

UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO MÉTODO  
DE ANÁLISES CLÍNICAS EM DISPOSITIVO LAB-ON-A-DISK**

Ana Alexandra Ribeiro Gonçalves

Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas

Biosurfit, Lisboa

Junho, 2010



**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO MÉTODO  
DE ANÁLISES CLÍNICAS EM DISPOSITIVO LAB-ON-A-DISK**

**DEVELOPMENT OF A NEW METHOD OF  
CLINICAL ANALYSIS IN DEVICE LAB-ON-A-DISK**

Dissertação submetida à Universidade da Beira Interior para obtenção do Grau de  
Mestre em Ciências Biomédicas

Orientador: Dr. Nuno Reis, Biosurfit S.A., Lisboa,  
Portugal

Co-Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Cavaco,  
Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal



O conteúdo do presente trabalho é da exclusiva  
responsabilidade da autora

---

(Ana Alexandra Ribeiro Gonçalves)



## Agradecimentos

---

Este trabalho é o culminar de todo um processo no meu percurso académico, que não teria sido possível sem o apoio da equipa de trabalho da Biosurfit S.A., durante o período de realização da dissertação, em contexto empresarial.

O meu profundo agradecimento e reconhecimento a todos aqueles que tornaram possível este trabalho, por me terem proporcionado uma vasta e rica experiência a nível profissional e pessoal, que em muito contribuiu para o meu processo de formação, aprendizagem e enriquecimento.

Agradeço ao Doutor Nuno Reis, ao Doutor João Fonseca e ao Doutor Ricardo Cabeça e restantes elementos da equipa da Biosurfit S.A., pela transmissão de conhecimentos, pela disponibilidade, pelo incentivo, pela abertura e confiança que sempre demonstraram, onde desde o primeiro momento me senti integrada como mais um elemento de uma equipa inovadora e empreendedora.

Ao Professor Doutor José Eduardo Cavaco, meu Co-Orientador de Mestrado na UBI, Covilhã, por todo o apoio e suporte institucional.



## Resumo

---

O resultado do trabalho apresentado foi realizado na Biosurfit S.A. e tem como principal objectivo o desenvolvimento de uma nova plataforma centrífuga de microfluidos de testes de diagnóstico junto do paciente ("Point-of-Care Testing"). Esta dissertação descreve a concepção, prototipagem e teste de um micro dispositivo para aplicação em análises clínicas. Permite medir dois parâmetros hematológicos, a velocidade de sedimentação eritrocitária e o hematócrito, em plataforma centrífuga de microfluidos (tecnologia "Lab-on-a-disk"). Pretende-se que o dispositivo funcione de forma análoga aos processos de medição utilizados nos laboratórios de análises clínicas, permitindo um resultado fidedigno, num curto espaço de tempo. O dispositivo consiste num disco que roda de forma controlada, permitindo acelerar os processos associados à sedimentação das células, devido ao campo centrífugo criado no disco. O teste utiliza uma amostra de sangue capilar com volume aproximado de 2 microlitros e o resultado do teste deve ser obtido em menos de 10 minutos. A estrutura microfluídica para determinação da velocidade de sedimentação eritrocitária e do hematócrito é constituída por um reservatório de entrada, onde é colocada a amostra de sangue, um reservatório principal, onde é efectuada a medição, e um reservatório para a saída do ar. O disco e as estruturas microfluídicas nele gravadas foram prototipados com recurso a materiais poliméricos de baixo custo, de modo a que o teste possa ser descartável e comercialmente competitivo. O dispositivo permite que os constituintes celulares se separem do plasma, devido à presença de um campo gravítico artificial gerado pela centrifugação, uma vez que estes possuem uma densidade superior à do plasma. É feito um estudo comparativo dos resultados obtidos em disco, com os resultados obtidos através da técnica convencional, de forma a estabelecer a correlação existente entre os mesmos. São ainda comparados os resultados da velocidade de sedimentação eritrocitária e do hematócrito obtidos para amostras de sangue venoso com anticoagulante ( $K_3EDTA$ ) e para amostras de sangue capilar total. Os resultados obtidos para os dois tipos de amostra revelaram uma satisfatória correlação linear:  $R^2=0.87$  para a velocidade de sedimentação eritrocitária e  $R^2=0.85$  para o hematócrito. Os resultados experimentais obtidos em disco para a velocidade de sedimentação e hematócrito foram satisfatórios relativamente ao método de referência,  $R^2=0.87$  e  $R^2=0.94$ , respectivamente. No entanto, para validação do método é necessário executar mais testes, com valores de velocidade de sedimentação eritrocitária e de hematócrito mais abrangentes, incluindo valores que estejam fora dos limites normais, incluindo indivíduos com diferentes patologias.

**Palavras-Chave:** amostra de sangue, centrifugação, disco, hematócrito, "Lab-on-a-disk", micro dispositivo, microfluidos, velocidade de sedimentação eritrocitária.



# Abstract

---

The work presented here was developed in Biosurfit and aims to develop a new centrifugal micro fluidic point-of-care platform for medical diagnostic. This thesis describes the concept, prototyping and characterization of a micro device for application in clinical analysis. Allows to measure two hematological parameters, the erythrocyte sedimentation rate and hematocrit, in centrifugal micro fluidic platform technology (Lab-on-a-disk). It is intended that the device works similarly to the measurement procedures used in clinical laboratories, allowing a reliable result in a short space of time. The device consists of a disk that rotates in a controlled manner, allowing accelerate the processes associated with sedimentation of the cells, due to the centrifugal field created on disk. The test uses a sample of capillary blood volume of approximately 2 microliters and the test result should be obtained in less than 10 minutes. The micro fluidic structure for determining the erythrocyte sedimentation rate and hematocrit consists of a reservoir of entry, which are placed a blood sample, a main reservoir, where the measurement is made, and a reservoir for the air outlet. The disk and microfluidic structures were prototyped using polymeric materials of low cost, so that the test can be disposable and commercially competitive. The device enables cellular constituents to separate the plasma, due to the presence of an artificial gravity field generated by the centrifuge, since they possess a density greater than that of plasma. It is done a comparative study of the results on disk with the results obtained using the conventional technique, in order to establish the correlation between them. Are also compared the results of the erythrocyte sedimentation rate and hematocrit obtained for samples of venous blood with anticoagulant ( $K_3EDTA$ ) and capillary whole blood samples. The results for both types of samples showed a satisfactory linear correlation:  $R^2=0.87$  for erythrocyte sedimentation rate and  $R^2=0.85$  for hematocrit. The experimental results obtained on disk for the sedimentation rate and hematocrit were satisfactory for the reference method,  $R^2=0.87$  and  $R^2=0.94$ , respectively. However, to validate the method it is necessary make more tests, with values of erythrocyte sedimentation rate and hematocrit more comprehensive, including values outside normal limits, including individuals with different pathologies.

**Keywords:** blood sample, disk, erythrocyte sedimentation rate, hematocrit, Lab-on-a-disk, micro device, micro fluidics, spin.



## Lista de Abreviaturas

---

CAD	Computer-Aided Design
CNC	Computer numerically controlled
DFR	Dry Film Resist
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Htc	Hematócrito
ICSH	International Council for Standardization in Haematology
LOC	Lab-on-a-Chip”
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PC	Policarbonato
PCR	Reacção em cadeia da polimerase
PMMA	Polimetil-metacrilato
RBC	Red blood cell
RPM	Rotações por minuto
UV	Ultra-violeta
VSE	Velocidade de Sedimentação Eritrocitária
ZSR	Zeta Sedimentation Ratio



## Lista de Figuras

---

- Figura 2.1. Instrumento de LabCD e disco descartável (adaptado de [4]). .....5
- Figura 2.2. Princípios básicos de microfluidos em plataforma centrífuga. Um corpo de massa  $m\omega$  roda com uma frequência angular  $\omega$ , a um raio  $r$ , e está sujeito a uma força centrífuga  $F\omega$  e a uma força de coriolis  $F_c$ . .....5
- Figura 2.3. Ilustração esquemática de um disco microfluidico. Estão representados dois reservatórios conectados por uma câmara microfluidica (adaptado de [4]). ....6
- Figura 2.4. Ilustração esquemática de válvulas usadas em plataformas centrífugas. a) Válvula capilar, obtida por uma súbita expansão no diâmetro do canal, b) Válvula hidrofóbica, c) Válvula com sifão (adaptado de [2]). .....8
- Figura 2.5. Reservatório para medição de volumes constituído por um canal de escoamento do excesso do líquido numa posição radial mais interna do disco ( $r <$ ), e por uma válvula que bloqueia o canal de saída. Enquanto a válvula estiver a bloquear o canal de saída em  $r >$ , o canal é fechado e o excesso do líquido transborda através do canal de escoamento de resíduos. Após a superfície do líquido baixar até  $r <$ , a válvula é aberta e é definido o volume ( $\Delta r = r > -r <$ ). Pode-se utilizar uma válvula hidrofóbica (Figura 2.4.b) ou baseada num canal de sifão hidrofílico (Figura 2.4.c) (adaptado de [6]). .....8
- Figura 2.6. Esquema ilustrativo do fluxo de uma estrutura de decantação para a separação do plasma do sangue total. A amostra de sangue flui da câmara de medição através do canal de drenagem para a câmara de decantação, onde é feita a separação final. Na câmara de decantação o plasma purificado transborda para um reservatório de separação, enquanto o pellet celular continua no fundo da câmara de decantação (adaptado de [10]). ..... 10
- Figura 2.7. Determinação do hematócrito em plataforma centrífuga. (a) Após a sedimentação, o hematócrito pode ser determinado através da leitura do resultado na escala impressa ao longo do canal. (b) Este teste pode ser executado numa drive de CD-ROM standard. .... 10
- Figura 2.8. Eritrócitos saudáveis com forma discóide. A vista lateral mostra que os eritrócitos têm uma forma bicôncava discóide. A vista superior mostra que os eritrócitos são circulares. .... 11

