cell-free layers and zones of stagnation (at different regions of the microchannels). The former effect leads to the increase of the GV's velocities while the second one has an opposite influence in the GV's velocities.

**Keywords:** Red Blood Cells (GVs); RRT; Hydrodynamic Chromatography (HDC); Microchannels.



# CONTEÚDO

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract .....	ix
Lista de Figuras .....	xv
Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Abreviaturas .....	xix
Capítulo 1- Introdução .....	1
1.1 Objetivo .....	1
1.2 Estrutura do relatório .....	2
Capítulo 2 – Revisão da Literatura.....	3
2.1 Mecânica dos Fluidos .....	3
2.1.1 Resistência Hidráulica.....	5
2.1.2 Fluxo Turbulento.....	7
2.2 Cromatografia Hidrodinâmica .....	8
Capítulo 3 - Microcirculação.....	15
3.1 Sistema circulatório .....	15
3.1.1 Os capilares .....	17
3.1.2 As artérias .....	17
3.1.3 As Veias .....	17
3.2 Composição do sangue .....	18
3.2.1 Composição do plasma .....	18
3.2.2 Os eritrócitos .....	18
3.2.3 Os leucócitos .....	19
3.2.4 As plaquetas .....	19
3.3 Hematócrito .....	20

3.4 Viscosidade do sangue.....	21
Capítulo 4 – Materiais e Métodos .....	23
4.1 Cromatografia.....	23
4.1.1 Preparação do sistema Cromatográfico .....	23
4.1.2 Preparação da fase móvel.....	24
4.1.3 Preparação de uma fase móvel com PEG .....	25
4.1.4 Preparação de amostras de GVs em soro com 1% Hct.....	25
4.2 Empacotamento de colunas de HPLC .....	26
4.3 Microcanais .....	26
4.3.1 Produção de microcanais .....	26
4.3.2 Preparação de amostras de GVs para o escoamento em microcanais.....	29
4.3.3 Análise do escoamento de GVs no microcanal produzido .....	30
Capítulo 5 – Apresentação e Discussão dos Resultados .....	31
5.1 Testes com PEG enquanto expensor do volume sanguíneo .....	31
5.2 Fase móvel com adição de PEG 10 .....	34
5.3 Resultados cromatográficos.....	34
5.4 Influência do caudal no RRT.....	36
5.5 Determinação do diâmetro experimental dos GVs de ovino .....	38
5.6 Determinação do diâmetro efetivo dos GVs de ovino.....	39
5.7 Comparação dos RRTs experimentais com os teóricos.....	41
5.8 Fabricação dos microcanais em PDMS .....	42
5.9 Processamento de imagem.....	44
5.10 Análise de Escoamentos dos GVs em microcanais .....	45
Capítulo 6 – Conclusões e Trabalhos Futuros.....	51
6.1 Conclusões.....	51
6.2 Trabalho Futuro .....	52
Referências Bibliográficas .....	53

APÊNDICE A .....	55
APÊNDICE B .....	59
APÊNDICE C .....	65



# LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> – Fluxo laminar no interior de um tubo cilíndrico. Nesta imagem é possível observar que cada anel de fluido tem velocidade própria, gerando-se assim atrito entre as várias camadas de fluido em movimento –viscosidade. Adaptado de [3]. .....	4
<b>Figura 2.2</b> – Representação das propriedades das resistências hidráulicas do sistema circulatório, onde A,B,C,D e E representam os elementos de uma rede vascular (artéria, arteríola, capilar, vénula, veia, respetivamente). Adaptado de [3]. .....	6
<b>Figura 2.3</b> – Comportamento do fluxo com o aumento da velocidade e da pressão; após ser atingida uma velocidade critica o fluxo passa de laminar a turbulento. ....	7
<b>Figura 2.4</b> – Princípio de separação da HDC, onde uma partícula com raio efetivo ( $\emptyset$ ) é excluída da parede num canal com diâmetro $h$ no qual existe um perfil de velocidade parabólico $u(r)$ . Adaptado de [13] . .....	9
<b>Figura 2.5</b> – Variação de RRT em função de $\lambda$ [23]. .....	13
<b>Figura 3.1</b> – Variação das propriedades do sangue ao longo de diferentes zonas do sistema circulatório. ....	15
<b>Figura 3.2</b> – Vasos sanguíneos e a sua constituição geral. Adaptado de: [20]. .....	16
<b>Figura 3.3</b> – A: um eritrócito maduro, onde se evidencia a sua forma bicôncava; B: deformação do eritrócito perante uma bifurcação. Adaptado de: [21]. .....	19
<b>Figura 3.4</b> – Imagem A representa três granulócitos do tipo neutrófilo; na imagem B está representado um linfócito com grânulos [21]. .....	19
<b>Figura 3.5</b> – Plaquetas agregadas a uma parede de um vaso sanguíneo [21]. .....	20
<b>Figura 3.6</b> – Esquema representativo do hematócrito. O tubo da esquerda antes da centrifugação, e o tubo da direita após. Adaptado de: [15]. .....	21
<b>Figura 3.7</b> – Representação do efeito Fahraeus-Linqvist. Adaptado de [3]. .....	22
<b>Figura 4.1</b> – Aparato do sistema cromatográfico.....	23
<b>Figura 4.2</b> – Na imagem A está representado o empacotamento de esferas de vidro num capilar cilíndrico; a imagem B representa um esboço da disposição das esferas.....	27
<b>Figura 4.3</b> – Máscara de uma das geometrias desenvolvidas para um microcanal. ....	27
<b>Figura 4.4</b> – Obtenção de geometrias para os microcanais através do método fotográfico. ....	29

<b>Figura 4.5</b> – Microcanais obtidos: A – Círculos com diâmetro 300 $\mu\text{m}$ ; B - Círculos com diâmetro 600 $\mu\text{m}$ ; C - Círculos com diâmetro 800 $\mu\text{m}$ .....	29
<b>Figura 5.1</b> – Da esquerda para a direita, soluções com 10g/L logo após preparo, na imagem do meio com 6 horas depois, e 24 horas depois respectivamente. Os tubos: 1 - Soluções de PEG 35 000; 2 - PEG 10 000 e 3 – solução padrão.....	32
<b>Figura 5.2</b> – Da esquerda para a direita, soluções com 100g/L logo após preparo, na imagem do meio com 6 horas depois, e 24 horas depois respectivamente. Os tubos: 1 - Soluções de PEG 35 000; 2 - PEG 10 000 e 3 – solução padrão.....	32
<b>Figura 5.3</b> – A: sobrenadante límpido resultante da solução com PEG 10 com concentração de 10g/L; B: sobrenadante com sujidade resultante do PEG 10 com concentração de 100g/L. ....	32
<b>Figura 5.4</b> – A: esfregaço relativo ao PEG 10 g/L; B: esfregaço relativo ao PEG 10 a 100 g/L. ....	33
<b>Figura 5.5</b> – Comportamento do fluxo de GVs numa solução de PEG 10 com concentração de 10g/L. As imagens A e B representam partes do mesmo microcanal, onde a vermelho se assinalam pequenas formações de camada livre de plasma.....	33
<b>Figura 5.6</b> – Ilustração de um cromatograma. ....	34
<b>Figura 5.7</b> – A, B, C, e D gráficos de RRT em função do caudal para os empacotamentos 0,115, 0,150, 0,3375 e 0,875 $\mu\text{m}$ . ....	37
<b>Figura 5.8</b> – A - Imagem original com GVs obtida no microscópio invertido; B - Imagem das GVs após o pré-processamento, filtragem e realce de contraste; C - Segmentação da imagem, por binarização, e, determinação dos diâmetros horizontal e vertical, de cada uma das células. ....	38
<b>Figura 5.9</b> – Histograma com a frequência dos diâmetros dos GVs.....	39
<b>Figura 5.10</b> – A: Máscara em papel autocolante; B: Microcanais obtidos pelas máscaras em papel autocolante. ....	42
<b>Figura 5.11</b> – Imagem do microcanal obtido usando a máscara em papel autocolante.....	42
<b>Figura 5.16</b> – Linhas de escoamento à saída do microcanal.....	46
<b>Figura 5.17</b> – Nesta imagem é possível observar a formação de camada livre de células ao redor do círculo. ....	46
<b>Figura 5.18</b> – Esquematização do efeito de bifurcação e confluência. ....	47

# LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1-</b> Características dos vasos da microcirculação .....	16
<b>Tabela 3.2</b> - Número e percentagem dos glóbulos do sangue. [15] .....	20
<b>Tabela 4.1</b> – Dimensões das colunas de eluição.....	26
<b>Tabela 5.1</b> – Resultados de RRT para os diferentes empacotamentos .....	36
<b>Tabela 5.2</b> – Determinação do diâmetro efetivo dos GVs.....	40



# LISTA DE ABREVIATURAS

**CAD** – Computer Aided Design (Desenho assistido por computador)

**Dx 40** – Dextrano 40

**GVs** – Glóbulos Vermelhos

**HDC** – Hydrodynamic Chromatography (Cromatografia hidrodinâmica)

**Hct** – Hematócrito

**NaCl** – Cloreto de Sódio

**PDMS** – Polidimetilsiloxano

**PEG** – Polietilenoglicol

**RRT** – Tempo de retenção relativo



# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

### 1.1 OBJETIVO

O intuito deste trabalho foi analisar o escoamento dos glóbulos vermelhos (GVs) no interior de microcapilares.

A dificuldade de recolha de informação, e de controlo dos parâmetros associados ao comportamento do fluxo sanguíneo dentro do sistema de microcirculação *in vivo* [1], são alguns dos fatores que têm levado os investigadores a fazerem os seus estudos em tubos de vidro com geometrias simples (estudo *in vitro*) [2]. O estudo de modelos *in vitro* permite o controlo mais preciso das variáveis de interesse, e permite também o acesso a informação mais detalhada. Contudo, vários estudos revelam que a informação recolhida *in vitro* apresenta algumas discrepâncias relativamente aos dados recolhidos *in vivo*. Esta diferença deve-se essencialmente à constituição interna dos vasos sanguíneos (superfície endotelial), e também às geometrias curtas e irregulares que provocam resistência ao fluxo sanguíneo.

Apesar das discrepâncias observadas *in vivo* e *in vitro*, nunca foi quantificada uma evidência experimental em relação ao efeito causado pelas ramificações da microcirculação, havendo por isso necessidade de explorar técnicas que se adequem à avaliação deste efeito.

Neste projeto foram exploradas duas técnicas para analisar o fluxo de GVs. A primeira técnica foi a cromatografia hidrodinâmica e a segunda a visualização do fluxo em microcanais. Em qualquer um dos casos, os canais construídos apresentavam elevado grau de ramificação.

A cromatografia hidrodinâmica mede o tempo de residência dos GVs dentro das colunas de eluição, foram testadas colunas com características diferentes, nomeadamente, variando o diâmetro médio das esferas de vidro utilizadas nos empacotamentos. As colunas de eluição e os seus empacotamentos simulam capilares tubulares formando redes complexas para o escoamento do sangue, no entanto, porém, é quase impossível visuali-

zar o que ocorre dentro da coluna de eluição. Para tentar percebermos como ocorre o escoamento dos GVs dentro de uma coluna de eluição optou-se por recorrer aos dispositivos em polidimetilsiloxano (PDMS), que podem ter várias geometrias formando os microcanais. Estes dispositivos contêm canais dentro dos quais vai escoar o fluxo de sangue, que pode ser controlado com uma bomba de seringa e observado a microscópio. O avanço na área da microfabricação permitiu o avanço de técnicas de visualização nomeadamente o microscópio confocal invertido, ligado a uma câmara de alta velocidade que permite captar imagens e vídeos em tempo real. Desta forma obtemos dados que através de tratamento próprio, como por exemplo, o processamento de imagem, pode ser retirada informação sobre o escoamento dos GVs.

## **1.2 ESTRUTURA DO RELATÓRIO**

O trabalho realizado ao longo deste projeto está descrito neste relatório final, que foi organizado em 6 capítulos. O primeiro capítulo é relativo à introdução do trabalho desenvolvido, e explica a estrutura do relatório. O segundo capítulo trata do estado de arte, onde é feita uma revisão de literatura sobre o tema principal, a microcirculação de células em microcapilares cromatográficos. No terceiro capítulo, descreve-se a constituição da microcirculação e a função de cada um dos seus constituintes no organismo. No quarto capítulo, são descritos os materiais e os métodos utilizados no decorrer do trabalho prático. No quinto capítulo são apresentados os resultados obtidos e é feita a sua análise/discussão. Por último, no sexto capítulo são apresentadas as conclusões e as propostas de trabalhos futuros que poderão dar continuidade ao trabalho apresentado neste relatório.

# CAPÍTULO 2

## REVISÃO DA LITERATURA

Ao longo dos anos, vários métodos experimentais têm sido aplicados no sentido de entender o comportamento do fluxo sanguíneo na microcirculação. Grande parte do conhecimento sobre a microcirculação é baseada na observação do fluxo macroscópico, como por exemplo, o efeito de Fahraeus e de Fahraeus-Linqvist. O desenvolvimento das técnicas experimentais óticas tem contribuído para a obtenção de explicações do comportamento do fluxo através dos microvasos. Apesar dos primeiros resultados terem sido encorajadores, o estudo do comportamento do fluxo sanguíneo através do microscópico é limitado, o que se deve a vários fatores, tais como, baixa resolução espacial, dificuldade em controlar e reproduzir variáveis nos experimentos *in vivo*, erros óticos que surgem devido à irregularidade das paredes dos vasos, e à concentração elevada de células [1].

### 2.1 MECÂNICA DOS FLUIDOS

Para uma melhor compreensão do comportamento do escoamento de um fluido, é importante perceber alguns conceitos associados à Mecânica de Fluidos. Os fluidos são substâncias que quando sujeitas a tensões de corte são incapazes de manter a sua forma. Em regime laminar, a tensão de corte quando aplicada a uma substância atua no sentido de deslocar uma camada de líquido sobre outra (adjacente), porém surge uma força que se opõe a esse movimento, dada a **viscosidade** do fluido. A viscosidade é responsável pela resistência ao fluxo no interior de um tubo cilíndrico, o que leva à formação de camadas concêntricas de velocidades decrescentes do centro (velocidade máxima) até à periferia – parede do tubo onde a velocidade será nula. Verifica-se que estas camadas formadas apresentam alguma independência entre si evitando a mistura dos elementos de cada uma das camadas, efeito este designado de laminaridade de fluxo [3].

Considerando a Figura 2.1, para que ocorra fluxo no interior de um tubo, deve haver gradiente de pressão ( $\Delta P$ ) ao longo desse canal, que é dado pela Equação 1 que se segue [3]:

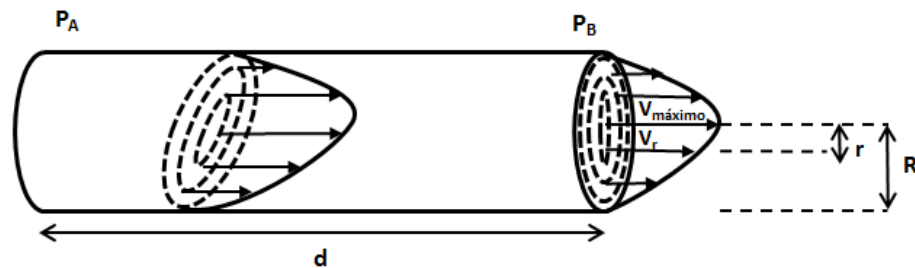
$$\Delta P = \frac{P_A - P_B}{d} \quad (1)$$

Sendo  $P_A$  a pressão no ponto A,  $P_B$  a pressão no ponto B, e,  $d$  a distância entre A e B.

Se o tubo tiver raio  $R$ , a velocidade do fluxo de um anel de líquido situado à distância  $r$  do eixo central do tubo [3] é descrita pela Equação 2.

$$V_r = V_{m\acute{a}x} \times \left(1 - \frac{r^2}{R^2}\right) \quad (2)$$

Da Equação 2 vem  $V_r$  a velocidade do líquido medida à distância ' $r$ ' do centro do tubo;  $V_{m\acute{a}x}$  igual à velocidade máxima do líquido no tubo;  $R$  corresponde ao raio do tubo e  $r$  a distância até ao centro do tubo. Assim, quando  $r = R$ ,  $V_r = 0$  e quando  $r = 0$ ,  $V_r = V_{m\acute{a}x}$ . Como  $V_r$  cresce em função  $r^2$ , o perfil de velocidades no interior de uma conduta tubular é parabólico, como se demonstra na Figura 2.1 [3].



**Figura 2.1** - Fluxo laminar no interior de um tubo cilíndrico. Nesta imagem é possível observar que cada anel de fluido tem velocidade própria, gerando-se assim atrito entre as várias camadas de fluido em movimento –viscosidade. Adaptado de [3].

A velocidade máxima é dada pela Equação 3, onde  $\eta$  representa o coeficiente de viscosidade, e a Equação 4 representa a equação de fluxo ( $F_r$ ) para cada anel de raio  $r$  [3]:

$$V_{m\acute{a}x} = \frac{\Delta P \times R^2}{4\eta} \quad (3)$$

$$F_r = V_r \times 2\pi r \quad (4)$$

Analisando as equações anteriores verifica-se que o fluxo ( $F_r$ ) é diretamente proporcional ao raio do tubo ( $R$ ) e à velocidade do fluido ( $V_r$ ) no seu interior.

A equação de *Hagen-Poiseuille* (Equação 5) permite notar que o fluxo é inversamente proporcional ao comprimento do tubo e à viscosidade, e diretamente proporcional à quarta potência do raio e à diferença de pressão entre as extremidades. Deste modo, numa artéria coronária com aterosclerose com diminuição de 50% do seu diâmetro, o fluxo que passa por ela é 94% inferior (desde que a pressão arterial e a viscosidade sanguínea estejam preservadas) [3].

$$F = \frac{(P_A - P_B) \times R^4 \times \pi}{8 \eta d} \quad (5)$$

### 2.1.1 Resistência Hidráulica

Para uma determinada conduta tubular e para um líquido de viscosidade conhecida, a equação de *Hagen-Poiseuille* mostra que existe relação constante entre fluxo e pressão [3], ou seja, que o fluxo é uma função linear (Equação 5), a esta relação chama-se resistência hidráulica ( $R_h$ ), ver Equação 6.

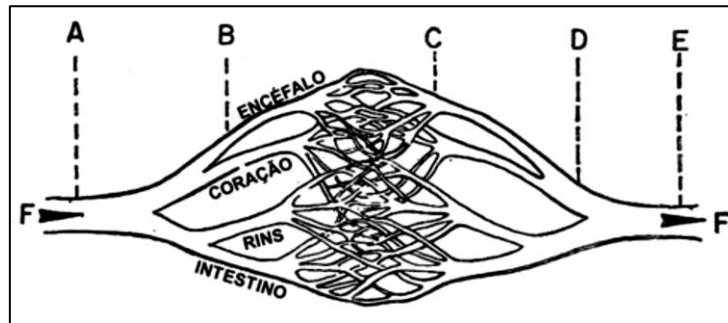
$$R_h = \frac{8 \times \eta \times d}{\pi \times R^4} = \frac{\Delta P}{F} = \frac{\Delta P}{v \times A} \rightarrow v = \frac{1}{R_h} \frac{\Delta P}{A} \quad (6)$$

Verifica-se que a resistência é diretamente proporcional ao comprimento do vaso e inversamente proporcional ao raio elevado à quarta potência. Portanto, exemplificando, se o diâmetro da artéria coronária for reduzido para metade, a sua resistência aumentará para 16 vezes mais.

O efeito das resistências de cada um dos condutores está relacionado com a posição em que são colocados os condutores hidráulicos, ou seja, estes podem estar em série ou em paralelo. Para condutores colocados em série o valor total de  $R_h$  resultará do somatório das resistências individuais de cada condutor; caso os condutores se encontrem paralelos uns aos outros, o inverso da  $R_h$  total é igual à soma dos inversos das resistências hidráulicas individuais.

Para o circuito em série, o fluxo é o mesmo para todas as resistências, já num circuito em paralelo, verifica-se que o gradiente de pressão ( $\Delta P$ ) é igual para todas as resistências.

A nível do sistema circulatório, existe uma complexa combinação de resistências hidráulicas em série e em paralelo. Os elementos que compõem uma sequência têm um comportamento de um circuito em série, estes são, por exemplo, as artérias, as arteríolas, os capilares, as vénulas e as veias; por sua vez, cada segmento de geometria similar formam um conjunto que se comporta como um circuito paralelo, com o objetivo de irrigar os diferentes órgãos [3], ver Figura 2.2.



**Figura 2.2** – Representação das propriedades das resistências hidráulicas do sistema circulatório, onde A,B,C,D e E representam os elementos de uma rede vascular (artéria, arteríola, capilar, vénula, veia, respetivamente). Adaptado de [3].

Os princípios hidrodinâmicos supracitados aplicam-se apenas aos fluidos newtonianos, ou seja, fluidos homogêneos de viscosidade baixa, que fluem laminarmente no interior de tubos cilíndricos de paredes rígidas. Dependendo das condições a que está sujeito o fluxo pode passar de laminar a turbulento. Apesar de na maioria das situações fisiológicas o fluxo de sangue dentro do sistema vascular ser laminar, o sangue não é um fluido newtoniano, e, portanto, os princípios de hidrodinâmica não lhe são aplicados.

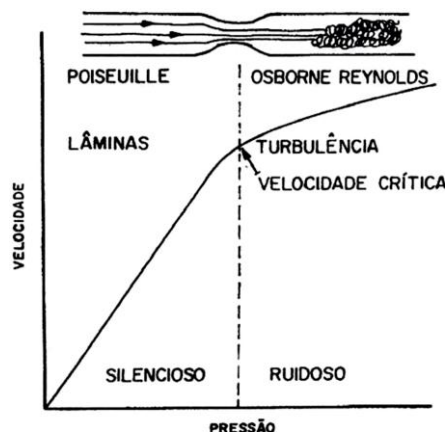
Este comportamento do sangue deve-se essencialmente a dois motivos:

**1º motivo:** Propriedades mecânicas dos vasos sanguíneos. As paredes dos vasos sanguíneos não são rígidas, mas elásticas e ativas, pois podem sofrer modificações na sua geometria. Estas modificações podem ser ativas quando provocadas pela musculatura lisa, ou passivas quando a modificação se deve à aplicação de forças externas.

**2º motivo:** Apesar de a olho nu o sangue parecer um fluido homogêneo, na realidade o sangue é uma solução resultante da mistura de vários elementos. Portanto as suas propriedades físicas dependem das propriedades de cada um dos elementos que o compõem. Porém as investigações têm apontado os GVs como principais responsáveis pelo comportamento do sangue.

### 2.1.2 Fluxo Turbulento

As considerações anteriores referem-se a situações de fluxo laminar, onde os anéis de fluxo distintos se movimentam deslizando uns sobre os outros sem se misturarem. No entanto, nos vasos de maior diâmetro, o fluxo deixa em geral de obedecer à equação de *Hagen-Poiseuille* (Equação 5). Pela análise de um gráfico da velocidade em função da pressão, Figura 2.3, verifica-se que existe um ponto em que a inclinação da reta diminui, indicando que ocorreu um aumento da resistência hidráulica (Equação 6). Neste ponto onde ocorre a brusca mudança de resistência hidráulica, o fluxo deixa de ser laminar e passa a turbulento, isto é, passa a haver mistura entre lâminas adjacentes de fluido [3].



**Figura 2.3** – Comportamento do fluxo com o aumento da velocidade e da pressão; após ser atingida uma velocidade crítica o fluxo passa de laminar a turbulento.

Na circulação sanguínea o fluxo torna-se turbulento quando ocorrem estenoses, ou seja, o estreitamento dos vasos sanguíneos, estas irregularidades nas paredes dos vasos

umentam a resistência vascular tornando o fluxo turbulento, este comportamento do fluxo propicia a formação de uma dilatação posterior, o que reduz de forma brusca a resistência vascular, tornando o fluxo ainda mais turbulento [4].

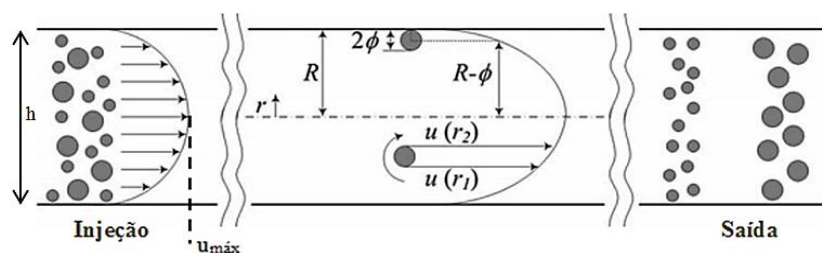
## 2.2 CROMATOGRAFIA HIDRODINÂMICA

Como já foi referido, o principal método utilizado neste projeto para estudar a velocidade de migração dos GVs em microcapilares foi a cromatografia hidrodinâmica.

A cromatografia no geral é um método de separação dos componentes de uma amostra pela sua distribuição entre um fluido corrente (fase móvel) e uma fase estacionária. A fase estacionária pode ser sólida ou um gel, pode ser empacotada numa coluna ou espalhada numa superfície (numa camada fina). A fase móvel pode ser um líquido ou um gás. A separação ocorre quando se faz passar a amostra por dentro da coluna, que depois de passar pela coluna é quantificada por um detetor. Os valores recolhidos pelo detetor compõem um gráfico o qual é designado por cromatograma [5].

A cromatografia hidrodinâmica (HDC – *hydrodynamic chromatography*) baseia-se no uso do fluxo laminar que ocorre nos espaços intersticiais existentes entre as partículas na coluna. Este processo depende da razão entre a dimensão das partículas que constituem o empacotamento (e conseqüentemente do tamanho dos poros), e da dimensão dos solutos dispersos na fase móvel [6].

Inicialmente a HDC foi desenvolvida para separação de polímeros sintéticos, como por exemplo, poliestirenos. A utilização deste método surgiu nos anos setenta segundo Venema [7] tendo sido testados capilares cilíndricos vazios. O perfil de velocidades do fluxo neste método é do tipo parabólico, ou seja, a velocidade é mínima junto à parede do capilar e máxima no centro, ver Figura 2.4. Uma vez que o centro de massa das moléculas mais pequenas se podem aproximar mais da parede do capilar, onde a velocidade é nula, é desenvolvida uma separação: as partículas maiores deslocam-se mais rapidamente pelo vaso capilar do que as menores. É neste fenómeno que se baseia a cromatografia hidrodinâmica (HDC), de acordo com Hoagland [8].



**Figura 2.4** – Princípio de separação da HDC, onde uma partícula com raio efetivo ( $\phi$ ) é excluída da parede num canal com diâmetro  $h$  no qual existe um perfil de velocidade parabólico  $u(r)$ . Adaptado de [13].

A cromatografia hidrodinâmica oferece um método para a separação de polímeros em solução ou de partículas em suspensão com base no seu tamanho. No leito de uma coluna empacotada, a separação ocorre nos canais formados entre as partículas, e a ordem de eluição é a mesma que nos capilares cilíndricos vazios: as partículas de maior dimensão saem primeiro da coluna que as partículas de menor dimensão.

A aplicação de HDC num capilar para classificação e separação de fibras com partículas de tamanho da ordem do micrómetro foi descrita por Pascale [9] numa experiência com um tubo de diâmetro de 15 mm e comprimento de 12 m (fluxo laminar) foram separadas suspensões de fibras de polpa de papel (celulose), e partículas micrométricas usadas na produção de papel como aditivo. As fibras de celulose usadas tinham um comprimento de 0,2 mm a 4 mm e as micropartículas ( $CaCO_3$ ) um tamanho à volta dos 3  $\mu m$ . Obtiveram-se os seguintes resultados de tempo médio de passagem no tubo para uma velocidade da fase móvel de 0,112 m/s: as fibras demoraram  $91 \pm 4s$  e os aditivos 107 s; o tempo médio de passagem do eluente foi também de 107 s. A diferença de tempo entre o pico dos aditivos e o das fibras encontra-se entre 12 a 16 s. As fibras como apresentavam maior dimensão saíram do tubo antes das partículas de aditivo.

A HDC tem sido aplicada, com sucesso, para medição e análise da distribuição do tamanho molecular de polímeros com peso molecular elevado solúveis em água [8]. A extensão do método tem sido testada através de experiências com xantano e poliácridamida hidrolisada. O xantano é um polissacarídeo bastante rígido, tendo a forma de bastonetes rígidos com comprimento de 1  $\mu m$ , e largura 2 nm. A separação ocorre durante a convecção do polímero dissolvido através do volume intersticial da coluna de cromatografia empacotada com esferas não porosas. Configurações em não-equilíbrio do polímero são espontaneamente geradas pelo fluxo complexo por entre as esferas. Essas

alterações de configuração afetam, fortemente, as medidas do tamanho molecular. Para maximizar a resolução, a tensão hidrodinâmica deve ser reduzida pelo emprego de caudais extremamente baixos. Supondo que os canais intersticiais numa coluna empacotada podem ser representados por um conjunto de tubos capilares, foi desenvolvido um modelo para a taxa de migração de macromoléculas que em seguida foi comparado com dados de eluição experimentais. Foram investigadas a influência do tamanho e do tipo de macromolécula, a eficácia do solvente e a velocidade da fase móvel na eluição na HDC. O comportamento da eluição em colunas empacotadas parece obedecer, basicamente, a teorias de migração simples desenvolvidas para tubos abertos. As posições relativas do pico na HDC dependem, parcialmente, da velocidade do eluente [10]. A gama dinâmica da separação depende do tamanho das partículas do leito de empacotamento da coluna. De acordo com dados de Gramain e Myard [11] é possível estimar uma razão entre o tamanho da molécula e o tamanho do poro, e uma razão entre o tamanho da molécula e o tamanho da partícula do empacotamento.

Hoagland e Prud'homme [8] usando um enchimento de partículas não porosas numa coluna demonstraram que a HDC de macromoléculas flexíveis e rígidas fornece medidas do tamanho molecular, que dependem fortemente do caudal. Esta dependência do caudal é explicada por modelos macromoleculares simples em termos de deformação e orientação num alongamento uniaxial fixo. Numa experiência de HDC, uma pequena quantidade de solução de polímero diluído foi injetada numa coluna empacotada com esferas de  $10\ \mu\text{m}$  a  $40\ \mu\text{m}$ . A coluna proporciona uma rede de poros com passagens por interstícios um pouco maiores do que as dimensões de cada molécula (tamanho de poro  $\sim 3,5\ \mu\text{m}$  a  $15\ \mu\text{m}$ , raio do polímero  $\sim 0,05\ \mu\text{m}$  a  $0,5\ \mu\text{m}$ ). A técnica de cromatografia hidrodinâmica acompanha as mudanças da conformação molecular pelas variações de caudal, podendo as moléculas sofrer extensão e orientação de acordo com a tensão hidrodinâmica. A indução do alongamento pelo fluxo num polímero flexível acontece quando a cadeia é sujeita a forças hidrodinâmicas superiores às forças de relaxamento da cadeia, que surgem do movimento browniano. Estas deformações manifestam-se, sobretudo, em situações de quedas de pressão elevadas, e para soluções de concentração baixa de polímeros bombeadas através de meios porosos.

No fluxo de soluções de polímeros não esféricos através de meios porosos não são encontradas quedas de pressão excessivamente elevadas. Contudo, as macromoléculas poliméricas rígidas com a forma de bastonete podem ser capazes de se orientar num

fluxo elevado, seguindo grosseiramente as linhas de fluxo [8]. Embora esta situação não provoque efeitos reológicos tão dramáticos como no caso de polímeros flexíveis, a orientação de polímeros com forma de bastonete durante o fluxo através de passagens estreitas da coluna pode também ter um efeito na eluição.

Estudos muito recentes têm tentado descrever melhor o movimento de polímeros ao longo de uma coluna em que se verifica um mecanismo de cromatografia hidrodinâmica. A maioria das teorias de HDC derivou do modelo chamado de retenção, usado para descrever a migração de polímeros em vasos capilares abertos, onde não se considera a existência de tortuosidade (formação de curvas), conferir Figura 2.4 [12].

Durante o fluxo de uma solução num capilar, cada molécula alcançará todas as regiões acessíveis do espaço capilar durante o seu transporte. No entanto, a região acessível a cada polímero depende do seu tamanho molecular [4].

Se as macromoléculas possuírem um diâmetro finito  $2\phi$  apenas se poderão movimentar (tendo como referência o centro de massa das moléculas) numa área de secção do tubo igual a  $\pi (R - \phi)^2$ , como está indicado na Figura 2.4, enquanto as moléculas infinitesimais podem cobrir toda a área  $\pi R^2$ . Devido à exclusão das macromoléculas de maior dimensão da região da parede, onde as velocidades são nulas, estas movem-se mais rapidamente que uma macromolécula com dimensões infinitesimais. O mesmo raciocínio se poderá fazer aplicado a duas macromoléculas com dimensões diferentes, fluindo mais lentamente as macromoléculas com dimensões menores.

Pelo descrito anteriormente, torna-se claro que a razão entre o raio efetivo ( $\phi$ ) das macromoléculas e o raio do capilar ( $R$ ), Equação 7, é o parâmetro determinante nas separações por HDC, já que as partículas com diferentes valores de  $\lambda$  migrarão com diferentes velocidades. Apesar disso, é importante observar que, quando as partículas são imersas num fluxo parabólico, o lado da partícula que está mais próxima do centro do capilar está localizada numa direção com maior velocidade ( $u(r_2)$ ) em relação ao lado mais próximo da parede do capilar ( $u(r_1)$ ) ver Figura 2.4.

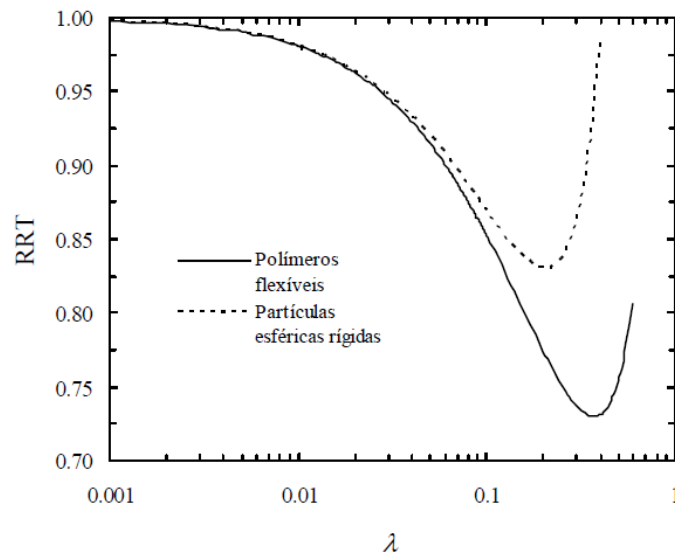
$$\lambda = \frac{\phi}{R} \quad (7)$$

Assim sendo, a partícula gira e este movimento afeta a velocidade de translação. Os diferentes efeitos acima mencionados estão incluídos no seguinte modelo [12, 13]:

$$RRT = \frac{1}{1+2\lambda-C\lambda^2} \quad (8)$$

Onde RRT (tempo de retenção relativo) é sempre inferior ou igual a 1. É definida como a razão entre o tempo médio de residência da partícula com raio efetivo ( $\emptyset$ ) e o tempo de residência médio da partícula com uma dimensão infinitesimal. Para capilares cilíndricos, a constante  $C$  varia entre 1 e 5, assumindo um valor de 2,7 para polímeros flexíveis e um valor de 4,89 para partículas sólidas esféricas [13].

A modelagem do transporte de polímeros flexíveis é muito mais complexa do que a de partículas rígidas, uma vez que o tamanho e a forma do polímero não são bem definidos. Por isso, é difícil prever a distância a que o centro de massa do polímero se pode aproximar da parede do capilar. Utilizando colunas de HDC com diâmetros internos em torno de  $1 \mu m$ , Tijssen *et al.* separaram espirais de poliestireno flexíveis e lineares com diferentes pesos moleculares. Stegeman *et al.* utilizaram colunas preenchidas com esferas de vidro não porosas com diâmetro de  $1,5 \mu m$  e separaram polímeros flexíveis com pesos moleculares diferentes [6, 7]. Esferas de vidro não porosas com diâmetro de  $1 \mu m$  foram utilizadas por Venema *et al.* a fim de separar diferentes pesos moleculares de poliestirenos e poli (metil metacrilato). Em todos esses trabalhos os autores descobriram que o raio efetivo ( $\emptyset$ ) é bem definido pela expressão  $\frac{\sqrt{\pi}}{2R_g}$ , onde  $R_g$  é o raio de giração do polímero [13,14]. Neste trabalho assumiu-se que os canais intersticiais podem ser representados por um feixe de capilares cilíndricos com diâmetro médio  $d_{poros}$ , dado pela expressão  $\frac{2}{3} d_{part} \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon}$ , onde  $d_{part}$  é o diâmetro das partículas e  $\varepsilon$  a porosidade do empacotamento [13] [14]. Para empacotamentos constituídos por partículas esféricas a porosidade ( $\varepsilon$ ) é aproximadamente 0,4 [14].



**Figura 2.5** – Variação de RRT em função de  $\lambda$  [25].

Na Figura 2.5 está representado o comportamento do RRT para diferentes valores de  $\lambda$ , considerando  $C = 2,7$  (polímeros flexíveis) e  $C = 4,89$  (partículas esféricas rígidas). Presumivelmente o valor de  $C$  para os GVs estará entre o valor de  $C$  dos dois casos referidos, uma vez que, os GVs não são rígidos mas serão menos flexíveis que um polímero [13].



# CAPÍTULO 3

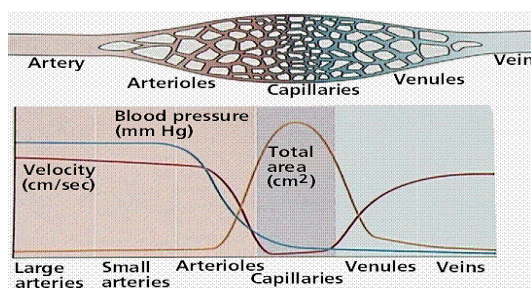
## MICROCIRCULAÇÃO

### 3.1 SISTEMA CIRCULATORIO

O sistema circulatório abrange o sistema vascular sanguíneo e o sistema vascular linfático. O sistema vascular sanguíneo é constituído pelos seguintes elementos: o coração, as artérias, os vasos capilares e as veias. O sistema vascular linfático é constituído pelos vasos capilares linfáticos, estes são tubos de diâmetro continuamente crescente. Em comum, os vasos sanguíneos e os vasos linfáticos têm a superfície interna revestida por uma única camada de epitélio.

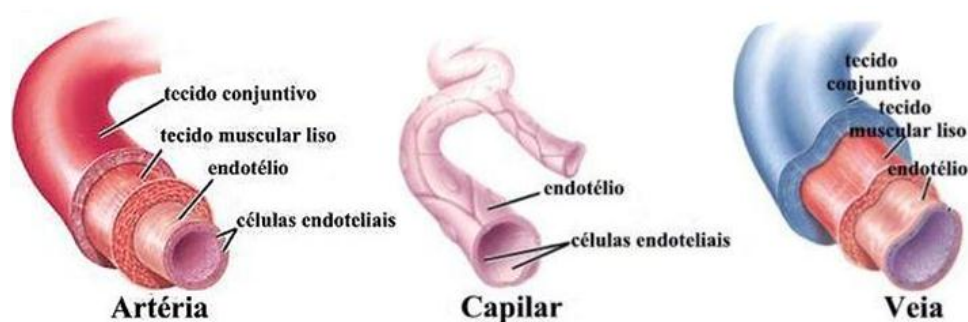
Geralmente o sistema circulatório é dividido em vasos de macrocirculação, vasos com mais de 0,1 mm em diâmetro (grandes arteríolas, artérias musculares e elásticas e veias musculares), e vasos de microcirculação, vasos visíveis somente a microscópio (arteríolas, capilares e vénulas pós-capilares).

O diâmetro total de todo o conjunto de capilares é cerca de 800 vezes maior que o diâmetro da aorta. Isto faz com que a velocidade média do sangue na aorta seja de 320 mm/s, enquanto nos capilares é aproximadamente 0,3 mm/s, ver Figura 3.1. O facto da velocidade do sangue ser lenta nestes vasos é uma vantagem para a sua principal função, que é o intercâmbio de nutrientes e outros elementos entre o sangue e os tecidos vizinhos [15].



**Figura 3.1** – Variação das propriedades do sangue ao longo de diferentes zonas do sistema circulatório.

Todos os vasos sanguíneos acima de um certo diâmetro têm várias características estruturais em comum e apresentam um plano geral de construção. Porém, o mesmo tipo de vaso apresenta variações estruturais notáveis ao longo do seu percurso. Assim, a distinção entre os diferentes tipos de vaso nem sempre é muito clara, uma vez que a transição de um tipo de vaso para outro se faz de modo gradual. De uma forma geral os vasos sanguíneos são compostos por três camadas: o tecido conjuntivo, o tecido muscular liso e o endotélio; como estão representadas na Figura 3.2.



**Figura 3.2** – Vasos sanguíneos e a sua constituição geral. Adaptado de: [22].

Na Tabela 3.1 são apresentadas algumas das características dos vasos que compõem o sistema circulatório.