- Figura 2.9. Sedimentação dos constituintes celulares do sangue acelerada por centrifugação. O processo termina quando a interface entre o plasma e as células, que são principalmente eritrócitos (RBC), já não avança mais e atinge o hematócrito. .... 12
- Figura 2.10. (a) Representação esquemática da agregação de proteínas (cargas positivas) ao eritrócito (carga negativa). O potencial zeta presente na dupla camada eléctrica determina a intensidade da repulsão electrostática entre eritrócitos. (b) Ilustração de eritrócitos e agregados de eritrócitos (rouleaux). 14
- Figura 2.11. Esboço de uma curva típica de VSE em função do tempo. A reacção pode ser dividida em três fases: 1) Agregação, 2) Sedimentação, 3) Empacotamento..... 16
- Figura 2.12. Tubo capilar utilizado no teste do microhematócrito. É possível distinguir três fases na coluna: plasma, glóbulos brancos e plaquetas, eritrócitos. Exemplo da leitura do valor de hematócrito (45%)...... 23
- Figura 3.1. Esquema de descrição do processo de fotolitografia de DFR. .... 28
- Figura 3.2. (a) Disco microfluídico com as estruturas de medição da VSE e do Htc. O disco possui 12 estruturas dispostas radialmente. O disco está sujeito a um movimento rotacional com uma certa frequência de rotação  $\omega(t)$  e sob a acção da força centrífuga ( $F\omega$ ). (b) A estrutura microfluídica é composta por um reservatório de entrada do sangue, um canal de medição e um reservatório de saída de ar..... 30
- Figura 3.3. Equipamento utilizado para o teste. (A) Câmara (lente com zoom), (B) Iluminação, (C) Motor, (D) Disco protótipo. .... 32
- Figura 3.4. Protocolo de rotação utilizado para medir a VSE e o Htc. (1) O disco é posto a rodar a 60 Hz para que o sangue passe do reservatório de entrada para o canal principal da estrutura onde vai ser medida a VSE e o Htc. (2) Medição da VSE a uma frequência de 20 Hz. (3) Após a medição da VSE, o disco é posto a rodar a uma frequência de 100 Hz para a medição do Htc. .... 33
- Figura 3.5. Fotografias dos diferentes passos do procedimento experimental para a medição da VSE e do Htc. A sedimentação está sob a acção da força centrífuga ( $F\omega$ ). 1) A amostra de sangue de 2  $\mu\text{L}$  é carregada para o reservatório de entrada da estrutura. 2) O disco roda a uma frequência de 60 Hz para a amostra passar para o canal onde vai ser efectuada a medição da VSE e do Htc. 3) Sedimentação das células no plasma a uma frequência de 20 Hz. 4) Após a sedimentação, o Htc pode ser determinado. .... 35
- Figura 3.6. Fotografia do canal de medição da VSE e do Htc após a sedimentação das células. Pode-se observar o menisco do plasma, a interface entre o plasma e

- os eritrócitos e o fundo do canal. Nesta fase a interface do plasma com as células está estabilizada, sendo atingido o estado de compactação máximo. O Htc pode ser determinado (exemplo:  $6.131 / 15.875 \rightarrow Htc = 38.6\%$ ). .....36
- Figura 4.1. a) Ilustração do perfil da curva típica (padrão) do processo de sedimentação. As regiões representadas correspondem: I – início do processo de sedimentação (agregação); II – sedimentação; III – fim do processo de sedimentação (compactação). b) Exemplo de uma curva de sedimentação obtida nas experiências. A curva foi construída a partir de várias posições da interface dos eritrócitos com o plasma durante a centrifugação da amostra de sangue ao longo do tempo.....38
- Figura 4.2. Comparação entre a curva de sedimentação experimental e a ajustada. A curva de sedimentação é ajustada correctamente a partir da equação 4.1, como se pode observar pelo elevado coeficiente de correlação ( $R^2 = 0.99945$ ). .....39
- Figura 4.3. Curva de velocidade de sedimentação calculada (em milímetros por hora) ao longo do tempo (em segundos). É obtida a partir da derivada da função de ajuste da curva de sedimentação corrigida para o número de G's de cada posição radial da interface dos eritrócitos com o plasma ao longo do tempo.40
- Figura 4.4. a) Reservatório com saliências nas paredes das estruturas. b) Fotografia de uma estrutura maquinada por ablação a laser. Após a centrifugação do sangue é visível que bastantes células não sedimentam, ficando no meio do plasma agarradas à superfície das paredes e do fundo do reservatório. ....41
- Figura 4.5. (a) Fotografia da estrutura feita em DFR cortado na plotter de corte. (b) Fotografia da estrutura feita em fotolitografia com uma máscara de alta resolução.....42
- Figura 4.6. Comparação entre as curvas de sedimentação obtidas por fotolitografia e por DFR cortado na plotter de corte. A sedimentação é mais rápida em fotolitografia do que na plotter de corte. O erro entre os vários ensaios realizados para a fotolitografia é superior ao erro da plotter de corte.....43
- Figura 4.7. Curvas de sedimentação para várias frequências (40, 50, 60 e 70 Hz) e para várias profundidades (100, 150, 200, 300  $\mu\text{m}$ ). .....46
- Figura 4.8. Médias das curvas de sedimentação a diferentes profundidades para obtenção de quatro curvas respeitantes a quatro frequências de rotação (40, 50, 60 e 70 Hz).....46
- Figura 4.9. Disco microfluídico com várias estruturas para medição da VSE e do Htc em seis posições radiais diferentes ( $r = 25$ ;  $r = 27,5$ ;  $r = 30$ ;  $r = 32,5$ ;  $r = 35$ ;  $r = 37,5$ )......47

- Figura 4.10. a) Curvas do hematócrito em função do tempo para várias posições radiais no disco. b) Gráfico com os valores de hematócrito final calculados ao fim de 300 segundos em função da posição radial média ( $r_{med}$ ) da coluna de eritrócitos. .... 48
- Figura 4.11. Exemplo de uma curva de sedimentação (quadrados a preto) de sangue venoso obtida através do método em disco. Na curva é determinado o valor do declive (linha vermelha) da zona linear da curva. .... 51
- Figura 4.12. Curva de calibração entre o método de VSE em disco e o método de referência para 11 amostras de sangue venoso ..... 52
- Figura 4.13. Exemplo de uma curva de velocidade de sedimentação de sangue venoso obtida através do método em disco. É determinado o valor do declive da zona linear antes do valor máximo de velocidade. A zona escolhida para todas as curvas foi entre o primeiro ponto de cada curva e os 25 segundos. .... 53
- Figura 4.14. Curva de calibração entre o método de VSE em disco e o método de referência, em sangue venoso para 11 amostras. O valor da VSE para o método em disco foi determinado a partir do declive antes do valor da velocidade máxima da curva de velocidade de sedimentação..... 53
- Figura 4.15. Exemplo de uma curva de velocidade de sedimentação onde é determinado o valor do declive da zona linear depois do valor máximo de velocidade. A zona escolhida para todas as curvas foi entre os 62,5 e os 100 segundos. .. 54
- Figura 4.16. Curva de calibração entre o método de VSE em disco e o método de referência, em sangue venoso para 11 amostras. O valor da VSE para o método em disco foi determinado a partir do declive da velocidade máxima da curva de velocidade de sedimentação. .... 54
- Figura 4.17. Exemplo de uma curva de velocidade de sedimentação onde é determinado o valor máximo de velocidade. .... 55
- Figura 4.18. Curva de calibração entre o método de VSE em disco e o método de referência, em sangue venoso para 11 amostras. O valor da VSE para o método em disco foi determinado a partir do valor de velocidade máxima da curva de velocidade de sedimentação. .... 55
- Figura 4.19. Curva de calibração entre o método de VSE em disco e o método de referência, em sangue venoso para 11 amostras. O valor da VSE para o método em disco foi determinado a partir do valor máximo da curva de velocidade de sedimentação e do hematócrito. .... 57
- Figura 4.20. Curva de calibração dos resultados experimentais da medição do hematócrito em disco com o método de referência. Estas experiências seguiram o protocolo de rotação de uma frequência de 100Hz, como mostra a

---

Figura 3.4. A boa linearidade do $R^2=0.94$ permitiu efectuar medições com precisão. As barras de erro verticais representam o desvio padrão existente entre os triplicados medidos em disco para cada amostra. ....	58
Figura 4.21. Curvas de sedimentação para sangue venoso com anticoagulante ( $K_3EDTA$ ) e para sangue capilar total, para a mesma amostra de sangue. ....	59
Figura 4.22. Curva de calibração entre os valores de VSE para sangue capilar e para sangue venoso com anticoagulante ( $K_3EDTA$ ) para o método em disco. ....	60
Figura 4.23. Curva de calibração para as medições de Htc obtidas em sangue capilar e em sangue venoso para o método em disco. As barras de erro verticais representam os desvios padrões dos triplicados para cada amostra sangue capilar, e as barras de erro horizontais representam os desvios padrões para sangue venoso. ....	60



## Lista de Tabelas

---

Tabela 2.1. Constituição do sangue e suas fracções volúmicas.....	11
Tabela 2.2. Factores que podem afectar a Velocidade de Sedimentação Eritrocitária (VSE).....	15
Tabela 2.3. Intervalos de referência da VSE para o método de Westergren em adultos saudáveis (adaptado de [24]).....	19
Tabela 2.4. Valores de referência para o teste do hematócrito [33].....	23
Tabela 4.1. Valores das variáveis obtidas através do ajuste feito à curva de sedimentação.....	39
Tabela 4.2. Média e erro (em %) dos valores de hematócrito para os vários ensaios realizados em fotolitografia e em DFR cortado na plotter. Estes ensaios são feitos para a mesma amostra de sangue.....	43
Tabela 4.3. Comparação entre as técnicas de prototipagem da Fotolitografia e do DFR cortado na Plotter de Corte.....	44
Tabela 4.4. Valores médios de hematócrito e desvio padrão para cada uma das posições radiais.....	49
Tabela 4.5. Diferentes correlações testadas e respectivos valores de coeficientes de correlação ( $R^2$ ).....	56
Tabela 4.6. Comparação dos resultados de medição de hematócrito para sangue venoso com anticoagulante, obtidos em disco e através do método de referência. A última coluna representa o desvio padrão entre o Htc em disco e de referência.....	58
Tabela 4.7. Comparação entre os resultados de Htc das 11 amostras entre sangue capilar e venoso.....	61
Tabela 5.1. Esta tabela mostra a altura de sedimentação dos eritrócitos na estrutura até atingirem o ponto de inflexão ( $h_{pi}$ ), ou seja ponto de velocidade máxima, normalizada para a altura inicial da amostra ( $h_{pi}/h_0$ ); o tempo que as células demoraram a atingir esse ponto, bem como a velocidade nesse ponto.....	66
Tabela 5.2. Tabela de novos métodos e inovações desenvolvidos para medição da VSE.....	68



Lista de Abreviaturas .....	XIII
Lista de Figuras .....	XV
Lista de Tabelas .....	XXI
<b>1 Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 Enquadramento do trabalho.....	1
1.2 Motivação e objectivos .....	1
1.3 Organização da dissertação.....	2
<b>2 Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>3</b>
2.1 Microfluídica .....	3
2.1.1 Microfluidos: “Lab-on-a-chip” .....	3
2.1.2 Microfluidos em plataforma centrífuga (“Lab-on-a-disk”) .....	4
2.1.3 Princípios de microfluidos em plataforma centrífuga .....	5
2.1.4 Aplicações em “Lab-on-a-disk” .....	9
2.2 Amostra: Sangue Total.....	11
2.3 Velocidade de Sedimentação Eritrocitária .....	13
2.3.1 Princípio do teste e factores envolvidos.....	13
2.3.2 Relevância clínica .....	17
2.3.3 Valores de referência .....	19
2.3.4 Estado da Arte .....	19
2.4 Hematócrito .....	22
2.4.1 Relevância clínica .....	22
2.4.2 Método de determinação .....	23
2.4.3 Valores de referência .....	23
<b>3 Materiais e Métodos .....</b>	<b>25</b>
3.1 Técnicas de Prototipagem.....	25
3.1.1 Ablação a Laser .....	26
3.1.2 Fotolitografia .....	27
3.1.3 Dry film cortado na plotter de corte .....	29
3.2 Desenho CAD do disco e estrutura microfluídica.....	30
3.3 Equipamento e componentes.....	32
3.4 Procedimento experimental.....	33