**Tabela 3.1-** Características dos vasos do sistema circulatório [16].

Vaso	Raio [cm]	N.º	Espessura da parede [cm]	N.º de Reynolds [médio]
Aorta	1,25	1	0,2	3400
Artérias	0,2	159	0,1	500
Arteriolas	$1,5 \times 10^{-3}$	$5,7 \times 10^7$	$2 \times 10^{-3}$	0,7
Capilares	$3 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{10}$	$1 \times 10^{-4}$	0,002
Vénulas	$1 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^9$	$2 \times 10^{-4}$	0,01
Veias	0,25	200	0,05	140
Veia Cava	1,5	1	0,15	3300

### **3.1.1 Os capilares**

Os vasos capilares sofrem variações estruturais que os adaptam para exercer níveis diferentes de troca metabólica. O seu diâmetro oscila de 7 a 9  $\mu m$ , e o seu comprimento geralmente não ultrapassa os 50  $\mu m$ . As células internas que formam o endotélio repousam numa lâmina basal, produzida pelas próprias células endoteliais. Os capilares sanguíneos podem ser agrupados em 4 grupos, que dependem da espessura do endotélio e da lâmina basal [15].

### **3.1.2 As artérias**

De acordo com o seu diâmetro os vasos sanguíneos arteriais são classificados em arteríolas, artérias de diâmetro medio ou artérias musculares e artérias de grande diâmetro ou elásticas.

- Arteríolas – possuem um diâmetro inferior a 0,5  $mm$  e o lúmen relativamente estreito. A camada subendotelial é muito delgada. Nas arteríolas muito pequenas a lâmina elástica esta ausente.
- Artérias médias (musculares) – têm uma camada formada apenas por células musculares lisas, o endotélio é mais espesso do que nas arteríolas.
- Artérias grandes (elásticas) – estas artérias contribuem em grande parte para estabilizar o fluxo sanguíneo. As artérias elásticas incluem a aorta e as suas principais ramificações. Acima do endotélio estes vasos acumulam elastina [15].

### **3.1.3 As Veias**

Na sua maioria, o diâmetro das veias varia entre 1 a 9  $mm$ . Nestes vasos, o tecido conjuntivo é mais espesso que as restantes camadas, para além disso é rico em colagénio, fibras reticulares, e fibras elásticas. A principal diferença física entre as veias e as artérias é que as primeiras possuem válvulas, e as ultimas não. As válvulas consistem em dobras do endotélio interno, que adquirem a forma de meia-lua que se projetam para o centro do tubo. As válvulas encontram-se maioritariamente nas veias dos membros inferiores, que juntamente com a contração do tecido muscular que circunda as veias, direcionam o sangue de volta ao coração.

- Vénulas – possuem um diâmetro de 0,2 a 1 *mm*, a sua parede é apenas constituída por uma camada fina de células endoteliais em volta das quais se situam algumas células musculares contráteis [15].

## 3.2 COMPOSIÇÃO DO SANGUE

O sangue é formado pelos glóbulos sanguíneos e pelo plasma, parte líquida, na qual os primeiros estão suspensos. Os glóbulos sanguíneos são os eritrócitos ou hemácias, as plaquetas e os leucócitos ou glóbulos brancos.

### 3.2.1 Composição do plasma

O plasma é uma solução aquosa contendo componentes de pequeno e elevado peso molecular, que correspondem a 10% do seu volume. Esses componentes podem ser proteínas plasmáticas, sais inorgânicos, aminoácidos, vitaminas, hormonas e glicose.

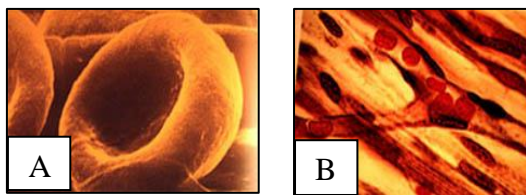
As principais proteínas do plasma são as albuminas, alfa, beta e gamaglobulinas, as lipoproteínas e ainda as proteínas que participam na coagulação do sangue, como a protrombina e fibrinogénio. Portanto, o sistema de coagulação para além das plaquetas conta com pelo menos mais 16 proteínas plasmáticas e algumas enzimas envolvidas na formação do coágulo.

### 3.2.2 Os eritrócitos

Os eritrócitos, também designados por hemácias, ou glóbulos vermelhos (GVs) são células anucleadas, e contêm uma grande quantidade de hemoglobina, uma proteína responsável pelo transporte de  $O_2$ . Geralmente estas células permanecem dentro dos vasos sanguíneos. Os eritrócitos humanos têm a forma de um disco bicôncavo (ver Figura 3.3 - A). Quando suspenso em soluções isotónicas medem em média 7,5  $\mu m$  de diâmetro, com 2,6  $\mu m$  de espessura nas bordas e 0,8  $\mu m$  no centro.

O formato especial destas células proporciona uma grande superfície para troca de gases em relação ao volume que contém. Outra característica interessante destas células é a sua flexibilidade, uma vez que conseguem passar facilmente em bifurcações muito

finas, onde sofrem deformações temporárias sem se romperem (ver Figura 3.3 - B) [15].

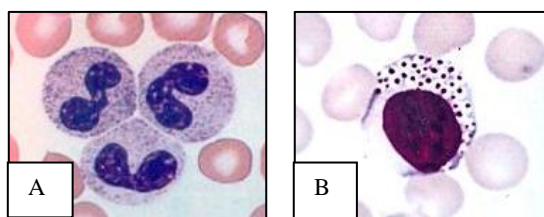


**Figura 3.3** – A: um eritrócito maduro, onde se evidencia a sua forma bicôncava; B: deformação do eritrócito perante uma bifurcação. Adaptado de: [23].

### 3.2.3 Os leucócitos

Os leucócitos ou glóbulos brancos são incolores, de forma esférica quando em suspensão no sangue e têm como função proteger o organismo contra infecções. Diversos tipos de leucócitos utilizam o sangue como meio de transporte para alcançar o destino desejado, os tecidos. São classificados em dois grupos, os granulócitos e os agranulócitos. Os diferentes leucócitos apresentam diâmetros distintos que podem variar de 7 a  $18\mu\text{m}$  [17].

Os granulócitos têm núcleo de forma irregular e mostram no citoplasma grânulos específicos que, ao microscópio eletrônico, aparecem rodeados de membrana. É possível distinguir três tipos de granulócitos diferentes através de coloração, são eles: neutrófilos, eosinófilos e basófilos.



**Figura 3.4** – Imagem A representa três granulócitos do tipo neutrófilo; na imagem B está representado um linfócito com grânulos [23].

O núcleo dos agranulócitos tem forma mais regular e o citoplasma não possui granações específicas. Há dois tipos de agranulócitos: os linfócitos e os monócitos [15].

### 3.2.4 As plaquetas

As plaquetas são corpúsculos anucleados, com a forma de disco, medindo cerca de 2 a  $4\mu\text{m}$  de diâmetros, derivados de células gigantes formadas na medula óssea. As pla-

quetas promovem a coagulação do sangue e auxiliam na reparação da parede dos vasos sanguíneos, evitando a perda de sangue [15].



**Figura 3.5** – Plaquetas agregadas a uma parede de um vaso sanguíneo [23].

**Tabela 3. 2** - Número e percentagem dos glóbulos do sangue [15].

<b>Glóbulos</b>	<b>Quantidade aproximada por microlitro</b>	<b>Percentagem aproximada</b>
Eritrócitos	Na mulher: 4,0 a 5,4 milhões No homem: 4,6 a 6,0 milhões	
Leucócitos	4 500 – 11 500	
Neutrófilos	2 300 – 8 100	50 – 70 %
Eosinófilos	0 - 400	1 – 3 %
Basófilos	0 -100	0 – 2 %
Linfócitos	800 – 4 800	18 – 42 %
Monócitos	450 – 1 300	2 – 11%
Plaquetas	1500 – 450 000	

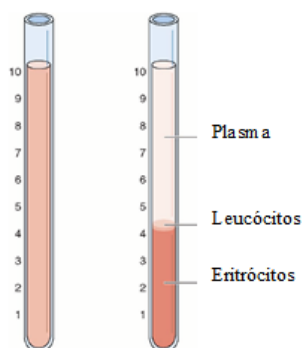
Na Tabela 3.2 é possível verificar que os eritrócitos (GVs) são os glóbulos sanguíneos mais abundantes no sangue.

### **3.3 HEMATÓCRITO**

O sangue colhido por punção venosa, tratado por anticoagulantes (heparina, por exemplo) e em seguida centrifugado, separa-se em várias camadas que refletem a sua heterogeneidade. Ao resultado obtido por sedimentação, realizado em tubos de vidro de dimensões padronizadas chama-se hematócrito (Hct).

No Hct, o plasma corresponde ao sobrenadante translúcido e amarelado. Os glóbulos sedimentam em duas camadas facilmente distinguíveis. A camada mais inferior (35 a 50% do volume total do sangue) tem cor vermelha e é formada pelos GVs. A camada imediatamente a cima (1% do volume de sangue) tem cor acinzentada e contém os leucócitos. Sobre esta camada repousa uma fina camada de leucócitos que não é visível a olho nu, consultar a Figura 3.6.

O Hct permite estimar o volume de sangue ocupado pelos eritrócitos em relação ao sangue total. Os valores normais são de 35 – 49% para a mulher e 40 – 54% para o homem [15].



**Figura 3.6** – Esquema representativo do hematócrito. O tubo da esquerda antes da centrifugação, e o tubo da direita após. Adaptado de: [15].

### 3.4 VISCOSIDADE DO SANGUE

A viscosidade do sangue depende dos seguintes fatores:

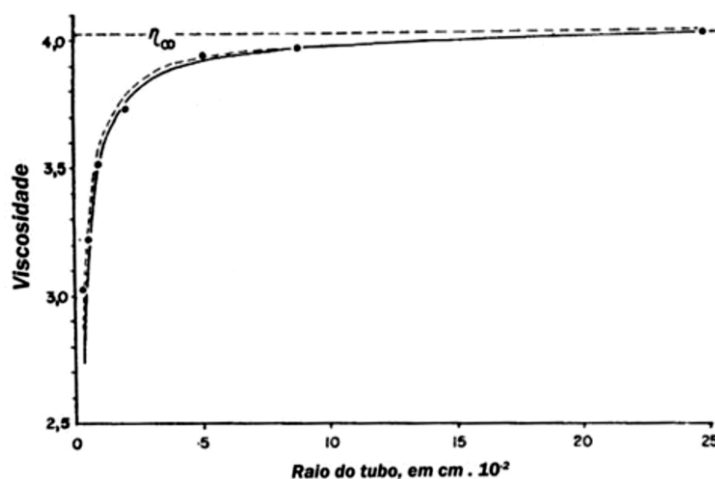
a) *Influência do hematócrito*: A viscosidade do sangue cresce exponencialmente com o aumento do hematócrito. Para o hematócrito normal, a viscosidade do sangue é aproximadamente quatro vezes maior que a da água;

b) *Influência da temperatura*: A viscosidade de qualquer fluido varia inversamente com a temperatura. A viscosidade do sangue cresce cerca de 2,5 vezes quando a

temperatura cai de 37°C a 0°C. Esta variação é paralela à da viscosidade da água, de modo que a viscosidade relativa do sangue é praticamente constante.

c) *Viscosidade do sangue em tubos muito delgados*: O efeito *Fahraeus-Lindqvist* mostra que quanto menor é o diâmetro do vaso, menor vai ser a viscosidade do líquido contido nele, como se pode verificar na Figura 3.7. Esse efeito pode ser explicado da seguinte maneira: quando deduzimos a equação de *Hagen- Poiseuille*, supõe-se o somatório de um número infinito de parcelas infinitesimais, relativas aos anéis de fluxo num líquido newtoniano. Quando, porém o sangue flui através de vasos onde a dimensão da hemácia (7  $\mu\text{m}$ ) aproxima-se do próprio diâmetro do vaso. Não é possível determinar a equação da velocidade, não sendo mais aplicável a equação de *Hagen- Poiseuille*;

d) *Axialização dos GVs*: Quando o sangue se movimenta no interior de um condutor tubular, os GVs tendem a acumular-se no eixo do tubo, deixando uma zona marginal de plasma praticamente livre de células – camada livre de plasma. Portanto é mais fácil perceber que as ramificações vasculares apresentam hematócritos muito baixos. Um exemplo disso é o sangue que se colhe por punção cutânea superficial tem Hct cerca de 25% mais baixo que o de sangue colhido numa veia no mesmo indivíduo [3].



**Figura 3.7** – Representação do efeito Fahraeus-Lindqvist. Adaptado de [3].

A Figura 3.7 representa o comportamento da viscosidade do sangue em função do raio do tubo, para raios inferiores a 1mm. Verificando-se que a viscosidade diminui com o decréscimo do raio do tubo.

# CAPÍTULO 4

## MATERIAIS E MÉTODOS

Depois de definidos os objetivos e os fundamentos da investigação, é importante descrever os materiais e os métodos utilizados ao longo de cada fase do trabalho.

### 4.1 CROMATOGRAFIA

#### 4.1.1 Preparação do sistema Cromatográfico

O sistema cromatográfico hidrodinâmico utilizado ao longo deste trabalho é da marca *JASCO*, o sistema utilizado é composto pela bomba modelo *PU-2080 plus* e pelo detector modelo *RI – 2031*.

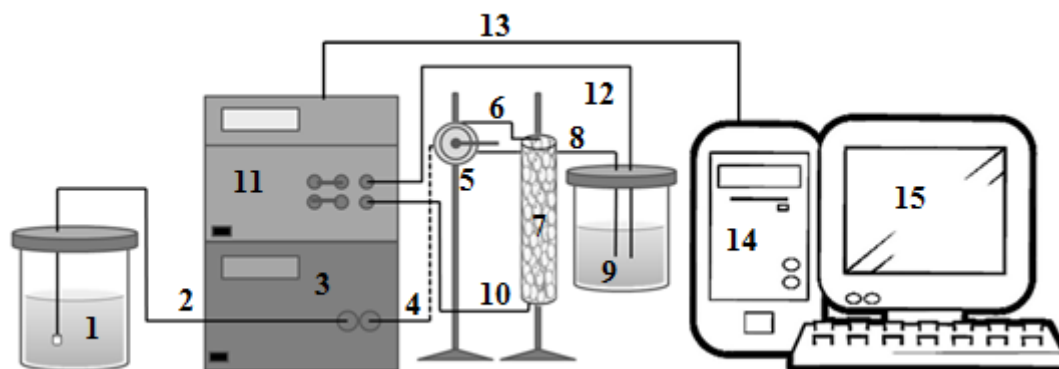


Figura 4.1 – Aparato do sistema cromatográfico.

Segundo o aparato do sistema cromatográfico que pode ser observado na Figura 4.1, o funcionamento deste sistema pode ser descrito pelas seguintes etapas: o frasco da fase móvel (1) está ligado (2) à bomba (3), que vai bombear o solvente, soro fisiológico, para todo o sistema (4); depois de se injetar a amostra no *loop* (5) tem de se rodar a alavanca da posição *load* para *inject*, este procedimento vai lançar a amostra em direção à coluna de eluição (7). Como o equipamento tem um loop de 20  $\mu\text{L}$  a quantidade injetada

em excesso sai pelo tubo de saída (8), e vai para o frasco de resíduos (9). A fase móvel juntamente com a amostra vai percorrer o interior da coluna (7), entrando em contacto com a fase estacionária (esferas de vidro), devido a uma maior ou menor afinidade dos solutos com a fase estacionária, tem como consequência um maior ou menor tempo de retenção na coluna. Esta diferença de velocidades vai permitir ao detetor (11) captar por diferentes ordens de chegada os solutos, medindo o índice de refração, enviando a informação para o processador de dados (13), que converte a informação para o computador (14), com o *software* de aquisição de dados. O interface (15) com o utilizador é feita através do programa *Peak Simple*, este programa lê os dados adquiridos ao longo do tempo e constrói um gráfico designado por cromatograma, apresentando em forma de picos a quantidade de substância por unidade de área. Após a leitura do índice de refração pelo detetor a solução percorre pelo tubo (12) até ao frasco de resíduos (9).

Para o bom funcionamento do HDC é importante não deixar o eluente em experimentação dentro do sistema durante um longo período de tempo inutilizável. Salvo se o eluente seja água destilada, caso contrário deve ter-se o cuidado de trocar o eluente para água destilada. No caso deste trabalho experimental, o eluente utilizado é soro fisiológico que contém sódio, neste caso deve ter-se o cuidado de o retirar do sistema após utilização, dado que poderá afetar a célula de referência. Para além disso, deve ter-se ainda o cuidado de degasificar sempre o eluente, para evitar quaisquer bolhas para o interior do sistema e assim permitir cromatogramas sem ruído.

Antes de iniciar qualquer teste, ou quando se troca o solvente da fase móvel deve sempre ter-se o cuidado de realizar a purga do sistema, ou seja, lavar a célula de referência com a fase móvel. Este procedimento garante que o detetor vá apenas detetar o soluto da amostra que se vai misturar na fase móvel.

#### **4.1.2 Preparação da fase móvel**

A fase móvel utilizada neste projeto foi o soro fisiológico, ou seja, cloreto de sódio (*NaCl*) a 0.9% em água destilada. Que se levou posteriormente à bomba de vácuo, até retirar a maior parte das bolhas de ar possíveis. Esta solução foi preparada várias vezes, ao longo dos empacotamentos, podendo haver pequenas diferenças na concentração.

#### **4.1.3 Preparação de uma fase móvel com PEG**

Em primeiro lugar testou-se o comportamento dos GVs em contacto com diferentes concentrações de polietilenoglicol (PEG), para se perceber qual a massa molecular que melhor interagiu com os GVs. Para isso, colocaram-se várias provetas com concentrações de PEG em soro, às quais se adicionou uma pequena quantidade de amostra de GVs, onde se observou a sedimentação durante 24 h. Para além disso, fizeram-se esfregaços para verificar o comportamento das células quando numa solução de PEG.

Para o empacotamento de esferas de  $337,5 \mu m$ , testou-se uma fase móvel com adição de PEG 10, a uma concentração de 10% em soro fisiológico, de modo a garantir as pressões osmóticas.

#### **4.1.4 Preparação de amostras de GVs em soro com 1% Hct**

Recolheu-se uma amostra de sangue de ovelha para um tubo com heparina.

Separou-se uma amostra de sangue para dois tubos de 15 mL, obtendo-se duas quantidades de aproximadamente 3 mL de sangue em cada tubo. Para separar as GV dos restantes componentes do sangue, procedeu-se a duas centrifugações relativas a duas lavagens do sangue pela adição de soro fisiológico (solução de 0.9% de NaCl) previamente produzido.

Depois da primeira centrifugação a uma velocidade de 2000 rpm durante 15 minutos, observou-se a olho nu uma separação dos componentes, nomeadamente, os GVs depositaram-se no fundo do tubo, enquanto, que acima destas ficou o plasma.

Para a segunda centrifugação foi necessário lavar novamente a amostra, ou seja, retirou-se o plasma (resíduos) e adicionou-se soro fisiológico na proporção de 1:1, para cada um dos tubos e fez-se uma nova centrifugação para as mesmas condições.

Após as duas lavagens prepararam-se então duas amostras finais para um Hct de 1%, ou seja, recolheu-se 100  $\mu L$  de GVs, para 10 mL de soro fisiológico.

Este procedimento foi utilizado para todas as amostras utilizadas nos testes de HDC.

## 4.2 EMPACOTAMENTO DE COLUNAS DE HPLC

A técnica utilizada para o empacotamento das diferentes colunas utilizadas ao longo dos testes realizados foi a mesma, variando apenas as características das colunas e o tamanho das esferas.

Depois de limpar a coluna, colocava-se um pouco de água no fundo da coluna e aos poucos ia-se adicionando as partículas de vidro de volume apropriado. Deve bater-se com a coluna num pano húmido na vertical de forma a remover possíveis bolhas de ar contidas no seu interior que entretanto se possam ter formado. Neste trabalho optou-se por trabalhar com partículas não porosas, esferas de vidro, utilizadas para preenchimento do leito da coluna. Foram produzidos empacotamentos para esferas de diâmetro médio na ordem de  $115 \mu m$ ,  $150 \mu m$ ,  $337,5 \mu m$ ,  $875 \mu m$  e por fim de  $2000 \mu m$ . Deve ter-se em conta que as dimensões das colunas de eluição utilizadas para fazer os empacotamentos também variaram, consultar a Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Dimensões das colunas de eluição.

Diâmetro médio das esferas [ $\mu m$ ]	Dimensões da coluna	
	Comprimento [cm]	Diâmetro interno [mm]
115	20	4,6
150	25	4,6
3375	20	4,6
8750	25	4,6
2000	46,9	25

## 4.3 MICROCANAIS

### 4.3.1 Produção de microcanais

O principal objetivo da construção de um microcanal foi a análise do escoamento dos GVs em geometrias análogas ao empacotamento das colunas utilizadas nos experimentos de HDC.

Desta forma foi possível observar a microscópio o comportamento das células durante o fluxo. A produção de um microcanal pode ser dividida em três etapas, são elas:

**1ª etapa:** desenvolver as geometrias com as dimensões e formas desejadas em CAD;

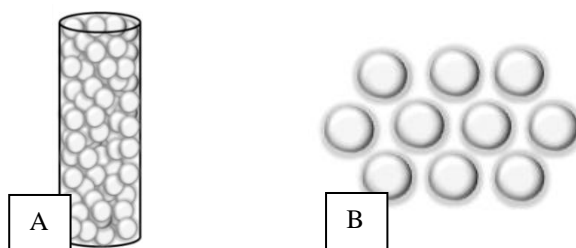
**2ª etapa:** obter as máscaras das geometrias que vão servir de molde, neste caso, foram utilizados dois métodos, impressão por corte em papel autocolante, e por impressão de circuito em cobre (método fotográfico);

**3ª etapa:** construção do dispositivo propriamente dito.

Descrevem-se em seguida cada uma destas etapas:

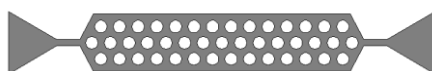
#### i) **Desenvolvimento das geometrias**

Consistiu na planificação do formato e dimensão do microcanal. No caso deste trabalho experimental, a geometria do dispositivo deveria aproximar-se à forma do empacotamento de esferas no interior da coluna, e também às dimensões, como está representado na Figura 4.2.



**Figura 4.2** – A representa o empacotamento de esferas de vidro num capilar cilíndrico; B representa um esboço da disposição das esferas.

Optou-se por fazer uma geometria com círculos de 1000, 800, 600 e 300  $\mu\text{m}$ , expostas de forma equidistante, para cada diâmetro usaram-se intervalos com tamanho correspondente a metade do diâmetro dos círculos. A Figura 4.3 representa o aspeto geral das máscaras produzidas.

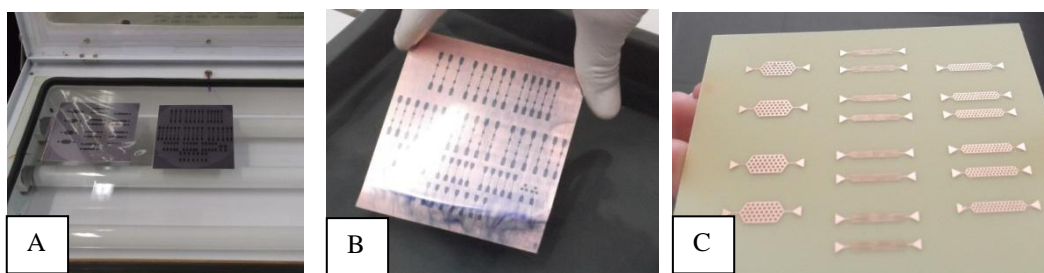


**Figura 4.3** – Máscara de uma das geometrias desenvolvidas para um microcanal.

## ii) Impressão das máscaras

O primeiro método utilizado para imprimir as máscaras foi a impressora de corte, ou seja, a impressora corta o formato da geometria em papel autocolante. Para valores abaixo dos  $800 \mu m$ , a lâmina não tinha capacidade para cortar os círculos, Portanto, testou-se a máscara de  $1000 \mu m$ . Depois de cortada a máscara, retirou-se o molde e colocou-se numa caixa de Petri, sobre a qual foi depositada o PDMS previamente preparado.

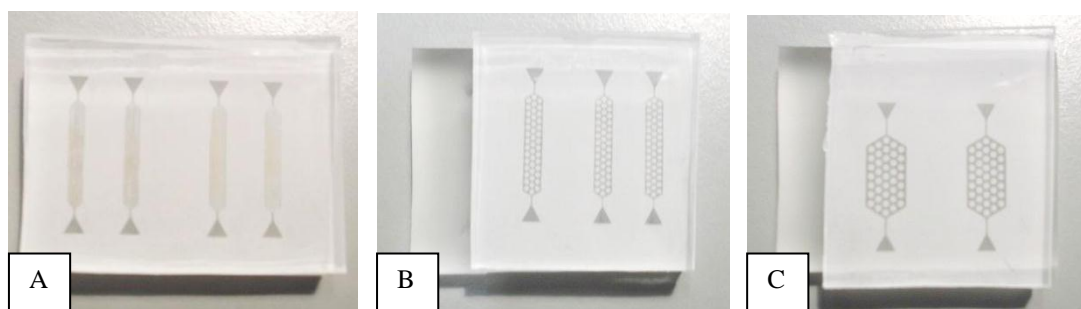
De forma a obter as máscaras dos diâmetros mais pequenos, recorreu-se ao método da litografia. Para realização desta técnica recorreu-se aos serviços de uma empresa externa ao instituto. Depois de obtidas as máscaras, procedeu-se à sua impressão pelo método fotográfico, permitindo a obtenção dos moldes para os microcanais. O método fotográfico é caracterizado pela utilização de uma placa de cobre sensibilizada, que é cortada com o tamanho adequado à máscara do microcanal, para, posteriormente, ser sujeita a radiação UV, durante aproximadamente 200 s (Figura 4.4 - A). Na fase da revelação colocou-se um tabuleiro com 2 L de água e 12 g de hidróxido de sódio, a temperatura deve estar aproximadamente a  $38^{\circ}C$ , colocou-se a placa de cobre dentro da solução, e fazendo alguns movimentos com o tabuleiro o hidróxido de sódio começa por reagir com a placa removendo os resíduos, e revela as geometrias da máscara (Figura 4.4 - B), na placa ficam apenas os microcanais escurecidos. Antes da fase seguinte a placa deve ser limpa com água. Por fim, a fase da corrosão é preparada uma solução de 50 mL de ácido clorídrico e 25 mL de hidrogénio de peróxido, com água destilada até fazer 200 mL, onde é novamente mergulhada a placa, agita-se a solução em contacto com a placa, verificando-se que o resíduo escuro vai desaparecendo da placa e a solução vai ficando verde. No final, obtem-se apenas as geometrias na placa (Figura 4.4 - C). Para prevenir qualquer resíduo ácido procedeu-se a uma última lavagem da placa, que depois disso fica pronta para servir de molde aos microcanais.



**Figura 4.4** – Obtenção de geometrias para os microcanais através do método fotográfico.

### iii) Montagem do microcanal

Preparar a quantidade adequada de PDMS para cobrir a máscara, na proporção 10:1, deixar repousar o molde numa estufa a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos; depois de feito o molde, preparar a base do microcanal, utiliza-se uma lâmina de vidro na qual é depositada uma pequena quantidade de PDMS na proporção de 20:1 (a suficiente para cobrir a lâmina), onde vai centrifugar em vácuo, de forma a espalhar bem o PDMS, obtendo-se assim uma camada fina e homogênea, depois de ir ao forno durante 20 minutos a  $80^{\circ}\text{C}$  está pronta para colar o molde, que fica na estufa à temperatura referida, durante 24 h.



**Figura 4.5** – Microcanais obtidos: A – Círculos com diâmetro  $300\ \mu\text{m}$ ; B - Círculos com diâmetro  $600\ \mu\text{m}$ ; C - Círculos com diâmetro  $800\ \mu\text{m}$ .

### 4.3.2 Preparação de amostras de GVs para o escoamento em microcanais

A preparação de amostras com dextrano 40 (Dx 40) foi feita de forma análoga à preparação de amostras de Hct de 1% em soro fisiológico, mas usou-se Dx 40 em vez de soro fisiológico, e maior concentração de GVs uma vez que o hct é maior (5%).

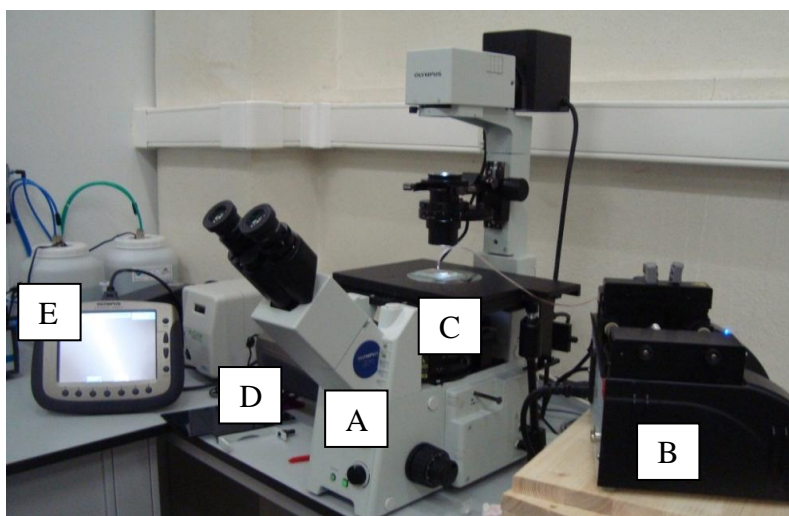
O Dextrano é um polissacarídeo sintético que pode ser obtido a partir da fermentação de sacarose, devido ao seu peso e à sua estrutura molecular, a sua principal função é a expansão do volume plasmático. Para além disso, esta substância mantém um ambiente favorável de pressão osmótica para as células.

#### 4.3.3 Análise do escoamento de GVs no microcanal produzido

Depois de concluída a conceção do dispositivo, procedeu-se ao estudo do escoamento dos GVs a 5% Hct em Dx 40. Nesta fase do estudo utilizou-se uma Câmara de Alta Velocidade para captar vídeos/imagens, o microscópio invertido modelo IX 71, e a bomba de seringa. Foram testados os mesmos caudais para os diferentes microcanais.

Em sequência de testar o microcanal, inicialmente optou-se por introduzir um caudal muito reduzido, na ordem de  $1 \mu L/min$  permitindo assim, que o microcanal fosse preenchido pelos GVs lentamente, e desta forma evitar a formação de bolhas. Os vídeos capturados correspondem aos caudais de 5, 10 e  $20 \mu L/min$ . Analisando as mesmas zonas do microcanal.

Na Figura 4.6 está representado o aparato utilizado para a observação e captação de vídeos do escoamento dos GVs em microcanais. Como já foi referido foi utilizado um microscópio invertido (A) no qual foi colocado o microcanal para observação (C), a bomba de seringa (B) bombeia a amostras de GVs para o interior do microcanal com um fluxo pré-determinado. A câmara de alta velocidade (D) filma o escoamento dos GVs que é acompanhado e gravado usando o ecrã (E) como interface.



**Figura 4.6** – Aparato para observação do escoamento dos GVs no interior do microcanal.

# CAPÍTULO 5

## APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos mais relevantes e as suas respectivas análises/discussões.

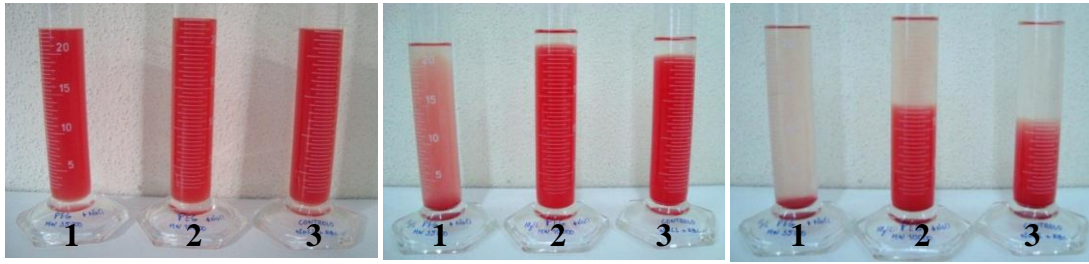
### 5.1 TESTES COM PEG ENQUANTO EXPANSOR DO VOLUME SANGUÍNEO

Como já foram testados testes de cromatografia dos GVs em que a fase móvel foi soro fisiológico [13], idealizou-se a utilização de uma substância para a fase móvel que alterasse a sua densidade e conseqüentemente o comportamento do escoamento dos GVs.

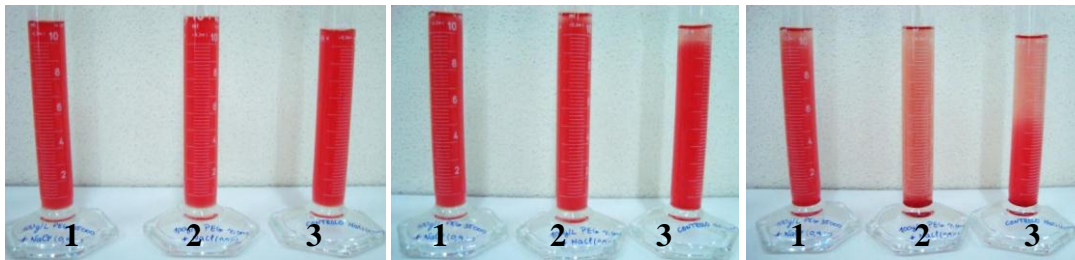
A substância utilizada foi o Polietilenoglicol (PEG), quer pelas suas características biocompatíveis, quer pelo seu baixo custo. Mas principalmente pelo aumento de viscosidade que possa conferir à fase móvel.

Os pesos moleculares testados foram o PEG 10 000 e o 35 000 *g/mol*. Antes de se testar o PEG como fase móvel no sistema cromatográfico, prepararam-se algumas soluções de GVs em soro fisiológico com concentrações diferentes de PEG de forma a observar a sedimentação dos GVs.

Primeiro prepararam-se duas soluções de GVs e soro fisiológico em dois tubos separados aos quais se adicionaram PEG 10 000 e 35 000 respetivamente, a uma concentração de 10 *g/L*, ver Figura 5.1. Estes dois tubos foram acompanhados por um terceiro, apenas com a solução dos GVs em soro (tubo padrão). O mesmo procedimento foi efetuado para uma concentração de 100 *g/L* ver Figura 5.2.



**Figura 5.1** – Da esquerda para a direita, soluções com 10 g/L de PEG logo após preparo, na imagem do meio com 6 horas depois, e 24 horas depois respectivamente. Os tubos: 1 - Soluções de PEG 35 000 g/mol; 2 - PEG 10 000 g/mol; 3 – solução padrão (ausência de PEG).



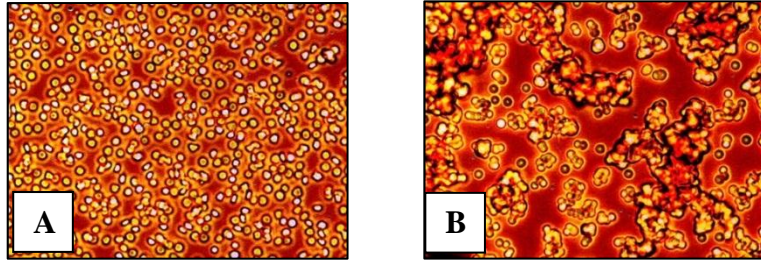
**Figura 5.2** – Da esquerda para a direita, soluções com 100 g/L logo após preparo, na imagem do meio com 6 horas depois, e 24 horas depois respectivamente. Os tubos: 1 - Soluções de PEG 35 000 g/mol; 2 - PEG 10 000 g/mol e 3 – solução padrão (ausência de PEG).

A sedimentação dos GVs na presença de PEG ocorre com maior intensidade para a concentração de 10 g/L, tal como indica a Figura 5.1. Porém, é de notar que no primeiro caso o sobrenadante era mais límpido do que no segundo caso o que é evidenciado na Figura 5.3. O segundo caso pode ser justificado pela saturação da solução, dado que, a concentração era 10x superior à primeira situação.

A sujidade verificada no segundo caso (concentração de 100 g/L), poderá ser justificada pela lise celular, o que se confirmou posteriormente a microscópio pela observação de esfregaços, ver Figura 5.4.



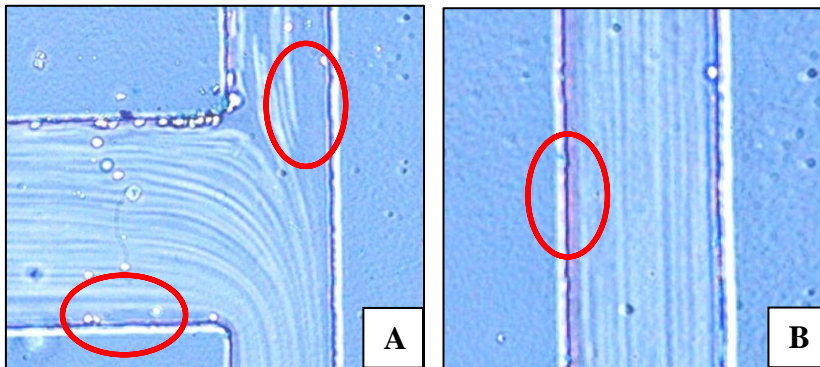
**Figura 5.3** – A: sobrenadante límpido resultante da solução com PEG 10 com concentração de 10 g/L; B: sobrenadante com sujidade resultante do PEG 10 com concentração de 100 g/L.



**Figura 5.4** – A: esfregaço relativo ao PEG 10 a 10g/L; B: esfregaço relativo ao PEG 10 a 100 g/L.

Depois de testarmos a reação dos GVs nas várias concentrações de PEG, verificou-se que a melhor seria a solução de PEG de peso molecular 10 000 a uma concentração de 10 g/L, pois como se confirmou no esfregaço (Figura 5.4 - A), as células mantinham a sua forma fisiológica, ao invés da concentração 100g/L (Figura 5.4 - B) onde já se verificou a ocorrência de lise celular.

Posteriormente explorou-se num microcanal, a possibilidade da solução de PEG 10 com concentração 10 g/L influenciar o escoamento dos GVs. Os resultados mostraram que, com a presença de PEG era mais evidente a formação de camada livre de células, como se pode ver assinalado a vermelho na Figura 5.5.



**Figura 5.5** – Comportamento do fluxo de GVs numa solução de PEG 10 com concentração de 10 g/L. As imagens A e B representam partes do mesmo microcanal, onde a vermelho se assinalam pequenas formações de camada livre de plasma.

Devido à formação de camadas livres de células pode haver um incremento da velocidade de escoamento dos GVs, como já foi verificado em estudos anteriores [18].

## 5.2 FASE MÓVEL COM ADIÇÃO DE PEG 10

Depois de se verificar que o PEG 10 poderia ser usado como um expansor de volume sanguíneo a uma concentração de 10 g/L, optou-se por fazer testes cromatográficos adicionando PEG 10 à fase móvel e também à amostra de GVs a injetar. Como já havia resultados para o tempo de retenção dos GVs para um empacotamento de esferas com diâmetro médio 0,3375 mm, procedeu-se à injeção da amostra na solução de PEG 10, e assim verificou-se que os valores do tempo de retenção não sofreram alterações significativas na presença desta substância, portanto, optou-se por utilizar apenas o soro fisiológico como fase móvel para os restantes ensaios.

## 5.3 RESULTADOS CROMATOGRÁFICOS

Para os diferentes empacotamentos elaborados, foram realizados vários testes, que se traduziram por várias injeções da amostra de GVs para diferentes caudais. O mesmo foi feito para a sacarose (partícula infinitesimal). De cada injeção/caudal resultaram vários cromatogramas, consultar Apêndice A, dos quais se retirou a informação necessária ao cálculo do tempo de retenção relativo (RRT) dos GVs para os diferentes empacotamentos.

Para cada substância, obtiveram-se cromatogramas diferentes, ou seja, o cromatograma dos GVs, para um dado caudal é obtido em separado do cromatograma da sacarose, mesmo que o caudal seja o mesmo. Porém, o software *Peak Simple* permite guardar os valores dos cromatogramas em ficheiros de texto, assim sendo, os cromatogramas foram adaptados (através do EXCEL) de forma a conjugar os dois cromatogramas das duas amostras (GVs e sacarose) para o mesmo caudal GVs, neste caso, obtém-se dois picos num gráfico apenas, como mostra a Figura 5.6.

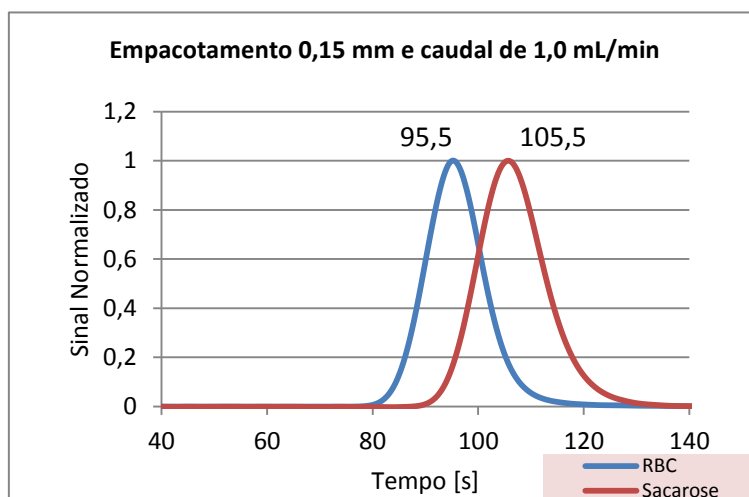


Figura 5.6 – Ilustração de um cromatograma.