---

3.5	Método de medição .....	35
<b>4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>37</b>
4.1	Caracterização da curva de sedimentação.....	37
4.2	Experiências preliminares.....	41
4.2.1	Comparação entre as técnicas de prototipagem .....	41
4.2.2	Comparação entre diferentes profundidades e frequências de rotação.....	45
4.2.3	Influência da força centrífuga no hematócrito.....	47
4.3	Determinação da Velocidade de Sedimentação Eritrocitária e do Hematócrito .	50
4.3.1	Determinação da velocidade de sedimentação eritrocitária .....	51
4.3.2	Determinação do hematócrito.....	57
4.3.3	Comparação entre sangue venoso (com K <sub>3</sub> EDTA) e sangue capilar.....	59
<b>5</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>63</b>
5.1	Comparação da velocidade de sedimentação eritrocitária entre o método em disco e método convencional .....	63
5.2	Comparação do hematócrito entre o método em disco e método convencional	66
5.3	Comparação entre sangue venoso e sangue capilar .....	67
5.4	Inovações e método em disco .....	68
<b>6</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>69</b>
6.1	Conclusões .....	69
6.2	Trabalho futuro.....	70
	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>73</b>

**Anexos**

# 1

## Introdução

---

### 1.1 Enquadramento do trabalho

O trabalho aqui apresentado foi realizado na Biosurfit e teve a duração de 12 meses. A Biosurfit desenvolveu uma nova plataforma centrífuga de microfluidos para testes de diagnóstico junto do paciente (“Point-of-Care Testing”), que presentemente se encontra na fase de implementação do processo de produção.

O trabalho de estágio enquadra-se num plano de desenvolvimento tecnológico de um micro dispositivo para realização de novos testes clínicos, contemplando as fases de projecto, prototipagem e caracterização funcional desse dispositivo. No âmbito deste estágio, deu-se ênfase à determinação de parâmetros hematológicos como a velocidade de sedimentação eritrocitária (VSE) e hematócrito (Htc) em plataforma centrífuga de microfluidos (tecnologia “Lab-on-a-disk”).

### 1.2 Motivação e objectivos

Este trabalho contribui para a área de diagnósticos clínicos, através do desenvolvimento e fabrico de um micro dispositivo. Pretende-se construir uma plataforma centrífuga de microfluidos que determine a VSE e o Htc, que funcione de forma análoga aos processos de medição utilizados nos laboratórios de análises clínicas, que tenha um desempenho preciso e fiável e cujo custo, quando produzido em massa, seja competitivo. O teste utiliza uma amostra de sangue total de volume reduzido (aproximadamente 2 microlitros) e o resultado deve ser obtido em menos de 10 minutos.

O dispositivo consiste num disco polimérico com 60 mm de raio (dimensões equivalentes aos CD/DVD), cuja velocidade de rotação é controlada de modo a criar um campo centrífugo que permita acelerar os processos inerentes à sedimentação das células sanguíneas no plasma.

Após a determinação da VSE e do Htc em disco, pretende-se fazer o estudo comparativo dos resultados obtidos com as técnicas convencionais, de forma a estabelecer a correlação existente entre os mesmos e validar a prova de conceito proposta neste trabalho.

### **1.3 Organização da dissertação**

Este capítulo inclui o enquadramento do estágio e estabelece a motivação e objectivo deste projecto.

O capítulo 2 apresenta a fundamentação teórica sobre plataformas centrífugas de microfluidos. Além disso, contém uma breve descrição da composição do sangue e apresenta uma panorâmica geral sobre os parâmetros hematológicos da VSE e do Htc, sua relevância clínica e revisão de testes realizados em laboratório.

O capítulo 3 descreve os materiais e processos utilizados para prototipagem do dispositivo, projecto (CAD) da estrutura microfluídica, equipamento utilizado para realização do teste e o procedimento experimental.

O capítulo 4 refere os resultados experimentais obtidos ao longo do trabalho. Essas experiências incluem alguns testes preliminares tais como, comparação das técnicas de prototipagem, influência da geometria da estrutura microfluídica e protocolo de rotação nos resultados. As experiências finais incluem a determinação da VSE e do Htc em sangue capilar e em sangue venoso, bem como a comparação dos resultados em disco com uma técnica estabelecida num laboratório de análises clínicas.

No capítulo 5 são discutidos os resultados experimentais à luz da bibliografia apresentada, com o objectivo de validar a fiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

No capítulo 6 são enunciadas as conclusões finais do trabalho, cruzando toda a aprendizagem feita com as expectativas iniciais do estágio e enumerando qual o trabalho futuro que deve ser empreendido, para que a técnica proposta possa ser validada como um método alternativo na medição da VSE e Htc.

# 2

## Revisão Bibliográfica

---

Neste capítulo irão ser abordados vários conceitos, tais como o campo das análises clínicas e biológicas em sistemas miniaturizados (tecnologia “Lab-on-a-chip”) e sistemas microfluídicos em plataformas centrífugas (tecnologia “Lab-on-a-disk”). Também será apresentada uma breve descrição de exames e aplicações na área “Lab-on-a-disk”. Seguidamente, irão ser descritos os parâmetros hematológicos velocidade de sedimentação eritrocitária (VSE) e hematócrito (Htc). Estes parâmetros são determinados em laboratórios de análises clínicas e neste trabalho pretende-se que sejam implementados em plataforma centrífuga de microfluidos.

### 2.1 Microfluídica

A microfluídica é uma área de investigação que abrange o estudo do comportamento e manipulação do fluxo de pequenos volumes de líquidos (de fL a mL) em canais à escala micro (1-1000  $\mu\text{m}$ ).

#### 2.1.1 Microfluidos: “Lab-on-a-chip”

Durante as últimas décadas a área das análises químicas e biológicas tem vindo a sofrer um processo da miniaturização. Esses sistemas miniaturizados são referidos como dispositivos “Lab-on-a-chip” (LOC). Os benefícios associados à miniaturização de técnicas bioanalíticas incluem a redução do tamanho dos equipamentos, uma análise rápida do resultado, redução dos custos, operações em paralelo para múltiplas análises e a possibilidade dos dispositivos serem portáteis.

De igual forma, as tecnologias microfluídicas LOC sofreram um grande progresso nos últimos quinze anos. Este campo iniciou-se a partir de separações analíticas e técnicas de detecção, principalmente a partir de separação cromatográfica [1] e

electroforese capilar [1], bem como sensores bioquímicos miniaturizados, incluindo detecção electroquímica ou de fluorescência [1]. No entanto, para o sucesso da comercialização dos sistemas LOC, para além da miniaturização, é fundamental uma integração completa, automatização e processamento em paralelo de vários líquidos. A microfluídica é uma tecnologia central neste domínio, uma vez que um dos seus principais objectivos é a implementação e integração de componentes fluídicos de manipulação, como a aplicação de bombas, válvulas e elementos de mistura de amostras. No campo da microfluídica, os benefícios incluem reduzir o tamanho do equipamento, minimizar o tempo de análise de teste, minimizar o consumo do volume de amostra e reagentes necessários para o teste, implementação e integração de componentes fluídicos de manipulação, beneficiando o comportamento hidrodinâmico decorrente do fluxo de fluidos à micro escala. [1], [2]

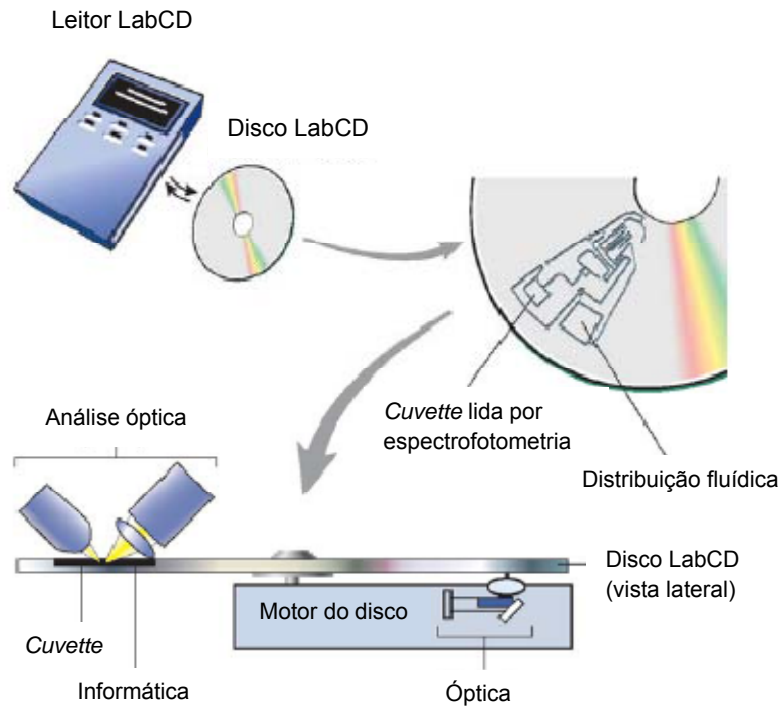
### **2.1.2 Microfluidos em plataforma centrífuga (“Lab-on-a-disk”)**

Na área da microfluídica, a microfabricação de estruturas microfluídicas em discos constitui um tipo de sistemas LOC, denominado de plataformas “Lab-on-a-disk”, introduzidas pela primeira vez em 1998 pelo grupo de Madou [3], [4]. Este tipo de plataformas é desenhado com geometria radial e utiliza sistemas de rotação que criam um campo centrífugo dentro do disco em movimento para a manipulação controlada de líquidos. Devido ao movimento rotacional do disco em torno do seu eixo central, o líquido passa sequencialmente pelas estruturas microfluídicas dos raios mais internos (junto ao eixo de rotação) para os raios mais externos, fazendo com que processos fluídicos ocorram, como a sedimentação do sangue [5], a medição e a mistura da amostra, entre outros. Este tipo de mecanismo de bombeamento traz algumas vantagens em relação aos sistemas de bombas tradicionais. Exemplos disso são as bombas mecânicas, difíceis de integrar em sistemas microfluídicos, e bombas electro-osmóticas, que dependem das propriedades químicas dos líquidos.

As plataformas “Lab-on-a-disk” possuem um grande potencial para um processo de integração do manuseamento de líquidos e detecção de ensaios de diagnóstico miniaturizados, e do ponto de vista comercial já existem produtos disponíveis em empresas como a *Gyros*, a *Tecan* [4] e a *Abaxis* [2].