Como se verifica na Figura 5.6 ao colocar os cromatogramas juntos para o mesmo caudal, é mais perceptível a diferença do tempo de residência para cada uma das amostras. Neste caso, o tempo de residência para os GVs é 95,5s (1,59 min), e para a sacarose é de 105,5s (2,16 min). Como era de esperar, a sacarose enquanto partícula infinitesimal apresenta maior tempo de residência do que os GVs.

Para cada empacotamento foram retirados os tempos de residência das amostras e calculados os tempos de retenção relativos. É de relembrar que o RRT é definido pela razão entre o tempo médio de residência da partícula com raio efetivo ( $\emptyset$ ) e o tempo de residência médio da partícula com uma dimensão infinitesimal. Portanto, o RRT será a razão entre o tempo médio de residência dos GVs e o tempo médio de residência da sacarose.

Neste caso em concreto apresentado na Figura 5.6, vem que:

$$RRT = \frac{95,5}{105,5} = 0,9052$$

Para cada caudal foi calculado o RRT. Posteriormente calculou-se o RRT médio (correspondente à média de várias experiências) para cada empacotamento, resultando os valores apresentados na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1** – Resultados de RRT para os diferentes empacotamentos.

<b>Empacotamento: Diâmetro médio das esferas [mm]</b>	<b>RRT médio</b>
0,115	0,998
0,150	0,897
0,3375	0,876
0,875	0,937
2,0	0,968

Analisando os valores apresentados na Tabela 5.1 verifica-se, que o valor mínimo é atingido para o empacotamento de esferas de diâmetro 0,3375 mm, o valor médio de RRT calculado diminui do empacotamento de esferas 0,150 mm para o empacotamento relativo às esferas de diâmetro 0,3375 mm. Posteriormente, o valor médio de RRT aumenta para os empacotamentos com esferas de diâmetro médio de 0,875 e 2 mm.

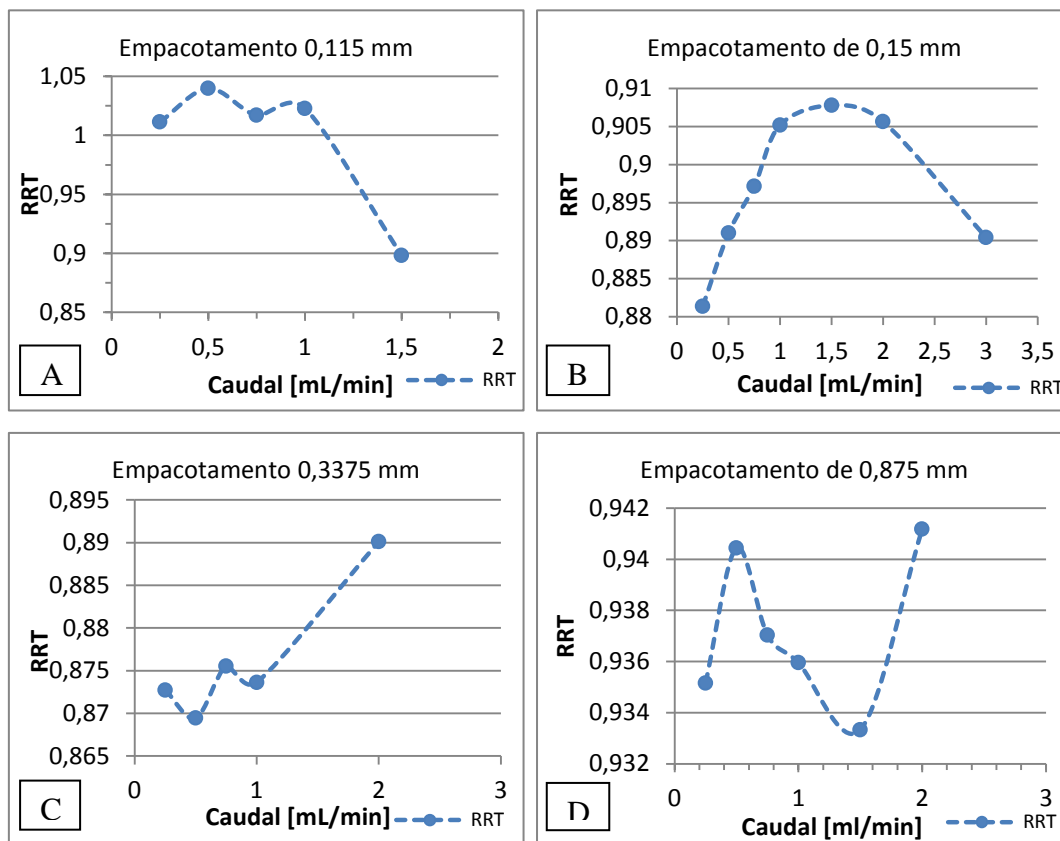
Para o empacotamento de esferas de diâmetro médio de 0,115 mm, verificou-se que o RRT já se encontra muito próximo de 1, este comportamento pode ser explicado pelo facto dos tamanhos dos poros serem demasiado pequenos em relação ao tamanho dos GVs. Supõe-se que para este caso, as células apresentem um comportamento semelhante à cromatografia *slalom*, em que a célula serpenteia por entre os poros ficando por vezes aprisionada, e levando assim ao seu retardamento.

Realizou-se o mesmo ensaio usado nos GVs para temperaturas inferiores e temperaturas superiores à temperatura ambiente, e ainda para a temperatura de 37°C (temperatura aproximada do organismo), porém, não se observaram diferenças significativas para o tempo de residência dos GVs.

#### **5.4 INFLUÊNCIA DO CAUDAL NO RRT**

Para os vários empacotamentos estudados obtiveram-se valores médios de RRT distintos. Ao longo dos ensaios de cada empacotamento testaram-se diferentes caudais,

para os quais se obtiveram valores de RRT diferentes. De forma a visualizar a possível influência, ou não, da variação do caudal no RRT, elaboraram-se alguns gráficos, que a seguir se apresentam na Figura 5.7.



**Figura 5.7** – A, B, C, e D gráficos de RRT em função do caudal para os empacotamentos 0,115, 0,150, 0,3375 e 0,875  $\mu\text{m}$ .

Como é possível observar na Figura 5.7 os diferentes gráficos não apresentam um comportamento padronizado, ou seja, para os quatro casos (A, B, C e D) verifica-se que à medida que varia o caudal, os valores de RRT variam, sem nenhuma tendência definida. É de notar que para o gráfico A e C (Figura 5.7) os valores de RRT até ao caudal 1 mL/min encontram-se bastante próximos, porém ao aumentar o caudal para 1,5 e 2 mL/min respetivamente, o valor de RRT afasta-se dos outros. Para os gráficos B e C os valores são mais irregulares, havendo maior desfasamento entre si. No entanto, excetuando o caso A, a variação de RRT com o caudal (na gama estudada) é pequena e não é possível retirar qualquer conclusão sobre uma possível influência do caudal no valor de RRT.

## 5.5 DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO EXPERIMENTAL DOS GVS DE OVINO

Entende-se por diâmetro experimental dos GVs o diâmetro que estes apresentam após preparação da amostra em estudo, isto é, após lavagem e preparo de Hct em soro fisiológico, das quais foram preparados dois esfregaços.

Depois de preparados os esfregaços com as amostras de GVs com 1% de Hct, foram obtidas dez imagens de várias zonas do esfregaço, de modo a observarem-se o maior número de células por imagem. As imagens foram retiradas com uma objetiva de 100 x. No total de 10 imagens, foram contabilizadas 64 células no total, de que foram determinados os seus diâmetros horizontais e verticais. Posteriormente calculou-se um valor médio final para o diâmetro experimental dos GVs.

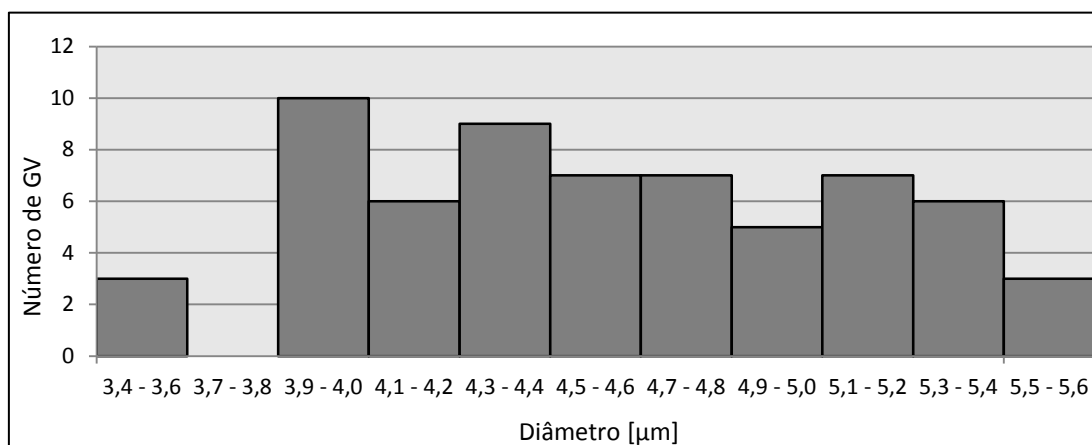
O número de células em cada imagem não era fixo, uma vez que, as imagens foram retiradas de partes distintas do esfregaço, e a posição das células era aleatória. A medição dos diâmetros foi feita no *software ImageJ*, mas antes foi necessário recorrer a uma imagem de referência, a qual consiste numa matriz, cujas células têm medidas conhecidas, e assim calibrarmos o software para medirmos os GVs. Na Figura 5.8 estão representados as três etapas do processamento para uma das imagens obtidas.



**Figura 5.8** – A - Imagem original com GVs obtida no microscópio invertido; B - Imagem dos GVs após o pré-processamento, filtragem e realce de contraste; C - Segmentação da imagem, por binarização, e, determinação dos diâmetros horizontal e vertical, de cada uma das células.

O valor médio calculado para o diâmetro experimental das células presentes na amostra foi 4,602  $\mu\text{m}$ .

Ao longo da determinação dos diâmetros verificou-se que a faixa de valores era bastante alargada. Para se perceber qual a faixa de diâmetros mais presente, optou-se por um histograma com a frequência dos diâmetros dos GVs, onde se pode verificar que a maioria das células analisadas têm um diâmetro entre 3,9 e 5,2  $\mu m$ , ver Figura 5.9.



**Figura 5.9** – Histograma com a frequência dos diâmetros dos GVs.

Da determinação do diâmetro dos GVs de ovino conclui-se que estes se encontram dentro dos valores de referência encontrados na literatura, o intervalo de referência é 3,2 a 6  $\mu m$  [19], e o valor médio calculado é 4,6  $\mu m$ .

## 5.6 DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO EFETIVO DOS GVS DE OVINO

Como já foi indicado no subcapítulo 2.2, o diâmetro efetivo da partícula ( $\phi$ ), neste caso do GV, pode ser calculado através da Equação 7:  $\lambda = \frac{\phi}{R}$ . Onde  $R$ , é o diâmetro do poro, e  $\lambda$  pode ser calculado pela Equação 8:  $RRT = \frac{1}{1+2\lambda-C\lambda^2}$ .

Como o valor de RRT foi calculado para cada um dos empacotamentos, basta proceder ao cálculo de  $\lambda$ , através dos valores de  $C$  já referidos, ou seja, 2,7 para polímeros flexíveis e 4,89 para partículas rígidas. Os GVs apresentarão um comportamento que se encontra entre o comportamento de partículas rígidas e de polímeros flexíveis. Portanto, para o mesmo empacotamento calculam-se os dois valores possíveis para  $\lambda$ , deste modo, substituindo os valores para a Equação 7 obtêm-se

os diâmetros efetivos dos GVs. Os valores determinados para os diferentes empacotamentos estão apresentados na Tabela 5.2.

**Tabela 5.2** – Determinação do diâmetro efetivo dos GVs.

<b>Empacotamento [<math>\mu m</math>]</b>	<b>RRT médio</b>	<b>Diâmetro dos poros [<math>\mu m</math>]</b>	<b>C</b>	<b><math>\lambda</math></b>	<b>Diâmetro efetivo [<math>\mu m</math>]</b>
115	0,998	51,1	2,7	0,739670	37,805377
			4,89	0,407926	20,849570
150	0,897	66,7	2,7	0,677975	45,198350
			4,89	0,339865	22,657692
337,5	0,876	150	2,7	0,079020	11,853045
			4,89	0,090708	13,606182
875	0,937	388,9	2,7	0,035183	13,682326
			4,89	0,036828	14,322086
2000	0,968	888,9	2,7	0,017051	15,156057
			4,89	0,017398	15,465052

Como se verifica na tabela acima os valores relativos ao diâmetro efetivo dos GVs sofrem uma grande deformação para os diferentes empacotamentos. Isto deve-se essencialmente à capacidade de deformação dos GVs, que, para passar em microcapilares se estendem, de forma a obter um comprimento muito maior, mas uma espessura muito menor. Em empacotamentos com esferas muito pequenas, como foi o caso do empacotamento de esferas de diâmetro médio 115  $\mu m$ , supõem-se que as células possam ter ficado temporariamente retidas nas regiões próximas das zonas de contacto entre as esferas, o que levou ao aumento do RRT para valores próximos de 1.

Portanto, a deformação dos GVs durante o escoamento poderá justificar o facto dos diâmetros efetivos obtidos serem superiores ao diâmetro experimental (4,6  $\mu m$ ).

## 5.7 COMPARAÇÃO DOS RRTs EXPERIMENTAIS COM OS TEÓRICOS

Com o valor médio do diâmetro dos GVs analisados ao microscópio,  $4,6 \mu m$ , determinou-se um valor para  $\lambda$ , usando a Equação 7. Conhecido o valor de  $\lambda$ , utilizou-se a Equação 8, e os respectivos valores da variável C, para determinar o valor de RRT para cada uma das colunas empacotadas. Os valores determinados estão representados na Tabela 5.3.

**Tabela 5.3** – Determinação dos desvios para os diferentes valores de RRT.

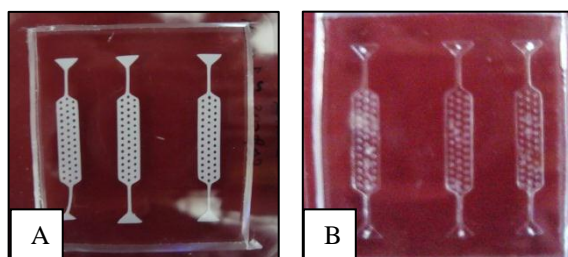
<b>Diâm. médio das esferas [<math>\mu m</math>]</b>	<b>Diâm. Poros [<math>\mu m</math>]</b>	$\lambda$	<b>RRT (C=2,7)</b>	<b>RRT (C=4,89)</b>	<b>RRT (ensaios)</b>	<b>Desvio (C=2,7)</b>	<b>Desvio (C=4,89)</b>
115	51,1	0,090	0,863	0,877	0,998	-15,590	-13,818
150	66,7	0,069	0,889	0,897	0,897	-0,925	0,010
337,5	150	0,031	0,944	0,946	0,876	7,247	7,428
875	388,9	0,012	0,977	0,978	0,937	4,118	4,147
2000	888,9	0,005	0,990	0,990	0,968	2,205	2,210

Analisando os valores de desvio calculados, verifica-se que para o empacotamento constituído por esferas de diâmetro médio de  $115 \mu m$  o desvio é muito superior em relação aos desvios calculados para os restantes empacotamentos. Já para o empacotamento composto por esferas de diâmetro médio  $150 \mu m$  o valor do desvio é o mais reduzido. Ou seja, o valor teórico de RRT calculado para o empacotamento de esferas de diâmetro médio  $150 \mu m$  é o que se encontra mais próximo dos valores experimentais de RRT obtidos nos ensaios. O facto do RRT experimental estar abaixo do previsto para os três últimos empacotamentos da tabela acima poderá estar relacionado com a formação de regiões onde existem camadas livres de células junto às partículas do empacotamento, regiões onde as velocidades são baixas ou nulas. Os resultados experimentais para o RRT seguem, qualitativamente o comportamento apresentado pelos valores teóricos (ver Figura 2.5). Assim, o valor do RRT dos ensaios apresenta valores próximos de 1 para valores de  $\lambda$  baixos, atinge um mínimo no empacotamento com esferas de  $0,3375 mm$  e sobe em seguida.

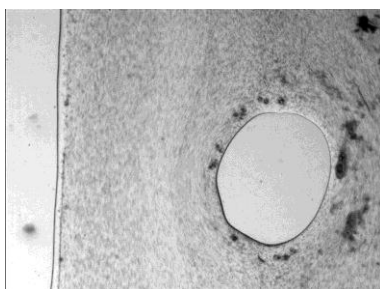
## 5.8 FABRICAÇÃO DOS MICROCANAIS EM PDMS

Como já foi referido, foram utilizados dois métodos distintos para fabricar as máscaras dos microcanais. No primeiro método usou-se papel autocolante e no segundo método foi usada a técnica fotográfica através de uma placa de cobre e radiação UV.

Os primeiros microcanais testados foram fabricados por máscaras feitas em papel autocolante tinham círculos com diâmetros de aproximadamente  $1000\ \mu\text{m}$  e os espaços entre cada círculo de  $500\ \mu\text{m}$ , ver Figura 5.10. Estas dimensões deveram-se ao facto da *plotter* não ter capacidade de cortar círculos mais pequenos que, já para este caso se verificou, os círculos não eram uniformes, e em algumas zonas as paredes também não. Portanto, optou-se por uma análise qualitativa dos escoamentos, visto que as paredes e as formas não ficaram bem definidas como se pode conferir na Figura 5.11.



**Figura 5.10** – A: Máscara em papel autocolante; B: Microcanais obtidos pelas máscaras em papel autocolante.



**Figura 5.11** – Imagem do microcanal obtido usando a máscara em papel autocolante.

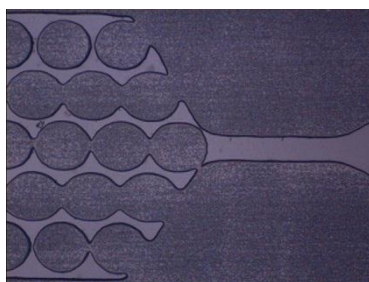
No segundo método, tanto as paredes dos microcanais, como os círculos ficaram com uma definição melhor: as paredes mais lisas, e os círculos mais perfeitos.

O segundo método utilizado, como já foi referido, foi o método fotográfico. Este permitiu produzir microcanais com medidas mais próximas dos empacotamentos utili-

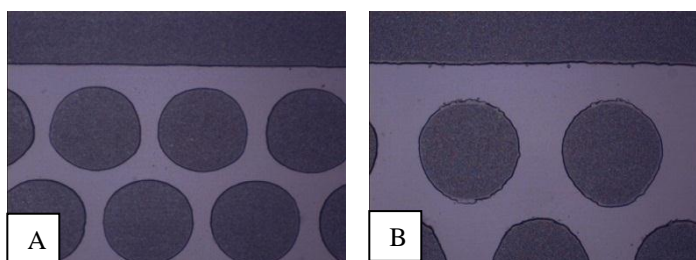
zados nas colunas, nomeadamente, foram produzidos microcanais com círculos de 300, 600 e 800  $\mu m$ .

O microcanal com círculos de diâmetro 300  $\mu m$  ficou inutilizado, uma vez que o canal ficou deformado devido às suas reduzidas dimensões, tal como se pode observar na Figura 5.12, os círculos ficaram agregados uns aos outros e formaram canais isolados.

Relativamente aos microcanais com círculos de diâmetro 600 e 800  $\mu m$  verifica-se que tanto as paredes do microcanal, como os contornos dos círculos são uniformes e bem definidos, como se pode comprovar pela Figura 5.13.



**Figura 5.12** – Microcanal com círculos de diâmetro de 300  $\mu m$ .



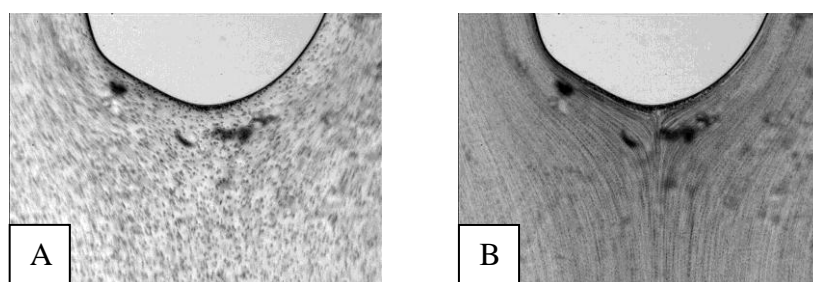
**Figura 5.13** – A: microcanal com círculos de diâmetro 600  $\mu m$ ; B: microcanal com círculos de diâmetro 800  $\mu m$ .

Em relação aos microcanais obtidos pelo método fotográfico, verificou-se que as paredes e os contornos dos círculos eram mais uniformes. Este método também foi mais satisfatório relativamente às dimensões pretendidas, excetuando para o microcanal com círculos de diâmetro 300  $\mu m$ , como foi referido anteriormente.