A Figura 2.1 ilustra um instrumento LabCD e o respectivo disco descartável [4]. Ao utilizar microfluídica de base centrífuga, o bombeamento fornece taxas de fluxo que variam desde 10 nL/s até mais de 100 µL/s, dependendo da geometria do disco, da taxa

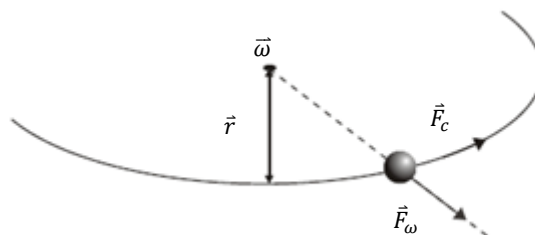
rotacional (RPM) e das propriedades dos fluidos (como por exemplo: densidade, viscosidade, capilaridade). Toda a gama de funções fluídicas, incluindo o valvulamento, decantação, calibração, mistura, medição, fraccionamento de amostras e separação, pode ser implementada nesta plataforma. A medição analítica pode ser electroquímica, fluorescente ou baseada em técnicas de absorção.



**Figura 2.1.** Instrumento de LabCD e disco descartável (adaptado de [4]).

### 2.1.3 Princípios de microfluidos em plataforma centrífuga

A propulsão de líquidos é alcançada através da força centrífuga. A principal vantagem de uma plataforma centrífuga é a evolução da força centrífuga, devido à inércia das massas se deslocarem numa trajetória circular (Figura 2.2).



**Figura 2.2.** Princípios básicos de microfluidos em plataforma centrífuga. Um corpo de massa  $m_\omega$  roda com uma frequência angular  $\bar{\omega}$ , a um raio  $\bar{r}$ , e está sujeito a uma força centrífuga  $\vec{F}_c$  e a uma força de Coriolis  $\vec{F}_\omega$ .

Um fluido de densidade de massa  $\rho$  num sistema em rotação operado à frequência angular  $\bar{\omega}$ , à distância  $r$  do eixo central de rotação, está sujeito a uma força centrífuga,

$$F_{\omega} = \rho r \omega^2 \quad (2.1)$$

e a uma força de *Coriolis*

$$F_c = 2\rho\omega v \quad (2.2)$$

onde  $v$  representa a velocidade do fluido.

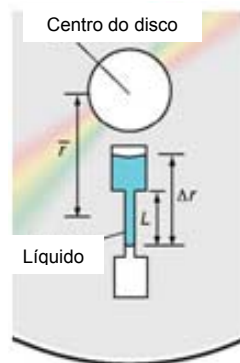
A intensidade destas forças pode ser directamente controlada pela frequência de rotação,

$$\omega = 2\pi\nu \quad (2.3)$$

A velocidade média de um líquido  $\bar{v}$ , segundo a teoria centrífuga é dada por:

$$U = D_h^2 \rho \omega^2 \bar{r} \Delta r / 32 \mu L \quad (2.4)$$

onde  $D_h$  é o diâmetro hidráulico do canal (definido por  $4A/P$ , onde  $A$  é a área de secção da recta e  $P$  é o perímetro molhado do canal),  $\rho$  é a densidade do liquido,  $\omega$  é a velocidade angular do disco,  $\bar{r}$  é a distância média do líquido nos canais ao centro do disco,  $\Delta r$  é a extensão radial do fluido,  $\mu$  é a viscosidade da solução e  $L$  é o comprimento do liquido no canal capilar (Figura 2.3).



**Figura 2.3.** Ilustração esquemática de um disco microfluídico. Estão representados dois reservatórios conectados por uma câmara microfluídica (adaptado de [4]).

Para a implementação integrada e automatizada de protocolos de manipulação de líquidos, este tipo de plataformas têm de conter um conjunto de operações microfluídicas,

chamadas operações unitárias. Estas operações incluem a implementação de válvulas, a medição, mistura e separação de volumes. [4], [6]

### Válvulas

As válvulas são elementos de gestão do fluxo de fluidos, interrompendo ou permitindo o avanço dos mesmos de forma controlada. Podem ser construídas através de três estruturas diferentes, como é esquematizado na Figura 2.4.

A Figura 2.4 a) ilustra uma válvula muito simples, a válvula capilar, definida através da expansão abrupta da secção de um canal. O líquido avança até à expansão do canal por capilaridade e pára quando essa expansão é atingida. Essa barreira é superada através do aumento da velocidade angular.

Capilaridade é um fenómeno associado ao comportamento dos fluidos, cuja progressão em canais muito finos, como é o caso dos canais microfluídicos, ocorre em oposição ao campo gravítico.

Para capilares com secções rectas assimétricas, como é o caso da válvula capilar (Figura 2.4 a)), a pressão hidrostática máxima na barreira capilar, expressa em termos da energia livre interfacial é dada por:

$$P_{cb} = 4\gamma_{al}\sin\theta_c/D_h \quad (2.5)$$

onde  $\gamma_{al}$  é a energia de superfície por unidade de área da interface líquido-ar,  $\theta_c$  é o ângulo de contacto em equilíbrio e  $D_h$  é o diâmetro hidráulico.

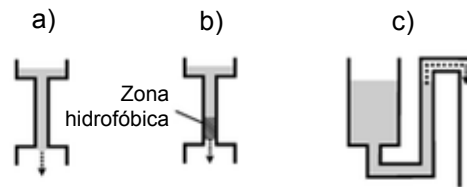
Assumindo que as velocidades do líquido são baixas, a dinâmica do fluxo pode ser assumida como o balanço entre a força centrípeta e a pressão da barreira capilar. A pressão do líquido junto ao menisco, devido à força centrípeta a actuar no líquido, pode ser descrita pela seguinte equação:

$$P_m = \rho\omega^2\bar{r}\Delta r \quad (2.6)$$

onde  $\rho$  é a densidade,  $\omega$  é a velocidade angular,  $\bar{r}$  é a distância média desde o líquido até ao centro do disco e  $\Delta r$  é o comprimento radial da amostra de líquido.

Outra forma de fazer com que o fluxo de um líquido pare é criar uma zona hidrofóbica no canal, que funciona como uma barreira energética para o líquido, como mostra a Figura 2.4 b). Esta válvula é quebrada se a frequência de rotação for superior à frequência de ruptura crítica.

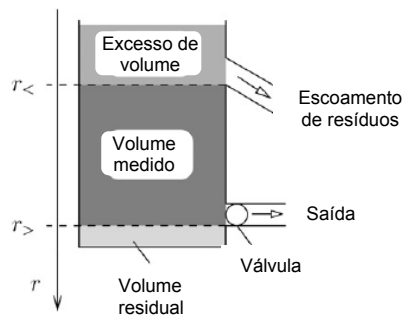
A terceira válvula, ilustrada na Figura 2.4 c), baseia-se num canal de sifão hidrofílico em forma de U. Sob rotação, os raios do menisco do líquido no reservatório e no sifão igualam-se (sistema de vasos comunicantes). Abaixo da frequência angular crítica o líquido avança pelo sifão por capilaridade, contrariando o campo centrífugo dado que a força capilar supera a força centrífuga. Após o líquido ultrapassar a altura do líquido no reservatório e a inversão do canal definida no sifão, a frequência angular pode ser aumentada, permitindo que o líquido seja escoado pelo sifão, esvaziando completamente o reservatório.



**Figura 2.4.** Ilustração esquemática de válvulas usadas em plataformas centrífugas. a) Válvula capilar, obtida por uma súbita expansão no diâmetro do canal, b) Válvula hidrofóbica, c) Válvula com sifão (adaptado de [2]).

### Medição de volumes

A medição de volumes pode ser feita através da adição de uma válvula no canal de saída de um reservatório e de um canal para escoamento do excesso de líquido numa posição radial mais interna do disco. O volume que fica definido entre os dois canais permite que se obtenha uma medição controlada de volumes [7].



**Figura 2.5.** Reservatório para medição de volumes constituído por um canal de escoamento do excesso do líquido numa posição radial mais interna do disco ( $r <$ ), e por uma válvula que bloqueia o canal de saída. Enquanto a válvula estiver a bloquear o canal de saída em  $r >$ , o canal é fechado e o excesso do líquido transborda através do canal de escoamento de resíduos. Após a superfície do líquido baixar até  $r <$ , a válvula é aberta e é definido o volume ( $\Delta r = r > - r <$ ). Pode-se utilizar uma válvula hidrofóbica (Figura 2.4.b) ou baseada num canal de sifão hidrofílico (Figura 2.4.c) (adaptado de [6]).

## Mistura de volumes

Diferentes regimes de mistura de volumes têm sido propostos em plataforma centrífuga [8], [9]. Considerando-se a mistura de fluxos de líquidos dentro de um canal radial em rotação, a força de *Coriolis* que está dirigida perpendicularmente, automaticamente irá gerar o fluxo transversal do líquido.

## Separação

Através da aplicação do campo gravítico artificial, elementos de diferentes densidades podem ser facilmente separados através do processo da sedimentação, mecanismo que está na base da aplicação desenvolvida no trabalho apresentado na tese.

Alguns tipos de estruturas foram demonstrados e implementados, com vista a separar os componentes celulares do plasma [10].

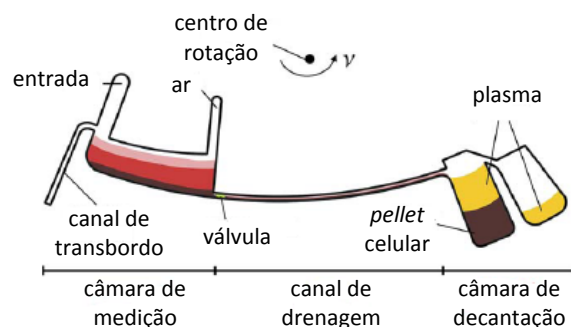
### 2.1.4 Aplicações em “Lab-on-a-disk”

Diversas aplicações nas áreas das ciências biológicas e de vida e diagnóstico *in vitro* foram demonstradas em plataformas centrífugas. Estas plataformas focam-se principalmente em testes de química geral e imunoensaios, usando técnicas de detecção como a absorção, aglutinação ou fluorescência. Também a preparação de amostras de proteína para posterior análise já está a ser comercializada. Testes de ácidos nucleicos têm sido realizados em plataforma centrífuga de disco, incluindo etapas como, lise celular [11], extração de DNA e reacção da cadeia de polimerase (PCR) [12].

O trabalho aqui apresentado incide sobre testes clínicos ao sangue, nomeadamente a determinação de dois parâmetros hematológicos, a velocidade de sedimentação eritrocitária (VSE) e o hematócrito (Htc) em plataforma centrífuga de microfluidos.

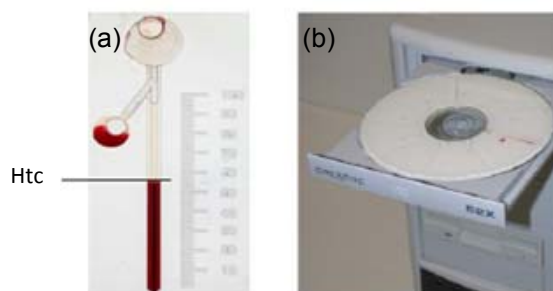
As tecnologias centrífugas também provaram a capacidade de integração de protocolos para ensaios de sangue. Estes testes incluem a determinação do grupo sanguíneo, determinação do nível de álcool no sangue [13], separação do plasma do sangue total através da centrifugação [10].

A Figura 2.6 ilustra a estrutura de separação do plasma do sangue total [10].



**Figura 2.6.** Esquema ilustrativo do fluxo de uma estrutura de decantação para a separação do plasma do sangue total. A amostra de sangue flui da câmara de medição através do canal de drenagem para a câmara de decantação, onde é feita a separação final. Na câmara de decantação o plasma purificado transborda para um reservatório de separação, enquanto o *pellet* celular continua no fundo da câmara de decantação (adaptado de [10]).

A determinação do hematócrito foi igualmente desenvolvida e implementada em disco (Figura 2.7) [14], [15]. Riegger e o seu grupo introduziram um novo teste de hematócrito, que demora cerca de 5 minutos, requer uma amostra de sangue total de 5 a 20  $\mu\text{L}$  e possui uma boa linearidade ( $R^2 = 0.995$ ).



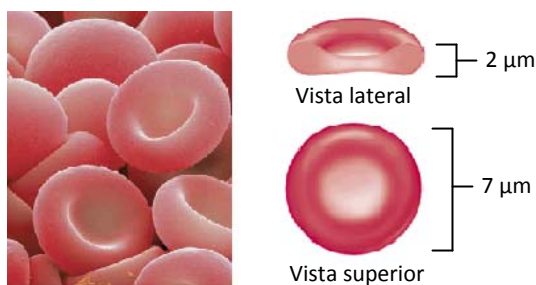
**Figura 2.7.** Determinação do hematócrito em plataforma centrífuga. (a) Após a sedimentação, o hematócrito pode ser determinado através da leitura do resultado na escala impressa ao longo do canal. (b) Este teste pode ser executado numa drive de CD-ROM standard (adaptado de [14]).

O trabalho aqui apresentado pretende desenvolver um novo conceito de “Lab-on-a-disk”, porque para além de determinar o Htc, também determina a VSE, que não existe implementada em disco. Devido ao disco estar sujeito a um movimento rotacional e sob a acção da força centrífuga, é possível acelerar facilmente os processos de sedimentação envolvidos nos dois parâmetros hematológicos que se pretendem determinar. O teste tem inúmeras vantagens em relação ao teste tradicional, porque utiliza um volume pequeno de amostra de sangue total (2  $\mu\text{L}$ ), e um tempo de teste de apenas 5-10 minutos, em vez dos tradicionais 60 minutos. Visa ainda diminuir os custos de teste e o risco de exposição a material potencialmente infeccioso.

## 2.2 Amostra: Sangue Total

O sangue é uma suspensão de células no plasma. O plasma é composto por água e por proteínas dissolvidas (Tabela 2.1). As células sanguíneas são constituídas por eritrócitos (glóbulos vermelhos), leucócitos (glóbulos brancos) e trombócitos (plaquetas).

A principal função de um eritrócito é transportar oxigénio e dióxido de carbono. A Figura 2.8 mostra a forma e dimensões típicas dos eritrócitos.



**Figura 2.8.** Eritrócitos saudáveis com forma discóide. A vista lateral mostra que os eritrócitos têm uma forma bicôncava discóide. A vista superior mostra que os eritrócitos são circulares.

O glóbulo branco é uma célula esférica com um diâmetro médio de 6-8  $\mu\text{m}$ .

As plaquetas têm uma forma discóide redonda ou oval com uma dimensão máxima de 2  $\mu\text{m}$ , sendo mais pequenas do que os outros tipos de células.

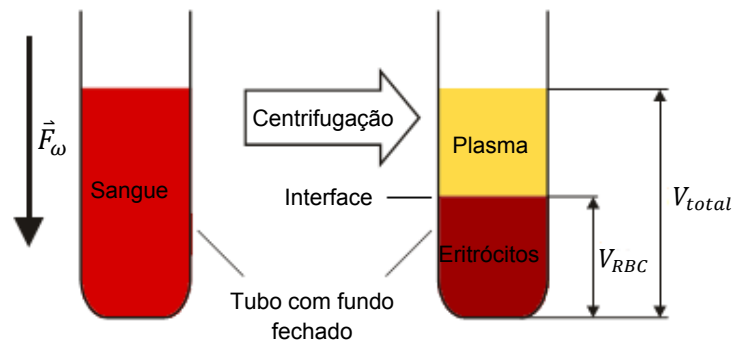
Os eritrócitos constituem a maior fracção de volume dos componentes celulares, como se pode observar na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Constituição do sangue e suas fracções volúmicas.

Constituintes	Fracções Volúmicas (%)
Plasma	45-65
Água	90.2-92.2
Electrólitos	$\approx 1$
Proteínas	6-8
Albumina	
Globulina	
Fibrinogéno	
Outros	$\approx 1$
Glucose	
Enzimas	
Hormonas	
Vitaminas	
Constituintes celulares	35-59
Eritrócitos	99
Leucócitos	0.5
Trombócitos	0.5

O plasma sanguíneo é constituído por água, electrólitos e proteínas. O sangue pode ser modelado como uma suspensão onde uma fracção de partículas começa a sedimentar por acção do campo gravítico, pois a sua densidade de massa é maior que a densidade de massa do plasma ( $\rho_{plasma} = 1027 \text{ Kg/m}^3 < \rho_{eritrócitos} = 1060 \text{ Kg/m}^3$ ).

O processo de sedimentação de sangue num tubo fechado, pode ser acelerado através da aplicação de um campo gravítico artificial, gerado pela força centrífuga ( $\vec{F}_\omega$ ) (Figura 2.9).



**Figura 2.9.** Sedimentação dos constituintes celulares do sangue acelerada por centrifugação. O processo termina quando a interface entre o plasma e as células, que são principalmente eritrócitos (RBC), já não avança mais e atinge o hematócrito.

A sedimentação da amostra de sangue é uma das mais importantes etapas do processamento em diagnósticos médicos, e a determinação do hematócrito e da velocidade de sedimentação eritrocitária depende dela.

## 2.3 Velocidade de Sedimentação Eritrocitária

O teste da Velocidade de Sedimentação Eritrocitária (VSE) é um teste de laboratório simples e acessível, de baixo custo e dos mais antigos ainda em uso actualmente. É um teste não específico, porém útil como teste de triagem, quando altas concentrações de proteínas da fase aguda estão presentes [16].

É utilizado mundialmente em medicina para avaliar condições associadas à inflamação aguda e crónica, incluindo infecções, neoplasias e doenças auto-imunes. Actualmente, mesmo com a disponibilidade de exames complementares mais sofisticados, o teste da VSE continua a ser solicitado com muita frequência pelos reumatologistas, que o utilizam no diagnóstico e no acompanhamento clínico de doenças como a artrite reumatóide [17].

Em 1897, Edmund Biernacki, referiu pela primeira vez que o aumento da VSE em indivíduos doentes está relacionado com a presença do fibrinogénio. Em 1918, Robin Fahraeus promoveu o trabalho de Biernacki. A sua motivação inicial para estudar a VSE foi na gravidez, mas o seu interesse expandiu-se para o estudo da VSE em estados patológicos. Em 1921, Alf Westergren, melhorou a técnica e relatou a sua utilidade na determinação do prognóstico em pacientes com tuberculose. Uma variação desta metodologia foi publicada por Wintrobe em 1935. Em 1973, o “International Council for Standardization in Haematology” (ICSH) recomendou a adopção do método de Westergren como método padrão e de escolha em todo o mundo [18]. Este método irá ser descrito na secção 2.3.4 deste capítulo.

### 2.3.1 Princípio do teste e factores envolvidos

Quando uma amostra de sangue é colocada num tubo vertical em repouso, os eritrócitos tendem a descer, devido à força gravítica. O teste mede a distância em milímetros que os eritrócitos percorrem num determinado tempo, hoje padronizado em 60 minutos [16], [19].

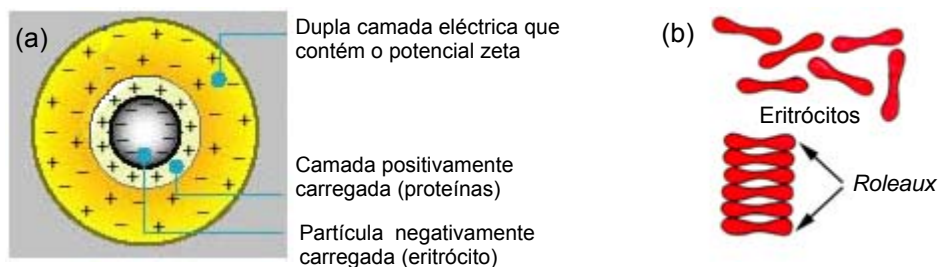
Os eritrócitos sedimentam para o fundo do tubo lentamente, devido a duas forças que retardam o processo de sedimentação [20]:

- 1) Os eritrócitos repelem-se uns aos outros devido às cargas negativas presentes nas suas superfícies (potencial zeta);
- 2) Em condições normais, a razão entre a área de superfície e o volume de um eritrócito é grande, o que faz com que estes resistam à sedimentação.

A taxa de queda de eritrócitos numa coluna de sangue é também influenciada pela sua agregação. Os três principais factores associados a este fenómeno são a energia livre da superfície, a carga da superfície dos eritrócitos e a constante dieléctrica do meio que envolve as células em suspensão [21].

A energia livre da superfície dos eritrócitos, resultante do fenómeno de tensão superficial, actua como força de atracção devido às forças de Van der Waals envolvidas. A carga à superfície dos eritrócitos é negativa, actuando como força repulsiva entre os mesmos. A constante dieléctrica do meio depende da concentração e simetria das proteínas plasmáticas, aumentando com a sua assimetria [21].

A densidade de carga nas superfícies dos eritrócitos, caracterizada pelo potencial zeta, determina a intensidade da repulsão electrostática entre os mesmos (Figura 2.10 a)), sendo que a sua associação com proteínas plasmáticas positivamente carregadas irá provocar a diminuição deste potencial e assim facilitar a formação de agregados celulares (Figura 2.10 b)) - *rouleaux* [21]. A VSE é proporcional à quantidade e dimensão dos *rouleaux*, sendo que a presença destes agregados irá provocar um decréscimo da razão entre a área de superfície e o volume, acelerando assim o processo de sedimentação.