## 5.9 PROCESSAMENTO DE IMAGEM

Para desenvolver uma análise qualitativa dos escoamentos, submeteram-se os vídeos captados a um processamento de imagem, para isso, recorreu-se a um *software* próprio para processamento de imagem, o *ImageJ*. Este programa para além de muitas outras funcionalidades permite transformar um vídeo numa imagem estática utilizando um *plugin* designado *Z-project*. O *Z-project* possibilita a seleção das propriedades de imagem que melhor realcem os objetos da imagem. No caso deste trabalho, pretendia-se visualizar as linhas de escoamento dos GVs ao longo dos microcanais fabricados. Depois de obtidos os vídeos estes foram tratados um a um pelo seguinte método: carregar o vídeo para o programa (é carregado por frames), selecionar o espaço de cor cinzento (a imagem fica a níveis de cinza), posteriormente aplicar o *Z-project* com informação do *Minimum Intensity*, obtém-se uma imagem final à qual se pode ajustar o realce/contraste.

Esta ferramenta, o *Z-project* permite projetar uma só imagem no eixo z, usando a informação de todos os frames do vídeo. Este programa, permite-nos ainda escolher qual o tipo de projeção que se pretende, ou seja qual o tipo de informação que pretendemos retirar de cada frame, neste caso utilizou-se o *Minimum Intensity*, que cria uma imagem de saída onde cada pixel contém o valor mínimo encontrado no conjunto de todas as imagens do vídeo [20]. Na Figura 5.14 – A está representada a imagem do vídeo antes da aplicação do *plugin*, na qual é possível ver os GVs enquanto partículas suspensas; com a aplicação do *plugin*, ver Figura 5.14 – B, verifica-se que se tornam visíveis as linhas de escoamento que resultam da trajetória percorrida por cada um dos GVs, ao longo do tempo de duração do vídeo.



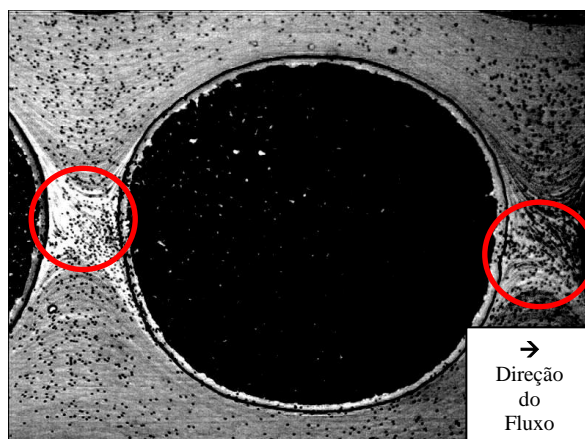
**Figura 5.14** – A: imagem do vídeo original sem processamento; B: projeção resultante da aplicação *Z-project* (*Minimum Intensity*).

## 5.10 ANÁLISE DE ESCOAMENTOS DOS GVs EM MICROCANAIS

Como os microcanais que resultaram do método fotográfico apresentavam melhor definição, optou-se por analisar os escoamentos através dos mesmos<sup>1</sup>. Então, o escoamento dos GVs foi observado em microcanais com círculos de 600 e 800 $\mu m$ . Para caudais de 5, 10 e 20  $\mu L/min$ .

Na análise feita ao escoamento dos GVs no interior dos microcanais identificaram-se principalmente dois fenômenos: a estagnação/recirculação de células entre os círculos, e a formação de camada livre de células.

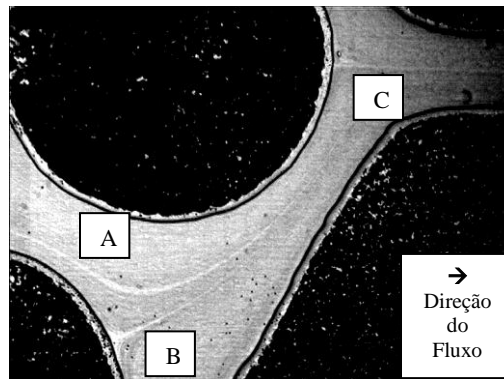
Na Figura 5.15 estão assinaladas a vermelho as zonas de estagnação/recirculação. Estas zonas localizam-se nos espaços entre os círculos, caracterizadas por uma cor esbranquiçada devido à baixa densidade celular. Apesar de não ser tão evidente na imagem como nos vídeos, as poucas células que se encontram nestas zonas não estão totalmente paradas, apresentam algum movimento o qual foi denominado por recirculação. Com este movimento as células acabam por retomar o escoamento na direção do fluxo.



**Figura 5.15** – Efeito de estagnação/recirculação assinalado a vermelho.

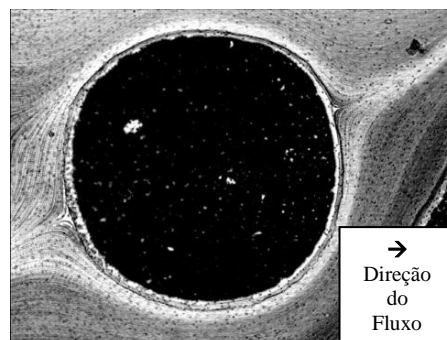
<sup>1</sup> Consultar Apêndice B – Resultados do processamento de vídeos dos escoamentos.

Como mostra a Figura 5.16, para além das zonas de estagnação, nestes escoamentos verificaram-se algumas linhas de fluxo caracterizadas pela baixa densidade de células, criando linhas brancas. Na imagem referida identificam-se algumas dessas linhas: zona assinalada pela letra A é uma linha de fluxo que vem do meio do microcanal que passa por entre os círculos; as zonas B e C são linhas formadas pelas células que contornam as paredes dos círculos.



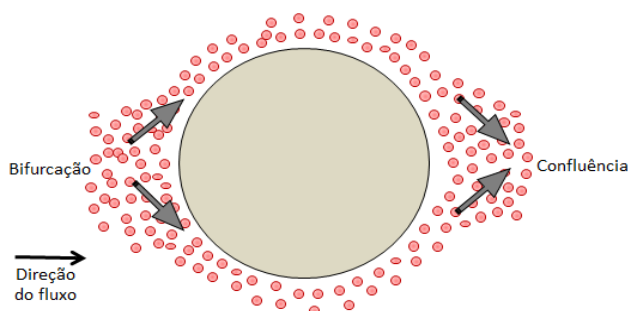
**Figura 5.126** – Linhas de escoamento à saída do microcanal.

Na Figura 5.17 é possível observar a formação de camada livre de células ao redor do círculo, a qual é evidenciada pela área branca junto à parede do círculo. Neste caso, verifica-se também o enfunilar das linhas de escoamento, nomeadamente, quando os GVs chegam ao círculo e quando o abandonam. O efeito que esta imagem sugere é similar ao que acontece em escoamentos de GVs em bifurcações e confluências.



**Figura 5.17** – Nesta imagem é possível observar a formação de camada livre de células ao redor do círculo.

Neste caso, o círculo funciona como uma bifurcação e uma confluência, como está esquematizado na Figura 5.18. Estudos anteriores [18] concluíram que os GVs ao chegarem à confluência aumentam a sua velocidade, dado que se encontram numa zona de baixa densidade celular. Este fenómeno é visível também na Figura 5.17



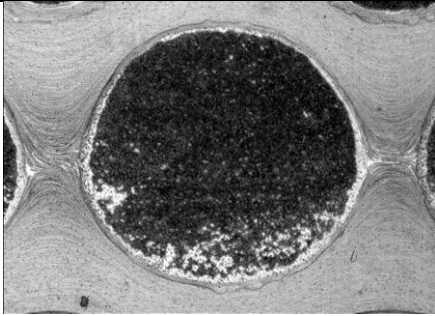
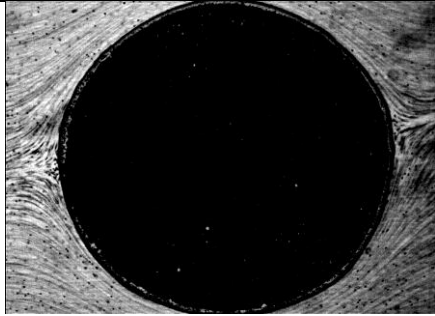
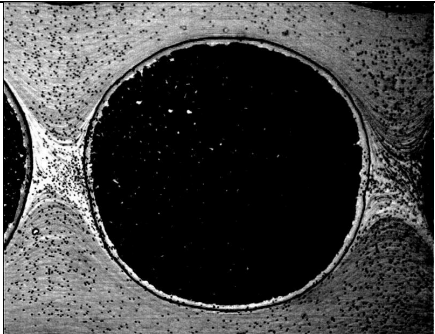
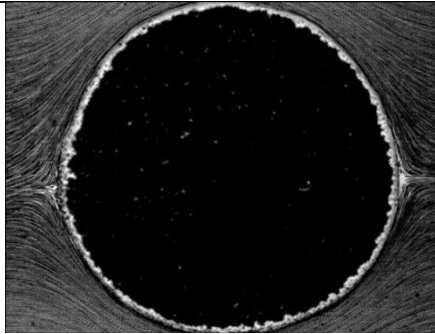
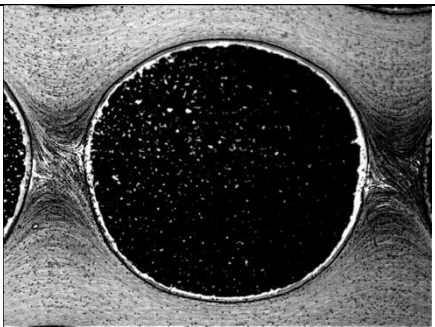
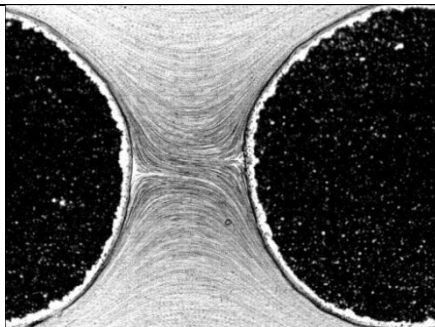
**Figura 5.18** – Esquematização do efeito de bifurcação e confluência.

De um modo geral, foram captados vídeos de algumas zonas específicas dos microcanais, dos quais se processaram imagens estáticas. Na Tabela 5.4 estão apresentadas imagens relativas à zona central dos microcanais.

Nesta zona do microcanal foi possível observar zonas de estagnação que se formavam entre os círculos. Este efeito pode dever-se ao facto da força do fluxo ser superior para algumas zonas, ou seja, a velocidade com que os GVs se deslocam na direção do fluxo é superior em certas zonas do microcanal. Este efeito de estagnação de algumas células pode levar ao retardamento do tempo de residência das mesmas.

Com o aumento do caudal dos GVs verificou-se que as linhas de escoamento tornaram-se mais notórias, porém as zonas de estagnação entre os círculos não sofreram alterações.

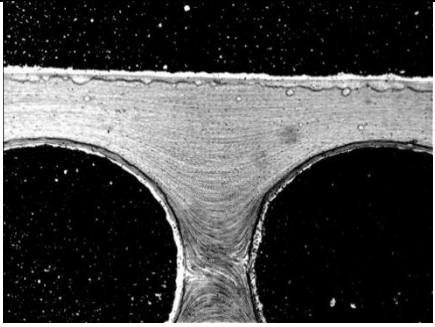
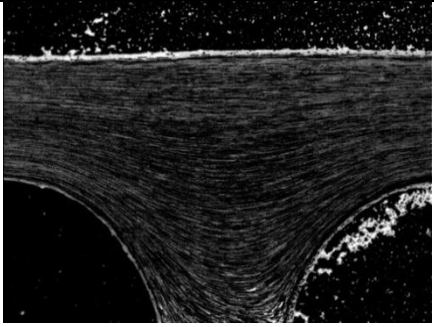
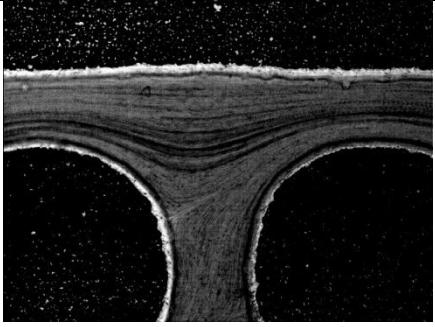
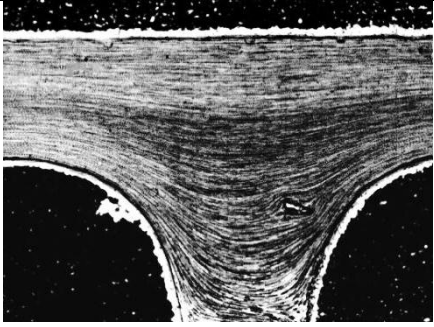
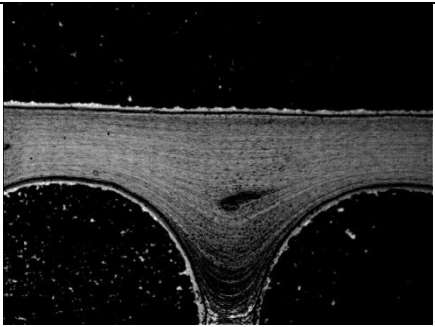
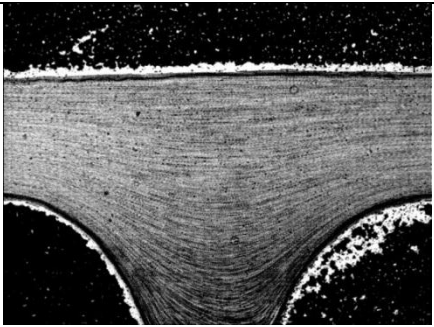
**Tabela 5.4** – Imagens relativas à zona central do microcanal.

	Círculos com 600 $\mu\text{m}$	Círculos com 800 $\mu\text{m}$
5 $\mu\text{L}/\text{min}$		
10 $\mu\text{L}/\text{min}$		
20 $\mu\text{L}/\text{min}$		

Na Tabela 5.5 estão representadas as imagens relativas às paredes laterais dos microcanais.

Para todos os caudais verificou-se a formação de uma camada livre de células. Nas imagens da referida tabela, este fenómeno é caracterizado por uma linha branca entre as linhas de escoamento e o limite da parede do microcanal. Em algumas situações verifica-se também a formação de camada livre de células junto ao contorno dos círculos.

**Tabela 5.5** – Imagens relativas às paredes laterais dos microcanais.

	Círculos com 600 $\mu m$	Círculos com 800 $\mu m$
5 $\mu L/min$		
10 $\mu L/min$		
20 $\mu L/min$		

Desta análise, verificou-se que para os diferentes caudais estudados não se observaram diferenças significativas relativamente à formação de camadas livres de células.



# CAPÍTULO 6

## CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

### 6.1 CONCLUSÕES

O trabalho que foi desenvolvido ao longo deste projeto teve como principal objetivo o desenvolvimento e a análise de um dispositivo micro-cromatográfico para separação, e escoamento, neste caso particular dos GVs. O parâmetro principal explorado foi o tempo de retenção relativo dos GVs para colunas de eluição com empacotamentos diferentes.

Dos resultados obtidos relativamente aos tempos de retenção relativos conclui-se que estes seguem o comportamento típico da cromatografia hidrodinâmica.

Conclui-se também que a adição de uma substância mais densa à fase móvel, como foi o caso do PEG 10, não modifica os valores do tempo de retenção dos GVs.

Pequenas variações nos valores dos tempos de residência deveram-se essencialmente a fatores do sistema de HDC, pois a mais pequena alteração de concentração altera o sinal devolvido pelo detetor.

O empacotamento que apresentou alguma dificuldade à passagem dos GVs foi o das esferas de diâmetro médio de  $115 \mu m$ , isto deve-se essencialmente ao reduzido tamanho dos poros. Supõem-se que para este caso os GVs apresentem um comportamento diferente em relação aos outros empacotamentos, e que se aproximem mais de uma cromatografia *slalom*, ou seja, os GVs teriam de se estender e serpentear entres as esferas, levando isto à sua retardação.

Por fim, em relação aos escoamentos dos GVs nos microcanais conclui-se que são formadas camadas livres de células em diferentes regiões dos microcanais, o que pode conduzir ao aumento de velocidade das mesmas. Por outro lado, detetaram-se zonas de estagnação que produzem o efeito contrário. Portanto a velocidade com que se movem os GVs no interior das colunas depende da combinação de diferentes efeitos: formação de camada livre de células, formação de zonas de estagnação, a retenção de células junto aos pontos de contacto entre esferas e o efeito de cromatografia hidrodinâmica.

Com os presentes resultados é possível já afirmar que os empacotamentos desenvolvidos podem ser utilizados para separar as células sanguíneas de moléculas dissolvidas no plasma (como as proteínas) com dimensões da ordem de grandeza da sacarose.

## 6.2 TRABALHO FUTURO

Futuramente, dando continuidade a este projeto existem outros pontos de trabalho a serem considerados.

A nível do HDC poder-se-á testar novos empacotamentos, de preferência esferas de diâmetros inferiores de forma a obter valores de RRT para  $\lambda$  superiores aos usados neste estudo. Em relação à fase móvel, poderá ser testado o Dx 40 que ao contrário do PEG 10 é um expansor volúmico sanguíneo muito utilizado, e assim proceder à comparação dos resultados obtidos em soro fisiológico.

Sugere-se ainda que se elaborem os mesmos procedimentos de HDC para os glóbulos brancos. Um dos métodos que se pode utilizar para a separação de glóbulos brancos, nomeadamente, dos granulócitos, é a utilização de substâncias com densidades distintas, como o caso do histopaque para sangue humano, e da meglumina para sangue de ovino. O histopaque não funciona com sangue ovino, pois este apresenta características diferentes do sangue humano<sup>2</sup>.

Relativamente aos microcanais e às geometrias exploradas neste trabalho poder-se ia ainda analisar as linhas de escoamento, ou seja, fazer o seguimento de células e calcular a sua velocidade ao longo do escoamento. Testar várias percentagens de Hct e analisar a formação de camada de plasma livre, e calcular a sua espessura.

Propõe-se ainda que sejam exploradas novas geometrias com contornos circulares, baseadas nas colunas de eluição.

---

<sup>2</sup> Consultar Apêndice C – Separação de Glóbulos Brancos.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MAEDA, N., SOUTANI, M., SUZUKI, Y., and TATEISHI, N., "Deformation of erythrocytes in microvessels and glass capillaries: effects of erythrocyte deformability," *Microcirculation* vol. 3, pp. 49-57, 1996.
- [2] NAKANO, A., SUGII, Y. and *et. al.*, "Velocity profiles of pulsatile blood flow in arterioles with bifurcation and confluence in rat mesentery measured by particle image velocimetry," *JSME Internacional Journal*, vol. 4, pp. 444-452, 2005.
- [3] OLIVEIRA, M. A., "Conceitos de física básica que todo cirurgião cardiovascular deve saber. Parte I - Mecânica de fluidos," *Revista Brasileira Cirurgia Cardiovascular*, pp. 25(1): 1-10, 2010.
- [4] SILVA, J. and ROCHA, M., *Fisiologia da circulação*, 2ª ed., São Paulo: EDART, p. 29, 1977.
- [5] BLANCH, H. W. and CLARK, D. S., *Biochemical Engineering*, M. Dekker, 1996.
- [6] STEGEMAN, G., KRAAK, J. C. and POPPE, H., "Dispersion in packed-column hydrodynamic chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 634: 2, pp. 149-159, 1993.
- [7] VENEMA, E., KRAAK, J. C. and POPPE, H., and TIJSSEN, R., "Packed-column hydrodynamic chromatography using 1  $\mu\text{m}$  nonporous silica particles," 1996.
- [8] HOAGLAND, D. A. and PRUD'HOMME, R. K., "Hydrodynamic chromatography as a probe of polymer dynamics during flow through porous media," *Macromolecules*, vol. 22: 2, pp. 775-781, New Jersey, 1989.
- [9] PASCALE, E. M. R., "Application of capillary hydrodynamic chromatography to the classification of fibres and the separation of fibres from micrometer sized particles", *International Chemical Engineering*, vol. 26: 2, pp. 257-262, 1986.
- [10] HAMAKER, K. H. and LADISCH, M. R., "Intraparticle flow and plate height effects in liquid chromatography stationary phases," *Separation and Purification Methods*, vol. 25: 1, pp. 47-83, 1996.
- [11] GRAMAIN, P. M. P., "Elongational deformation by shear flow of flexible polymers adsorbed in porous media," *Macromolecules*, vol. 14: 1, pp. 180-184, 1981.
- [12] TIJSSEN, R., "Hydrodynamic Chromatography in Open Microcapillary Tubes," *A. Chem.*, vol. 58, pp. 3036-3034, 1986.
- [13] COUTO, A., TEIXEIRA, L., LEBLE, V., LIMA, R., RIBEIRO, A. and DIAS, R., "Flow of red blood cells in capillary networks", 2011.
- [14] MOTA, M., TEIXEIRA, J., YELSHIN, A., and CORTEZ, S., "Novas Técnicas Cromatográficas," *EQ - Processos de Separação*, pp. 34-39, 2004.
- [15] CARNEIRO, J., and JUNQUEIRA, L., *Histologia Básica*, 11ª ed. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.