**Figura 2.10.** (a) Representação esquemática da agregação de proteínas (cargas positivas) ao eritrócito (carga negativa). O potencial zeta presente na dupla camada eléctrica determina a intensidade da repulsão electrostática entre eritrócitos. (b) Ilustração de eritrócitos e agregados de eritrócitos (*rouleaux*).

A presença destas proteínas de alto peso molecular no plasma, principalmente quando têm carga global positiva, aumenta a viscosidade e favorece a formação de *rouleaux*, fazendo aumentar a VSE. Algumas dessas proteínas são o fibrinogénio e as globulinas, sendo o fibrinogénio o agente da fase aguda mais abundante e o que tem maior efeito no aumento da VSE. Assim, qualquer condição que faça aumentar o fibrinogénio, como por exemplo, gravidez, diabetes mellitus, fase final da insuficiência renal, doenças cardíacas, doenças do colagénio, neoplasias, pode aumentar a VSE [19], [20], [22].

A anemia e a macrocitose também aumentam a VSE. Na anemia, como o valor do hematócrito é baixo existem mais espaços livres entre os eritrócitos, facilitando a

sedimentação mais rápida dos agregados. Uma diminuição entre a razão da área de superfície e o volume dos eritrócitos, como acontece na macrocitose, faz igualmente com que as células sedimentem mais rápido [23].

Uma diminuição na VSE está associada a uma série de doenças do sangue em que os glóbulos vermelhos possuem uma alteração no tamanho e na forma. A VSE pode ser diminuída através de condições que interferem com a formação dos *rouleaux* ou condições que façam aumentar a razão entre a área de superfície e o volume. A formação de *rouleaux* é prejudicada pela esferocitose, pela doença falciforme, pela microcitose, pela policitemia, pela variação no tamanho dos eritrócitos (anisocitose), e por algumas drogas. Um aumento extremo de células brancas no sangue, como acontece na leucocitose extrema, faz diminuir a VSE.

Factores técnicos e mecânicos podem afectar negativamente o resultado do teste. Temperaturas demasiado altas ou baixas podem levar a um aumento ou decréscimo nos resultados da VSE. A temperatura recomendada é entre 18 e 25°C [17], [19].

Uma diluição imprópria do sangue pode alterar o resultado [17], [19]. Se a concentração do anticoagulante for maior que a recomendada, o resultado da VSE irá ser mais elevado.

A amostra deve ser bem misturada antes de ser usada, e deve ser guardada a 4°C até um período de 24 horas.

Algumas causas que podem aumentar ou diminuir a VSE estão resumidas na Tabela 2.2. [17], [20], [22].

**Tabela 2.2.** Factores que podem afectar a Velocidade de Sedimentação Eritrocitária (VSE).

<b>Categoria</b>	<b>Factores que aumentam a VSE</b>	<b>Factores que diminuem a VSE</b>
	Idade avançada Sexo feminino Gravidez Elevação dos níveis de fibrinogénio Infecção Inflamação Malignidade	Recém-nascido Diminuição dos níveis de fibrinogénio
Anomalias nos eritrócitos	Anemia Macrocitose	Esferocitose Microcitose Acantocitose Talassemia Policitemia Talassemia
Anomalias nos leucócitos	Leucemia	Leucocitose extrema
Factores técnicos	Diluição Aumento da temperatura Tubo inclinado	Diluição Diminuição da temperatura Coagulação da amostra Mistura inadequada Bolhas na coluna

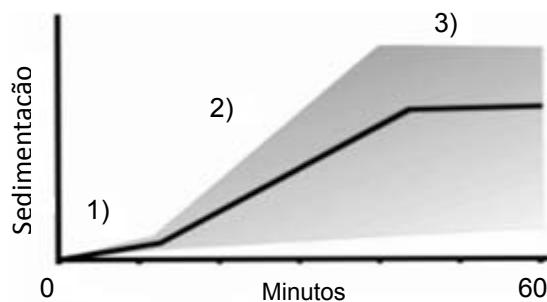
A dinâmica do processo de sedimentação de eritrócitos apresenta três fases distintas: agregação, sedimentação e empacotamento [19].

**1ª Fase - Agregação:** Ocorre durante os primeiros 5 a 10 minutos da reação e reflete o período em que os eritrócitos formam os agregados. Nesta fase ocorre pouca sedimentação e durante este período não foi estabelecida qualquer correlação com um estado de doença. No entanto, o grau de células agregadas vai determinar a taxa de sedimentação durante a segunda fase.

**2ª Fase - Sedimentação:** Nesta fase ocorre a maior parte da sedimentação dos eritrócitos. A sedimentação é linear durante a maior parte desta fase e nela é atingida a velocidade máxima de sedimentação.

**3ª Fase - Empacotamento:** À medida que a sedimentação ocorre a densidade de eritrócitos aumenta no fundo do tubo, com diminuição do espaço entre eles. Conseqüentemente o espaço para progressão diminui e as forças de repulsão entre eritrócitos ganham relevo com influência na diminuição da velocidade de sedimentação. Esta é a fase do empacotamento, onde o sangue se divide em camadas distintas: eritrócitos, leucócitos e plasma.

Se a sedimentação da interface entre o plasma e os eritrócitos for desenhada em função do tempo é obtida uma curva sigmoidal, como mostra a Figura 2.11.



**Figura 2.11.** Esboço de uma curva típica de VSE em função do tempo. A reação pode ser dividida em três fases: 1) Agregação, 2) Sedimentação, 3) Empacotamento.

O tamanho dos agregados formados na fase de agregação é crítico para o resultado da sedimentação. As taxas de agregação e sedimentação são manifestações da instabilidade do sangue em suspensão, que é resultado do efeito recíproco entre a superfície da membrana do eritrócito e as proteínas de fase aguda do plasma. Por um lado, essas proteínas têm alta afinidade com as glicoproteínas de membrana eritrocitária,

mas por outro, têm um tamanho molecular suficiente para formar pontes entre os eritrócitos [19].

### 2.3.2 Relevância clínica

O teste da VSE é um indicador não específico de inflamação e necrose, infecções agudas e crônicas, tumores, doenças degenerativas e doenças auto-imunes. É não específico, porque pode ajudar a detectar a existência de uma doença, mas não a sua gravidade.

A VSE é útil no diagnóstico de doenças inflamatórias específicas, como a arterite temporal e a polimialgia reumática. Uma VSE elevada é um dos resultados principais do teste utilizado para apoiar o diagnóstico. Este teste também é usado para monitorizar a actividade da doença e a resposta à terapia em ambas as doenças.

Uma VSE moderadamente elevada ocorre quando existe inflamação, mas também com anemia, infecção, gravidez e com o avançar da idade. Uma VSE marcadamente elevada tem geralmente uma causa óbvia, como um aumento acentuado de globulinas, que pode ser devido a uma infecção grave ou a uma inflamação. Outras condições que podem produzir uma elevação acentuada de VSE incluem: a artrite reumatóide, uma doença auto-imune que causa uma grave inflamação nas articulações; o mieloma múltiplo e a macroglobulinemia de *Waldenstrom* (tumores que produzem grandes quantidades de imunoglobulinas).

Uma VSE baixa pode ser detectada devido a uma policitemia (presença de muitos eritrócitos) ou a uma leucocitose extrema (presença de muitos leucócitos).

A VSE pode fornecer informações valiosas para o rastreio, diagnóstico e monitorização da actividade da doença ou resposta terapêutica [17], [20], [23], [22].

#### **Rastreio**

Pacientes assintomáticos: Embora o teste da VSE tenha sido utilizado no passado como um teste de rastreio geral, os ensaios clínicos não demonstraram qualquer valor de VSE para triagem de indivíduos assintomáticos. Nestes casos, a história completa do paciente e um exame físico é a melhor opção.

Sintomas não específicos: Uma VSE elevada na presença de sintomas não específicos pode ajudar a justificar ou a fazer uma avaliação mais directa, porque elevações moderadas na VSE são comuns em infecções, doenças inflamatórias e neoplasias. No entanto, uma VSE normal não exclui a presença de uma doença.

## **Diagnóstico**

Arterite temporal: É uma doença inflamatória dos vasos sanguíneos, que afecta principalmente a artéria temporal. Se o tratamento não for instituído em algumas horas, existe um alto risco de trombose da artéria oftálmica, levando à cegueira. O diagnóstico definitivo é feito através de uma biópsia temporal da artéria, mas este exame geralmente não pode ser executado com a rapidez suficiente para orientar a terapia inicial. Em pacientes com arterite temporal, a VSE média é superior a 90 mm/h (método de Westergren) e excede os 30 mm/h em 99% dos casos.

Polimialgia Reumática: Manifesta-se através de dores musculares difusas, nomeadamente no pescoço, ombros, ancas e região lombar. O diagnóstico clínico para a polimialgia reumática só é feito após a exclusão de outras doenças reumáticas, vasculites sistémicas, neoplasias, e infecções crónicas.

Outras doenças inflamatórias: A VSE é utilizada no departamento de emergência, para ajudar na avaliação de suspeita de apendicite, doença pélvica inflamatória, artrite séptica e outras doenças inflamatórias.

## **Monitorização**

Arterite Temporal e Polimialgia Reumática: A VSE é geralmente muito elevada nestes pacientes. Uma diminuição significativa da VSE, em combinação com uma melhoria do quadro clínico, é indicativa de uma boa resposta terapêutica. A continuação de uma VSE elevada, mesmo com uma melhoria nos sintomas, sugere uma má resposta à terapia.

Neoplasias: Uma VSE elevada pode ter uma correlação com um prognóstico não específico de vários tipos de cancro, incluindo a Doença de Hodgkin, o carcinoma gástrico, o carcinoma de células renais, a leucemia linfocítica crónica, o cancro de mama, o cancro colo-rectal e da próstata. Em pacientes com tumores sólidos, uma VSE superior a 100 mm/h normalmente indica doença metastática. Mas para a maioria dos tumores este prognóstico não específico tem de ser complementado com testes de diagnóstico mais precisos.

### 2.3.3 Valores de referência

O intervalo de referência utilizado para o teste da VSE deve ser estabelecido pelo laboratório que realiza o teste. As mulheres tendem a ter valores de VSE mais elevados, assim como os idosos. Por razões desconhecidas, em pessoas obesas também foi notado um ligeiro aumento da VSE [17].

Na Tabela 2.3 estão indicados os valores de referência da VSE para o método de Westergren [24].

**Tabela 2.3.** Intervalos de referência da VSE para o método de Westergren em adultos saudáveis (adaptado de [24]).

Adultos (Método de Westergren)	Intervalo de referência (mm/h)
Idade < 50 anos	
Homem	0 aos 15
Mulher	0 aos 20
Idade > 50 anos	
Homem	0 aos 20
Mulher	0 aos 30

### 2.3.4 Estado da Arte

Ao longo dos últimos anos foram introduzidas inovações técnicas e dispositivos semiautomáticos que visam eliminar ou diminuir o risco de exposição a material potencialmente infeccioso, como o sangue. Estes novos procedimentos são considerados menos perigosos [19], [25].

Muitos métodos estão comercialmente disponíveis para a realização do teste da VSE. A maioria dos testes são feitos através das técnicas padrão de Westergren ou Wintrobe, enquanto outros são realizados por métodos alternativos.

#### Métodos padrão

Método de Westergren: é o método mais utilizado hoje em dia. O método requer a colheita de 2 mL de sangue venoso para um tubo com 0.5 mL de citrato de sódio. O sangue anticoagulado com EDTA é diluído na proporção de uma parte de citrato de sódio ou solução de cloreto de sódio para quatro partes de sangue, e colocado numa coluna de 200 mm de comprimento com um diâmetro interno não inferior a 2,55 mm [26]. O tubo utilizado é de plástico ou de vidro, transparente, circular e é operado na posição vertical,

a uma temperatura entre os 18 e 25°C [19]. O resultado da VSE é medido através da distância que as células sedimentaram ao fim de uma hora, em unidades de mm/h [21].

Algumas vantagens do método de Westergren modificado incluem:

- 1) Conveniência na utilização de sangue com EDTA, pois preserva as características morfológicas das células, aumentando a sua estabilidade, e evitando a coagulação do sangue.
- 2) VSE elevadas podem ser detectadas devido à altura da coluna;
- 3) Este método é recomendado pelo ICSH [16] e pelo NCCLS [19].

Método de Wintrobe: é realizado de uma forma similar ao método de Westergren, excepto nas dimensões da coluna, pois utiliza um tubo com 100 mm de comprimento, no volume de sangue venoso utilizado (1 mL) [21], [27], e no tipo de anticoagulante usado (oxalato de potássio) [23]. A diferença para o método de Westergren é o comprimento da coluna de sangue, pois resto do procedimento é comum aos dois métodos, incluindo o tempo de teste de uma hora. A coluna mais curta torna este método menos sensível que o método de Westergren, pois VSE elevadas são difíceis de detectar. O intervalo de referência para o método de Wintrobe (Homens: 0-6.5 mm/h; Mulheres: 0-16 mm/h) [22] é menor do que para o método Westergren.

### **Métodos de teste alternativos**

A evolução do teste de VSE para outros métodos alternativos foi impulsionada principalmente por duas limitações dos métodos padrão:

- 1) Longo tempo de análise (60 minutos);
- 2) Volumes de amostra relativamente grandes (1 a 2 mL).

“Zeta Sedimentation Ratio” (ZSR): Este método utiliza um dispositivo centrífugo (*Zetafuge*) que faz girar os tubos capilares, acelerando a formação dos agregados e a sedimentação dos eritrócitos. Pode ser concluído em poucos minutos, requer 100 µL de sangue, não é afectado pela anemia, e correlaciona-se razoavelmente com o método de Westergren quando os valores de VSE são moderadamente elevados [28]. As suas desvantagens são a necessidade de equipamentos especiais e origina resultados ligeiramente elevados, em comparação com o método de Westergren.

VES-matic: Utiliza 1 mL de sangue venoso com anticoagulante (citrato de sódio). O tubo é colocado numa posição com um ângulo de 18° em relação à posição vertical para

acelerar a sedimentação. O resultado é determinado após 20 minutos [29]. Os resultados do *VES-matic* correlacionam-se bem com os resultados do método de Westergren e oferecem vantagens, como a diminuição do tempo de teste.

*Micro-ESR*: A base deste método é a redução do volume de amostra necessário. Utiliza uma coluna com um diâmetro interno de apenas 1 mm em vez dos 2,5 mm. Um dos métodos de *Micro-ESR* usa uma coluna de 230 mm de comprimento, enquanto outro usa uma coluna de 75 mm [30]. Ambos os métodos são direccionados para uso pediátrico, onde é desejável a redução dos volumes da amostra.

Novos métodos estão a ser continuamente introduzidos, sendo que o objectivo principal é reduzir o tempo de teste, a simplificação do procedimento de ensaio e a redução dos volumes de amostra [31].

## 2.4 Hematócrito

O hematócrito (Htc) é um dos marcadores mais importantes no diagnóstico médico e na rotina de exames de sangue, indicando a presença de certas doenças, como a anemia e policitemia, bem como de condições fisiológicas graves, como hemorragia e desidratação.

O hematócrito define-se como sendo a razão entre o volume dos eritrócitos ( $V_{RBC}$ ) e o volume total de sangue ( $V_{total}$ ):

$$Htc = \frac{V_{RBC}}{V_{total}} \quad (2.7)$$

A camada entre os eritrócitos e o plasma representa aproximadamente 1% da coluna total. É constituída por glóbulos brancos e plaquetas e não deve fazer parte da medição do hematócrito. A unidade do hematócrito exprime-se em fracção decimal ou em percentagem.

### 2.4.1 Relevância clínica

Um hematócrito baixo reflecte um baixo número de eritrócitos no sangue e é um indicador de uma diminuição na capacidade de transporte de oxigénio. Exemplos de condições que possam causar uma diminuição do hematócrito incluem:

- Hemorragia interna ou externa;
- Insuficiência renal crónica;
- Anemia perniciosa (deficiência na vitamina B12);
- Hemólise, associada a reacções transfusionais.

Um hematócrito baixo pode também ser encontrado em doenças auto-imunes e falhas de medula óssea.

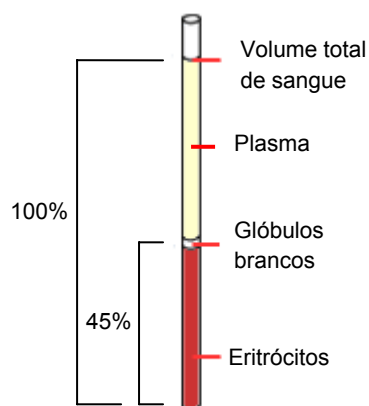
Um hematócrito elevado pode reflectir um aumento no número de eritrócitos, ou uma diminuição no volume do plasma, em condições como:

- Desidratação grave, por exemplo em caso de queimaduras, diarreia ou uso excessivo de diuréticos;
- Eritrocitose (produção excessiva de eritrócitos);
- Policitemia vera (aumento anormal das células sanguíneas);
- Hemocromatose (doença na qual ocorre depósito de ferro nos tecidos em virtude do seu excesso no organismo).

## 2.4.2 Método de determinação

O método de referência recomendado pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS) para a determinação do hematócrito é o microhematócrito [32].

Este método utiliza uma pequena quantidade de sangue total, um tubo capilar e uma centrífuga. Após cinco minutos de centrifugação (10,000-15,000 g), o hematócrito pode ser medido, enquanto os tubos ainda estão na posição horizontal. Uma coluna distinta de eritrócitos é visível numa das extremidades do tubo capilar. Os eritrócitos são seguidos por uma pequena camada turva, constituída por glóbulos brancos e plaquetas, e em seguida pela coluna de plasma (Figura 2.12). A medição deve ser realizada dentro de 10 minutos para evitar a fusão das camadas [32], [33].



**Figura 2.12.** Tubo capilar utilizado no teste do microhematócrito. É possível distinguir três fases na coluna: plasma, glóbulos brancos e plaquetas, eritrócitos. Exemplo da leitura do valor de hematócrito (45%).

## 2.4.3 Valores de referência

A Tabela 2.4 mostra os intervalos de referência do método do microhematócrito, para adultos entre os 20 e os 50 anos.

**Tabela 2.4.** Valores de referência para o teste do hematócrito [33].

Sexo	Valores de referência (%)
Feminino	37 - 47
Masculino	40 - 52



Este capítulo descreve os métodos de prototipagem que foram usados para fabricar a estrutura microfluídica para medição de VSE e Htc, o desenho (CAD) da estrutura, o equipamento utilizado para a realização do teste, o procedimento experimental e método de medição.

Os substratos utilizados neste trabalho foram o policarbonato (PC) e o polimetilmetacrilato (PMMA). O PC possui uma densidade entre 1,19 e 1,24 g/cm<sup>3</sup>, é um substrato resistente aos álcoois e ácidos; não é resistente aos hidrocarbonatos, às cetonas e ao hidróxido de potássio. O PMMA possui uma densidade de 1,19 g/cm<sup>3</sup>, é resistente aos ácidos, bases, óleo e petróleo; não é resistente aos álcoois, à acetona e à radiação UV [34]. Ambos os substratos são transparentes e com acabamentos de superfície que os tornam compatíveis com métodos de detecção óptica.

### **3.1 Técnicas de Prototipagem**

Para desenvolver dispositivos microfluídicos é necessário conjugar precisão e reprodutibilidade da técnica, bem como rapidez na prototipagem das estruturas microfluídicas.

Neste trabalho foram testadas três técnicas de prototipagem: ablação a laser, fotolitografia e plotter de corte para cortar dry film. A seguir é descrito o funcionamento de cada uma das técnicas. No Capítulo 4 são apresentados alguns resultados de testes preliminares feitos para verificar e escolher a melhor técnica para prototipar a estrutura microfluídica.

### 3.1.1 Ablação a Laser

Um método rápido para a prototipagem de estruturas microfluídicas é a ablação a laser. Um feixe de luz de alta intensidade é focado no material e a energia concentrada do feixe evapora o material nesse ponto focal [34].

As estruturas microfluídicas são criadas através da remoção de material de um substrato, neste caso o substrato utilizado foi o polimetil-metacrilato (PMMA), já que o acabamento em PC é de fraca qualidade.

Neste trabalho foi utilizado um laser de CO<sub>2</sub> para gravar as estruturas microfluídicas. A maquinação com um laser de CO<sub>2</sub> é considerado um processo térmico, pois o material do substrato que se pretende remover evapora directamente por aplicação de calor, através do feixe laser. Quando o substrato é atingido pelo feixe laser, a temperatura aumenta drasticamente num curto espaço de tempo, levando primeiro à fusão e posteriormente à evaporação do material.

Para instruir o sistema laser sobre o que desenhar, foi utilizado um programa de desenho assistido por computador (CAD), o *Autodesk AutoCAD*. O laser funciona como uma impressora, onde os desenhos do CAD são impressos no substrato de PMMA, o que torna este processo muito fácil e rápido de utilizar.

O equipamento de laser utilizado possui parâmetros que podem ser directamente ajustados, tais como a potência do foco, a velocidade do feixe e o número de passagens que o feixe faz sobre o material.

Possui dois modos de operação: o modo vector e o modo raster. No modo vector, o laser descreve caminhos lineares e é utilizado para gravar canais. Estes caminhos lineares são definidos no desenho de CAD como linhas. O modo raster é utilizado para fazer cavidades e reservatórios. É criada uma área definida no substrato, através do preenchimento dessa área com várias linhas paralelas.