- [16] SEQUEIRA, A., "Introdução à Matemática do Sistema Cardiovascular," in *Seminário DM/IST*, Lisboa, 2009.
- [17] DACIE, J., and LEWIS, S., *Practical Haematology*, Churchill Livingstone, 1995.
- [18] LEBLE, V. LIMA, R., DIAS, R., FERNANDES, C., and ISHIKAWA, T., "Asymmetry of red blood cell motions in a microchannel with adiverging and converging bifurcation," *AIP - Biomicrofluidics*, 2011.
- [19] FELDMAN, B., ZINKL, J., and JAIN, N., *Schalm's Veterinary Hematology*, John Wiley & Sons, 2000.
- [20] "ImageJ - Image Processing and Analysis in Java," 2012. [Online]. Available: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.
- [21] "Edição Especial Ciência e Saúde," *Revista Scientific American*, n°3, 2006.
- [22] "Actualiza Fisio," Blogspot, 8 Fevereiro 2011. [Online]. Available: [http://atualizafisio.blogspot.pt/2011\\_02\\_01\\_archive.html](http://atualizafisio.blogspot.pt/2011_02_01_archive.html). [Accessed Março 2012].
- [23] "Academia de Ciência e Tecnologia," [Online]. Available: <http://www.ciencianews.com.br/unicel/2pg.htm>. [Accessed junho 2012].
- [24] BLOM, M. T., CHMELA, E., OOSTERVINK, R., and TIJSSEN, R., "On-chip hydrodynamic chromatography separation and detection of nanoparticles and biomolecules," *Analytical Chemistry*, vol. 75: 24, pp. 6761-6768, 2003.
- [25] BOS, J., TIJSSEN, R., and KREVELD, M. E., "Determination of the dissociation temperature of organic micelles by microcapillary hydrodynamic chromatography," pp. 61:1318-1321., Amsterdam, 1989.

# APÊNDICE A

## CROMATOGRAMAS

Os cromatogramas obtidos para cada um dos empacotamentos são gráficos que contêm muita informação, uma vez que, o sinal é lido pelo detetor a cada 0,5 s o que, para empacotamentos de colunas muito grandes, pode levar a testes que demorem mais de uma *h*. O Excel permite aceder aos dados retidos pelo detetor, e dessa forma, é possível transformar os cromatogramas mais pequenos e mais perceptíveis.

Neste anexo, podemos visualizar os cromatogramas obtidos para cada empacotamento, para os respetivos caudais estudados.

### 1. Empacotamento de esferas de diâmetro médio 115 $\mu\text{m}$

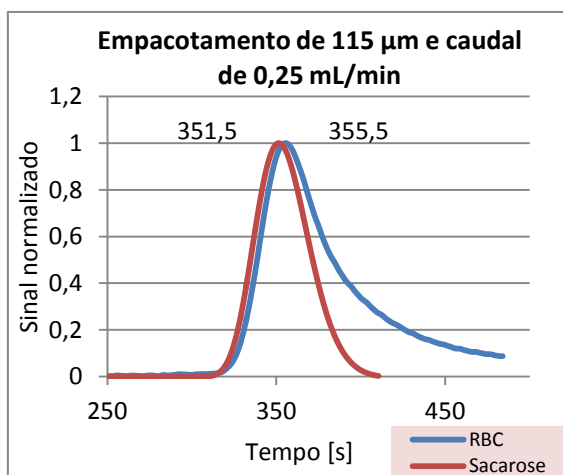


Figura A - 1.1

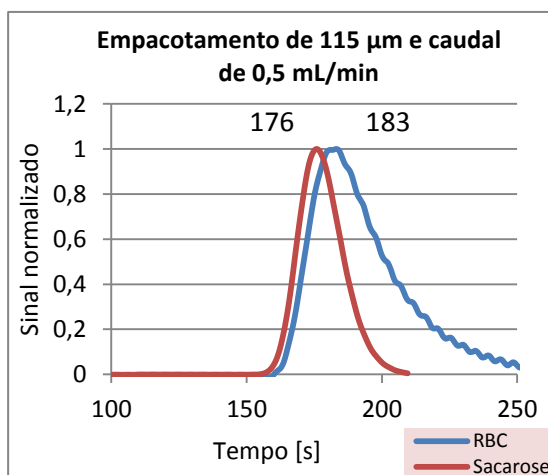


Figura A - 1.2

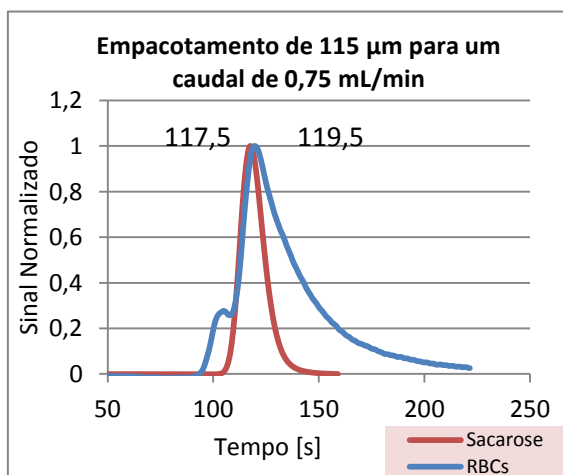


Figura A - 1.3

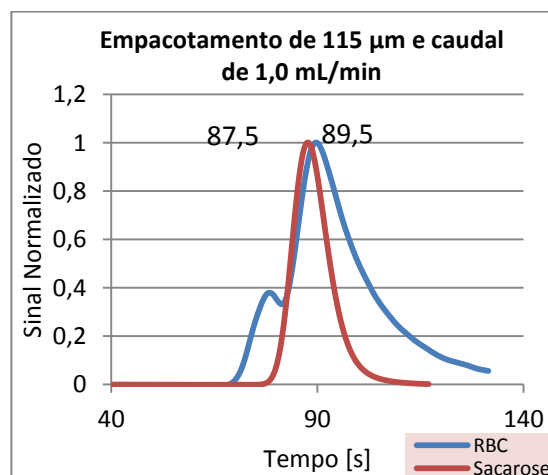


Figura A - 1.4

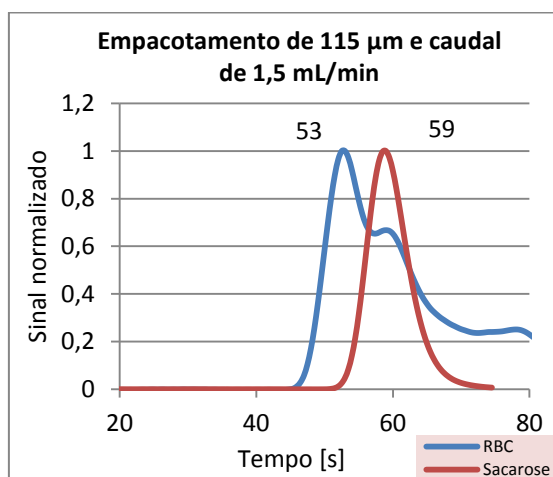


Figura A - 1.5

## 2. Empacotamento de esferas de 0,150 mm

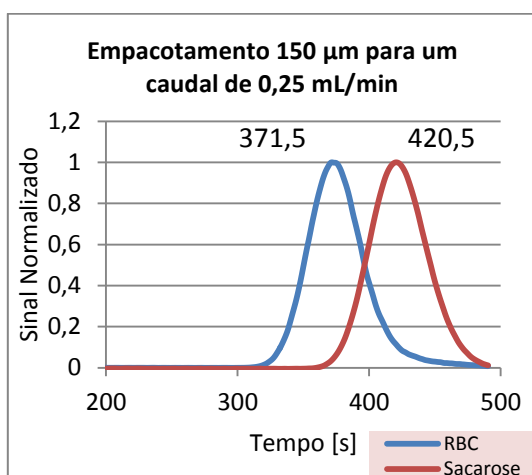


Figura A - 2.1

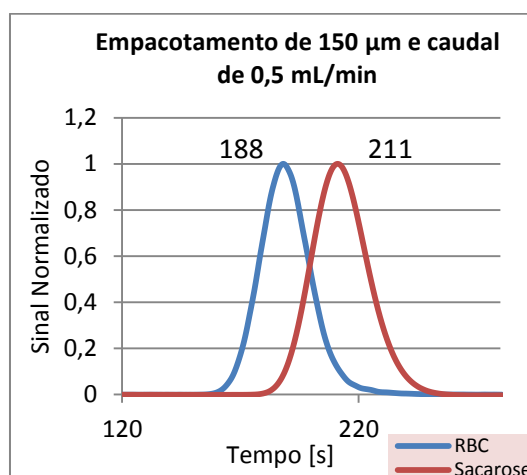


Figura A - 2.2

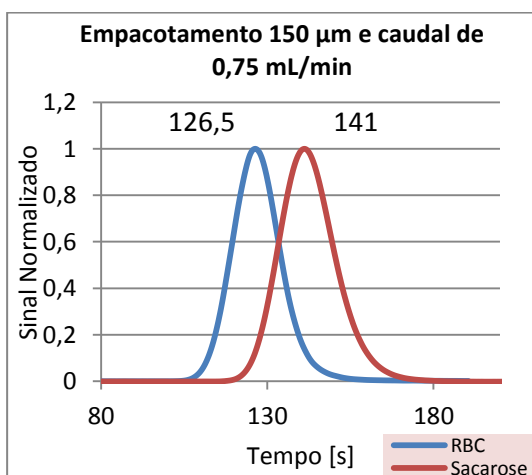


Figura A - 2.3

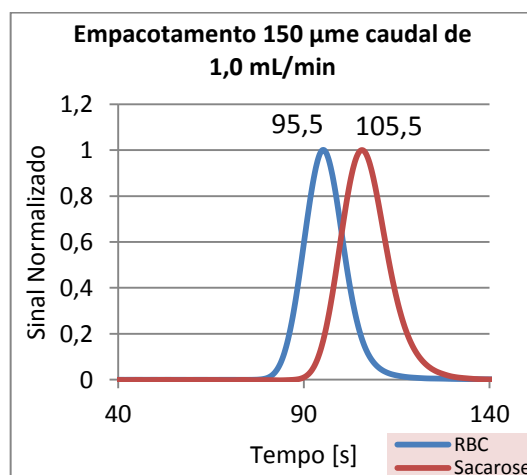


Figura A - 2.4

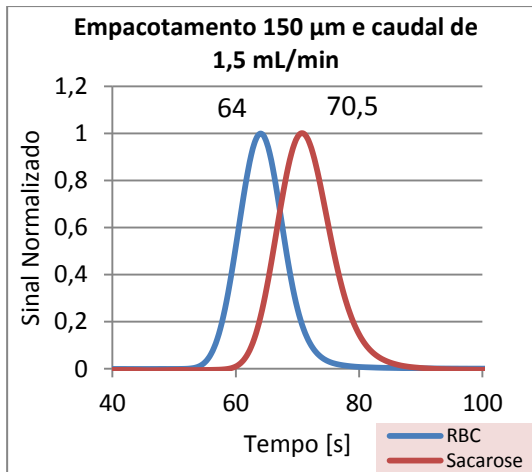


Figura A - 2.5

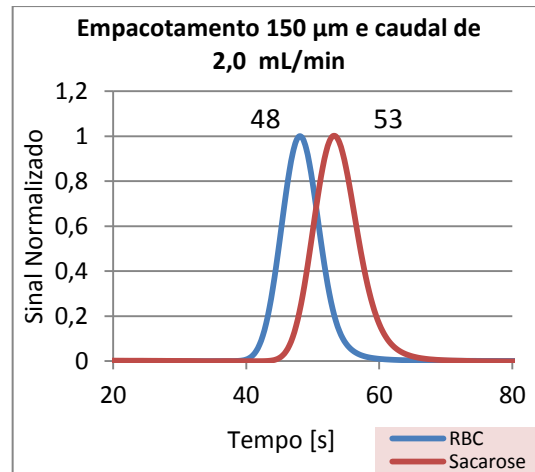


Figura A - 2.6

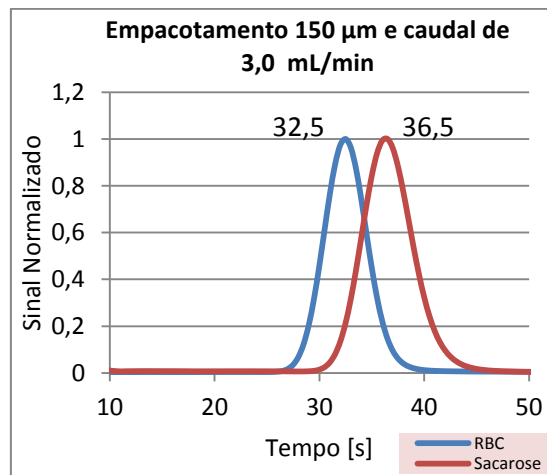


Figura A - 2.7

### 3. Empacotamento de esferas de diâmetro médio = 337,5 µm

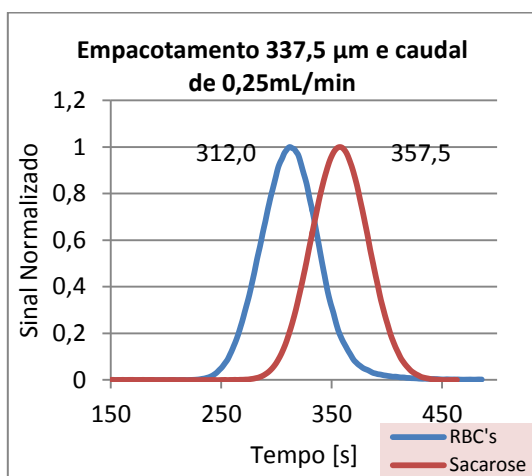


Figura A - 3.1

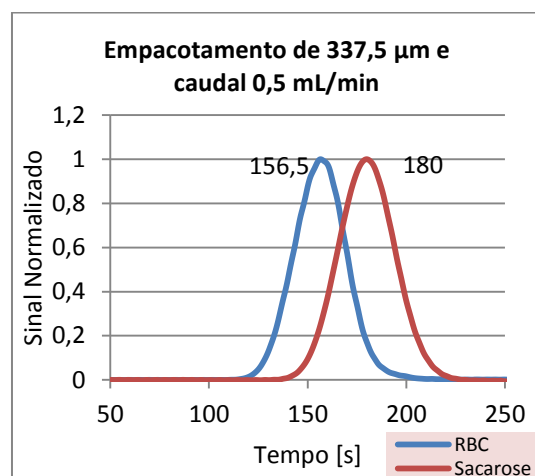


Figura A - 3.2

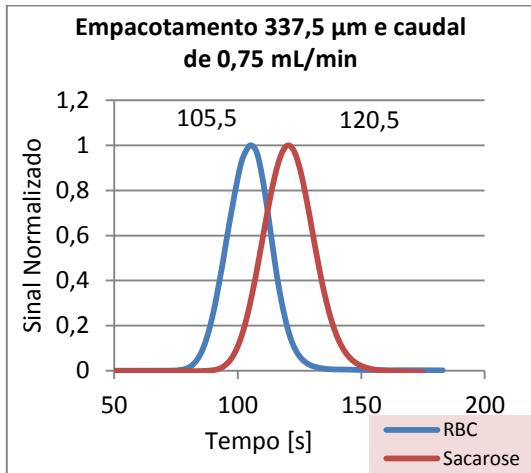


Figura A - 3.3

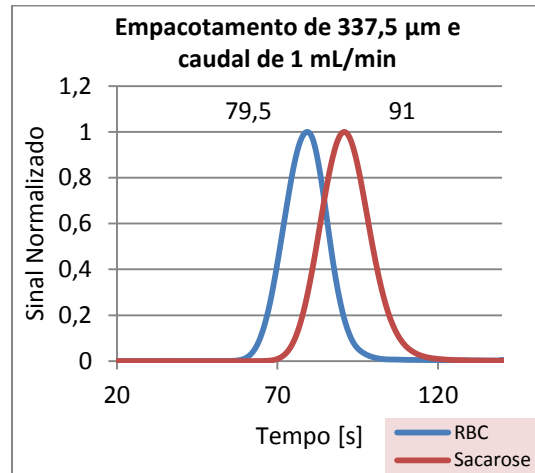


Figura A - 3.4

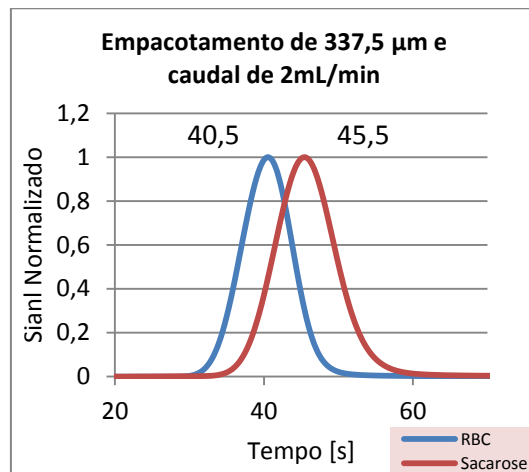


Figura A - 3.5

#### 4. Empacotamento de esferas de diâmetro médio = 875 μm

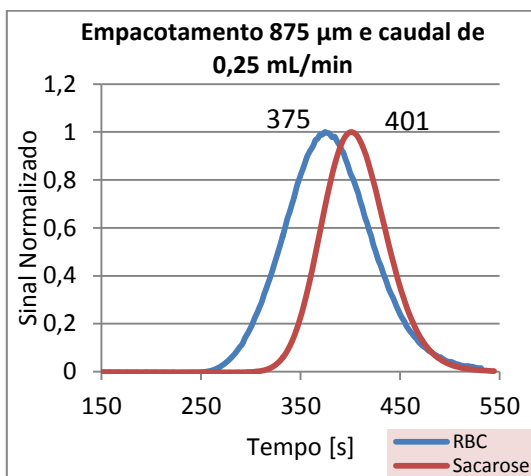


Figura A - 4.1

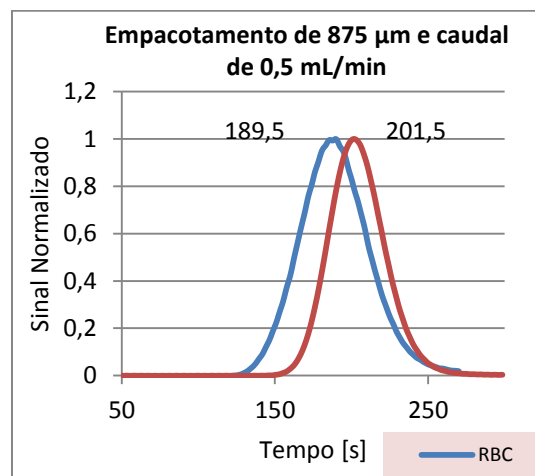


Figura A - 4.2

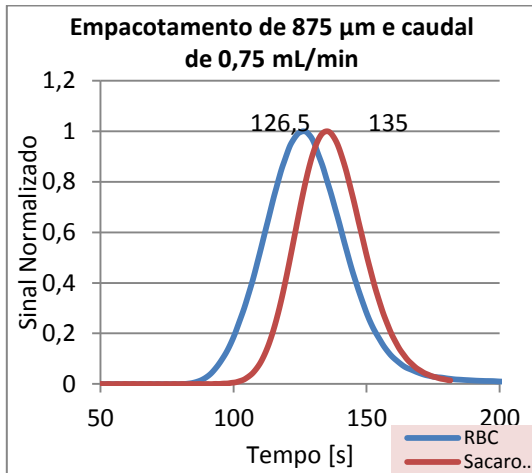


Figura A - 4.3

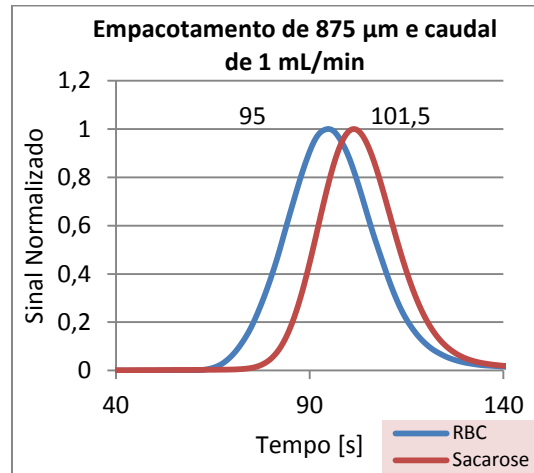


Figura A - 4.4

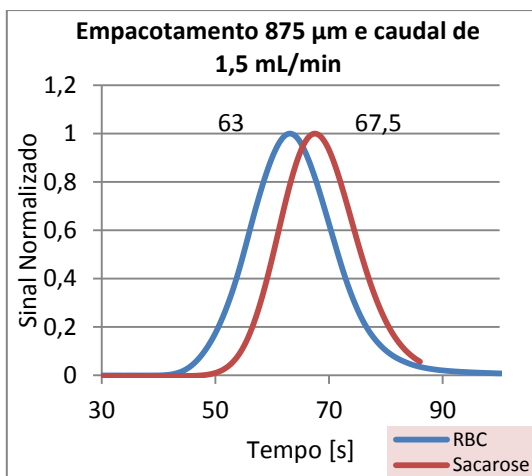


Figura A - 4.5

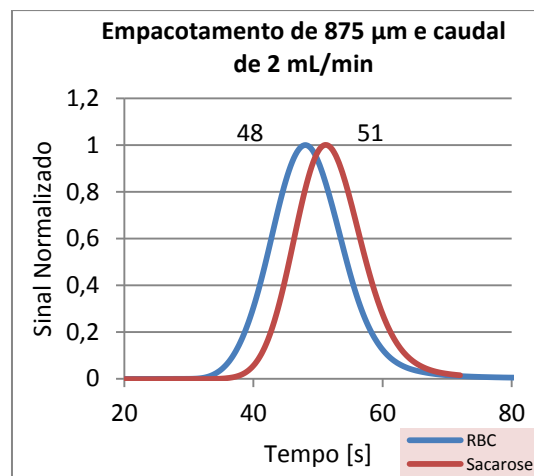


Figura A - 4.6

**Empacotamento de esferas de diâmetro médio = 2000 µm**

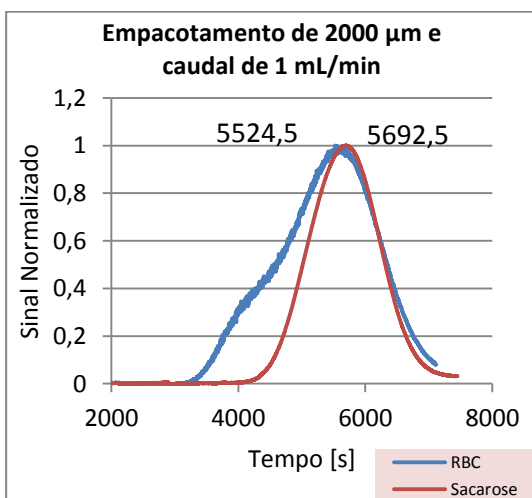


Figura A - 4.5

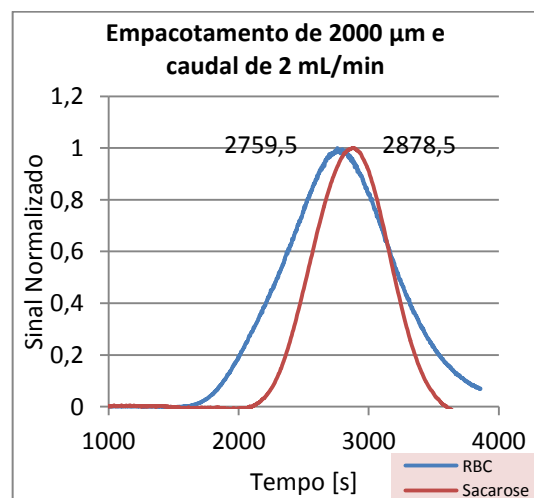


Figura A - 4.6



# APÊNDICE B

## PROCESSAMENTO DOS VÍDEOS DOS MICROCANAIS

Os vídeos obtidos dos escoamentos dos GV's pelos microcanais produzidos, foram tratados através do *software ImageJ*, obtendo assim imagens estáticas resultantes da informação contida em todos os frames do vídeo.

As imagens referidas com A (do lado esquerdo) são as imagens obtidas pela ferramenta *Z-Project*. Enquanto as imagens apontadas pela letra B (do lado direito), são as imagens após o realce de contraste.

### 1. Microcanal com círculos de 600 $\mu\text{m}$ de diâmetro

Caudal a 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ :

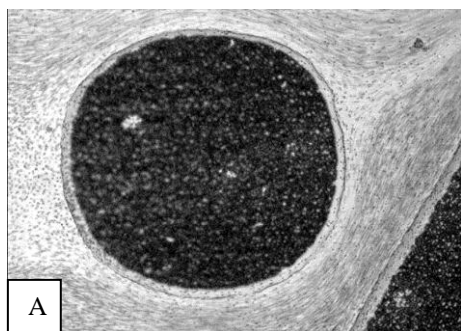


Figura 1.1

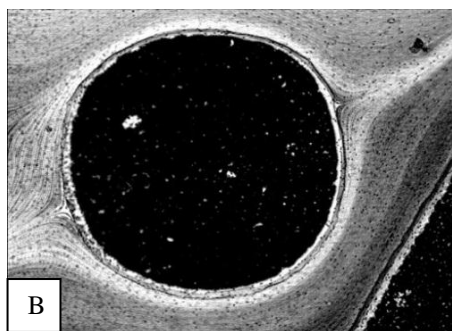


Figura 1.2

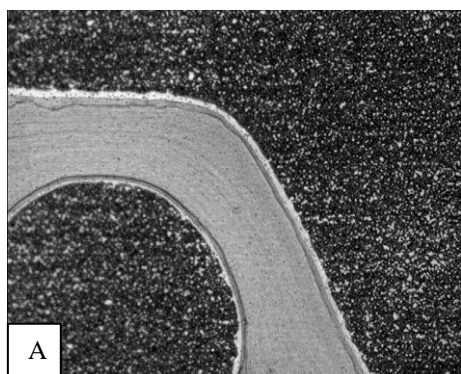


Figura 1.3

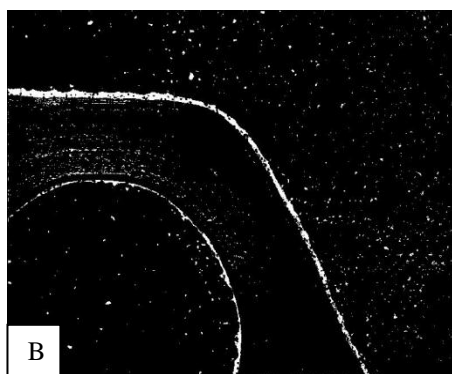


Figura 1.4

**Caudal a 10  $\mu\text{L}/\text{min}$**

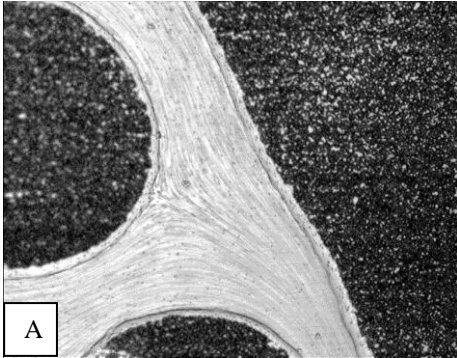


Figura 1.5

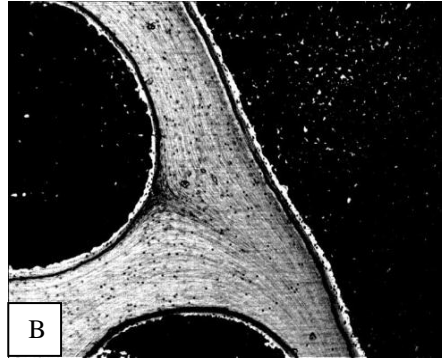


Figura 1.6

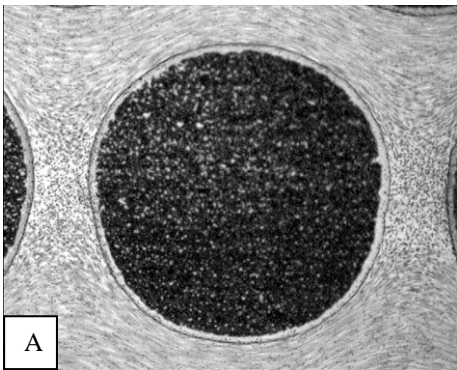


Figura 1.7

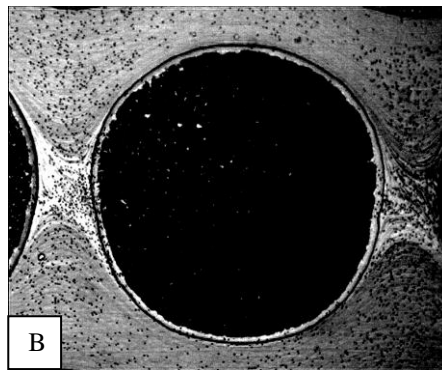


Figura 1.8

**Caudal a 20  $\mu\text{L}/\text{min}$**

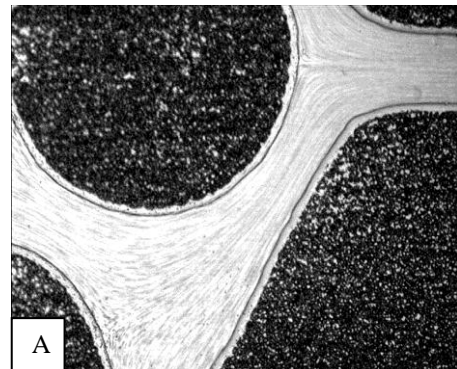


Figura 1.9

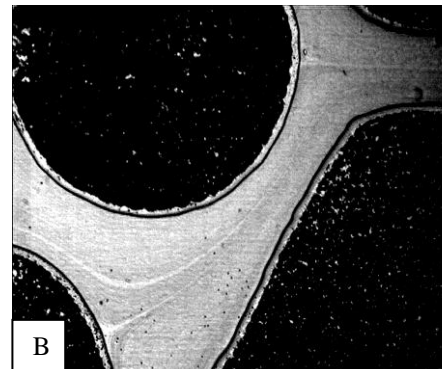


Figura 1.10

## 2. Microcanal com círculos de 800 $\mu\text{m}$ de diâmetro

Caudal a 5  $\mu\text{L}/\text{min}$

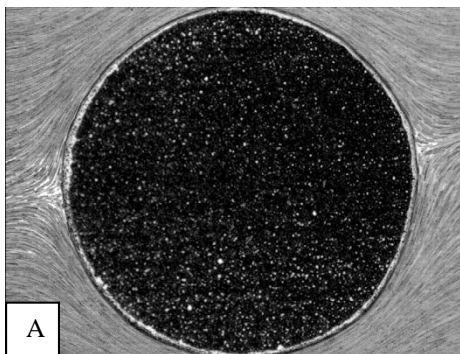


Figura 2.1

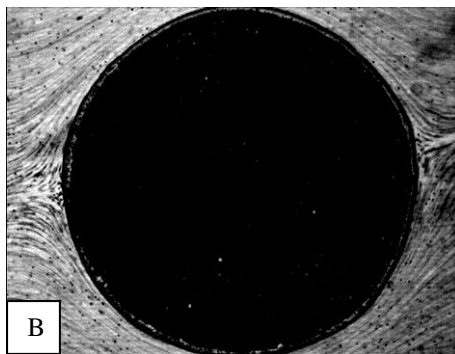


Figura 2.2

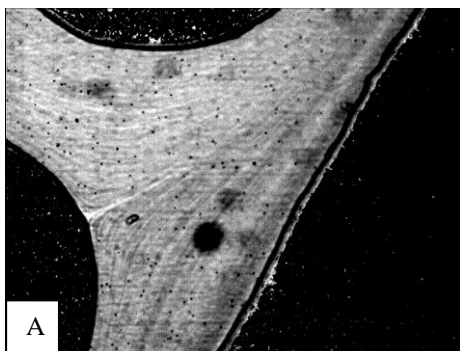


Figura 2.3

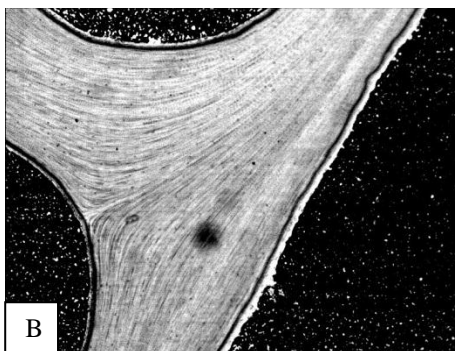


Figura 2.4

Caudal de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$

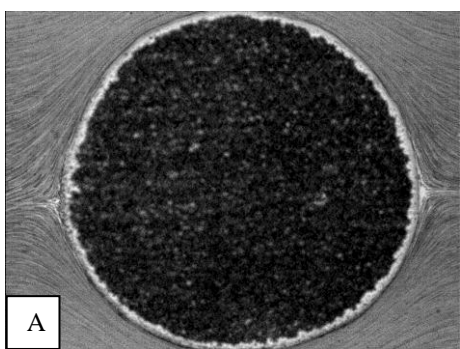


Figura 2.5

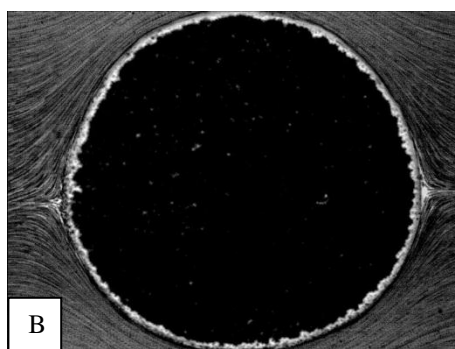


Figura 2.6

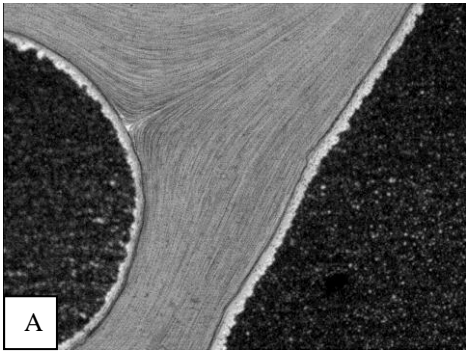


Figura 2.7

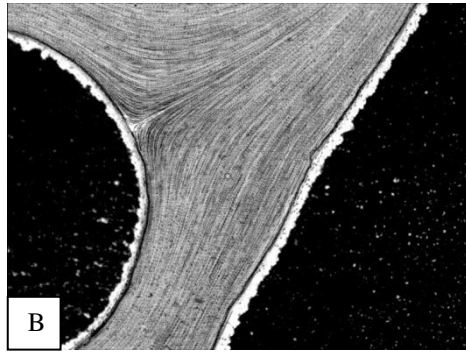


Figura 2.8

**Caudal de 20  $\mu\text{L}/\text{min}$**

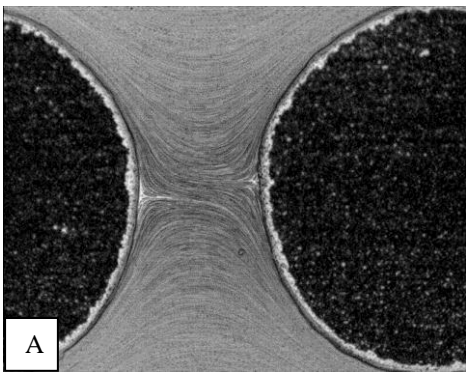


Figura 2.9

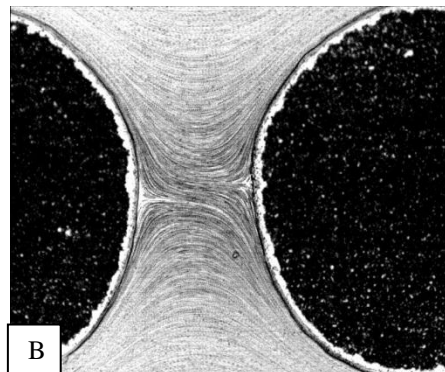


Figura 2.10

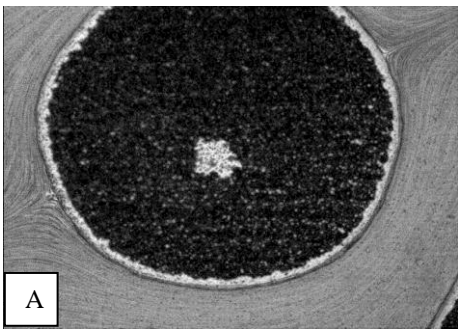


Figura 2.11

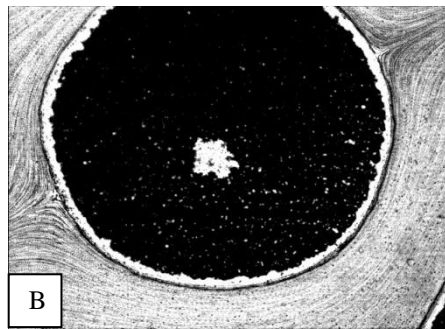


Figura 2.12

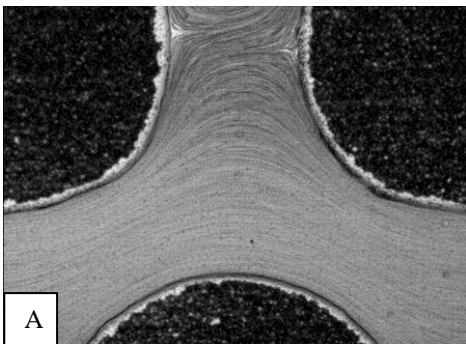


Figura 2.13

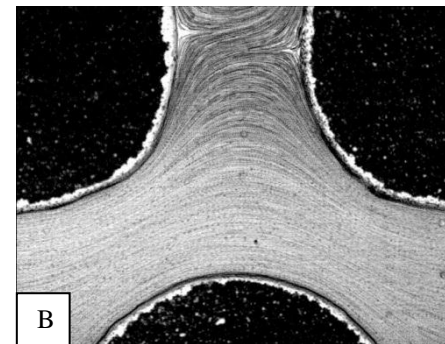


Figura 2.12

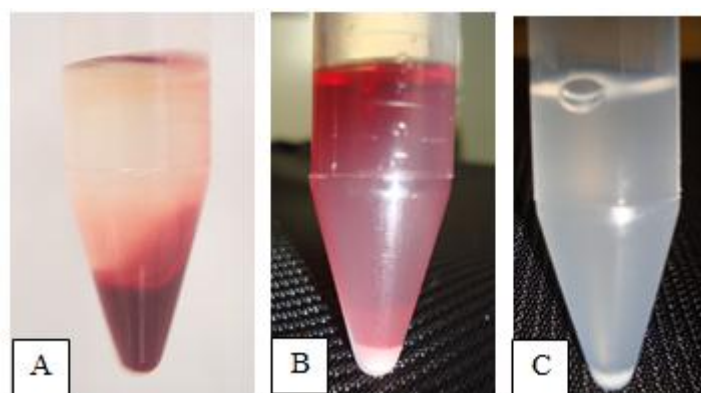
# APÊNDICE C

## SEPARAÇÃO DE GLÓBULOS BRANCOS

Para obter o isolamento de granulócitos utilizou-se o método de *Sigma-Aldrich*, o qual é descrito pela separação dos granulócitos, dos agranulócitos e dos eritrócitos por centrifugação isopícnica, através de duas substâncias de densidades diferentes, nomeadamente o Histopaque 1077 e o Histopaque 1119.

Porém verificou-se que para o caso do sangue ovino, estas substâncias não têm o mesmo efeito, uma vez que o sangue ovino é mais denso do que o sangue humano. Então de forma a contornar a diferença de densidades, optou-se por aplicar outra técnica, a lise celular dos glóbulos vermelhos. Para isso utilizou-se uma substância própria para a lise celular (*Lysis buffer*).

Depois de centrifugar a amostra para retirar a maior parte dos glóbulos vermelhos aplicou-se uma pequena quantidade de *lysis buffer* e centrifugou-se novamente, do que resultou uma pequena quantidade de glóbulos brancos.



Legenda: Separação de glóbulos brancos.

A figura representada pela letra A mostra o resultado obtido pela centrifugação com o Histopaque, verificando-se que não houve a formação de camadas bem distintas. A imagem B representa o resultado obtido utilizando a técnica da solução de lise celular dos glóbulos vermelhos. Esta solução provoca a morte celular dos glóbulos vermelhos, sem afetar os glóbulos brancos. Os resíduos dos glóbulos vermelhos ficam no sobrenadante, daí a cor avermelhada. Para eliminar esses resíduos procedeu-se a duas lavagens dos glóbulos brancos com soro fisiológico, como se pode verificar na Figura C.

Este método, apesar de eliminar os glóbulos vermelhos, não distingue os glóbulos brancos, uma vez que existe uma grande variedade de células brancas com características diferentes. O ideal é utilizar uma substância com densidade diferente dos granulócitos e dos agranulócitos de forma a obter glóbulos brancos da mesma espécie, no caso do sangue ovino essa substância poderá ser a meglumina.