Neste trabalho, foram maquinados reservatórios com uma profundidade de 100 µm para definir a estrutura de sedimentação. Foi utilizado o modo raster e os parâmetros utilizados para esta profundidade foram uma potência de 40% e uma velocidade de 40%.

### 3.1.2 Fotolitografia

A fotolitografia é uma técnica que consiste em transferir um padrão de uma máscara para uma superfície revestida com um filme fotossensível (dry film resist (DFR)), através da exposição selectiva à luz ultra-violeta (UV), seguida da revelação das porções do material exposto, dando origem à remoção do material. A máscara é obtida através da impressão numa folha de acetato transparente do desenho CAD da estrutura microfluídica.

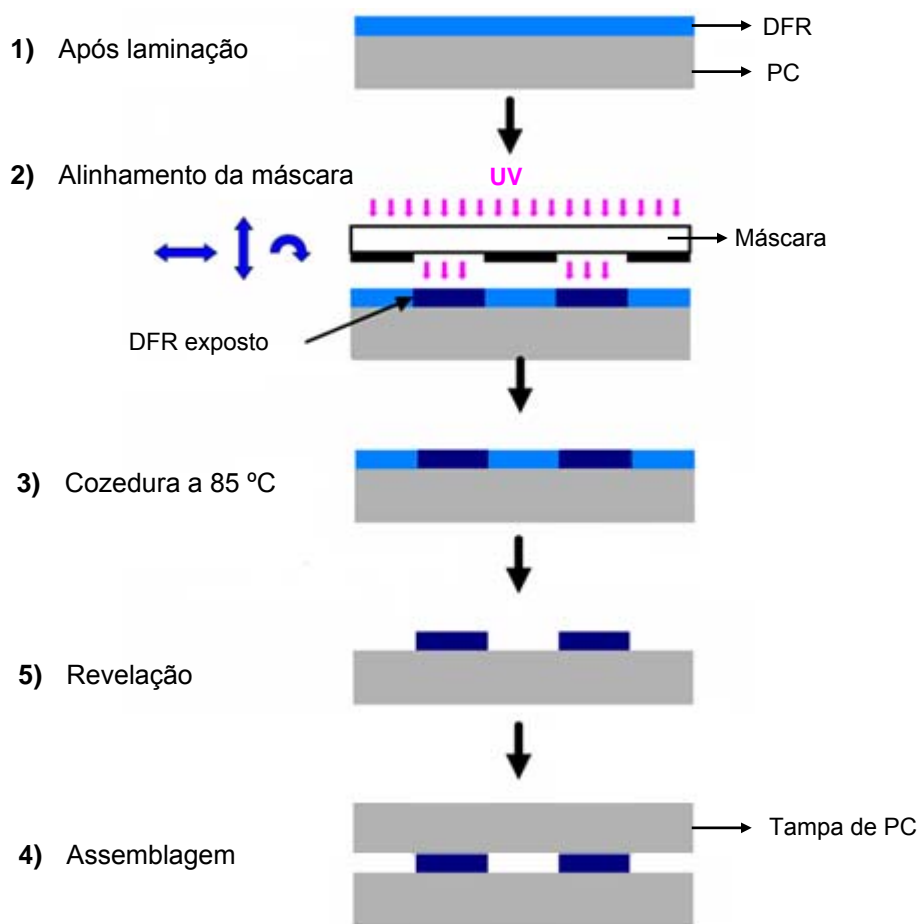
Nesta técnica a profundidade das estruturas é definida pela espessura do dry film, havendo várias espessuras disponíveis (20, 30, 50, 100, 120  $\mu\text{m}$ ).

Neste trabalho todas as estruturas feitas por fotolitografia utilizaram um filme fotossensível negativo.

No caso do DFR negativo, o filme é exposto à luz UV nos locais onde não se pretende remover o material. A exposição à luz UV faz com que o filme polimerize nesse local e seja assim mais difícil de dissolver. Deste modo, o DFR mantém-se na superfície e a solução reveladora remove apenas as porções de material não expostas à luz UV, ou seja as áreas não polimerizadas.

O processo da fotolitografia realizado consiste nos seguintes passos (Figura 3.1):

- 1) O DFR é laminado sobre um disco de policarbonato (PC) com espessura de 0,6 mm. A laminadora utilizada possui dois parâmetros (temperatura e velocidade) que podem ser ajustados. Esta laminação foi feita a uma temperatura de 95°C e à velocidade 1;
- 2) Alinhamento da máscara no disco e posterior exposição à luz UV durante 15 segundos. O alinhamento da máscara é uma etapa crucial no processo, por isso a máscara deve ser precisamente alinhada com o disco de PC;
- 3) Após a exposição é realizada a cozedura do DFR a uma temperatura de 85°C durante 5 minutos;
- 4) A revelação é feita durante 15 minutos em solução aquosa de carbonato de potássio (0,8%). As partes de DFR que não foram expostas à luz UV são selectivamente removidas;
- 5) Uma vez definidas as estruturas fluídicas no disco de PC este é assembled com um segundo disco de PC (tampa) que define o volume fechado das estruturas microfluídicas. Este passo foi completado na laminadora usando os parâmetros no passo 1). A tampa de PC contém furos que permitem o acesso à estrutura microfluídica (para entrada do sangue e fuga do ar).



**Figura 3.1.** Esquema de descrição do processo de fotolitografia de DFR.

### 3.1.3 Dry film cortado na plotter de corte

Este método de prototipagem utiliza uma plotter de corte na qual uma caneta com uma lâmina metálica faz cortes no DFR, de acordo com o desenho CAD da estrutura microfluídica que é carregado no equipamento. É utilizado o software *ROBO Master Pro* para enviar o desenho para a plotter e definir a força e velocidade do corte.

Este método é bastante rápido e simples de utilizar.

O processo consiste nos seguintes passos:

- 1) Colocar o DFR na plotter de corte e imprimir o desenho CAD desejado. A plotter faz cortes no DFR segundo parâmetros ajustáveis. Neste caso foram utilizados para o corte força 7 e velocidade 1;
- 2) Remover as zonas cortadas de DFR;
- 3) O DFR é laminado sobre um disco de policarbonato (PC) de 0,6 mm de espessura. A laminação foi feita a uma temperatura de 95°C e a uma velocidade 1;
- 4) Uma vez definidas as estruturas fluídicas no disco de PC este é assembledo com um segundo disco de PC (tampa) que define o volume fechado das estruturas microfluídicas. Este passo foi completado na laminadora usando os parâmetros no passo 3). A tampa de PC contém furos que permitem o acesso à estrutura microfluídica (para entrada do sangue e fuga do ar).

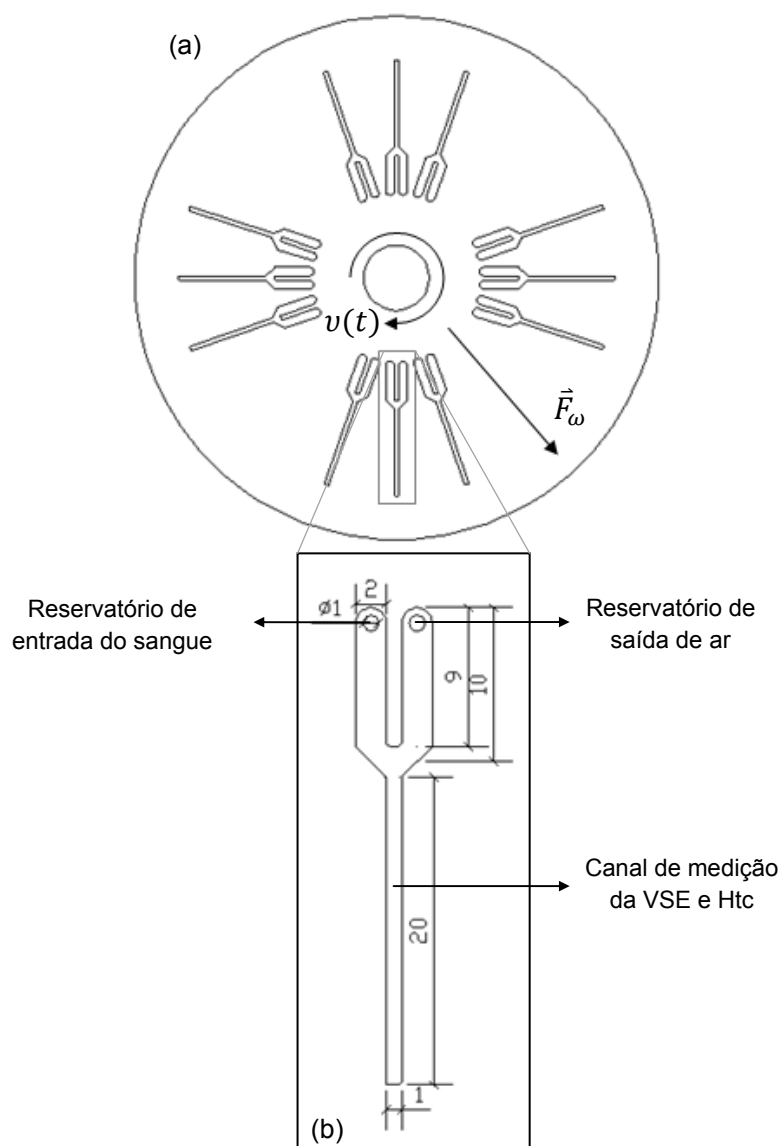
Nesta técnica a profundidade das estruturas também é definida pela espessura do dry film, tal como acontece na fotolitografia.

### 3.2 Desenho CAD do disco e estrutura microfluídica

O disco e a estrutura microfluídica foram projectados num programa de desenho assistido por computador (*AutoCad*).

A estrutura microfluídica é constituída por um reservatório de entrada por onde a amostra de sangue é colocada, um canal principal onde é efectuada a medição da VSE e do Htc e um reservatório para a saída do ar (Figura 3.2).

A estrutura tem uma profundidade de 100  $\mu\text{m}$ . O canal de medição tem 20 mm de comprimento e 1 mm de largura.



**Figura 3.2.** (a) Disco microfluídico com as estruturas de medição da VSE e do Htc. O disco possui 12 estruturas dispostas radialmente. O disco está sujeito a um movimento rotacional com uma certa frequência de rotação  $v(t)$  e sob a acção da força centrífuga ( $\vec{F}_\omega$ ). (b) A estrutura microfluídica é composta por um reservatório de entrada do sangue, um canal de medição e um reservatório de saída de ar.

O funcionamento da estrutura consiste em:

1) Inicialmente a amostra sangue é carregada no reservatório de entrada e o enchimento é feito por capilaridade. O volume do reservatório de entrada foi definido de modo a acomodar a totalidade do sangue utilizado no teste, sem que este entre para o canal de medição. Neste passo o disco ainda não se encontra em rotação;

2) Quando o disco inicia a rotação, o sangue desce por centrifugação para o canal de medição, com consequente troca entre o sangue e o ar do canal, o qual se escapa pelo reservatório do ar.

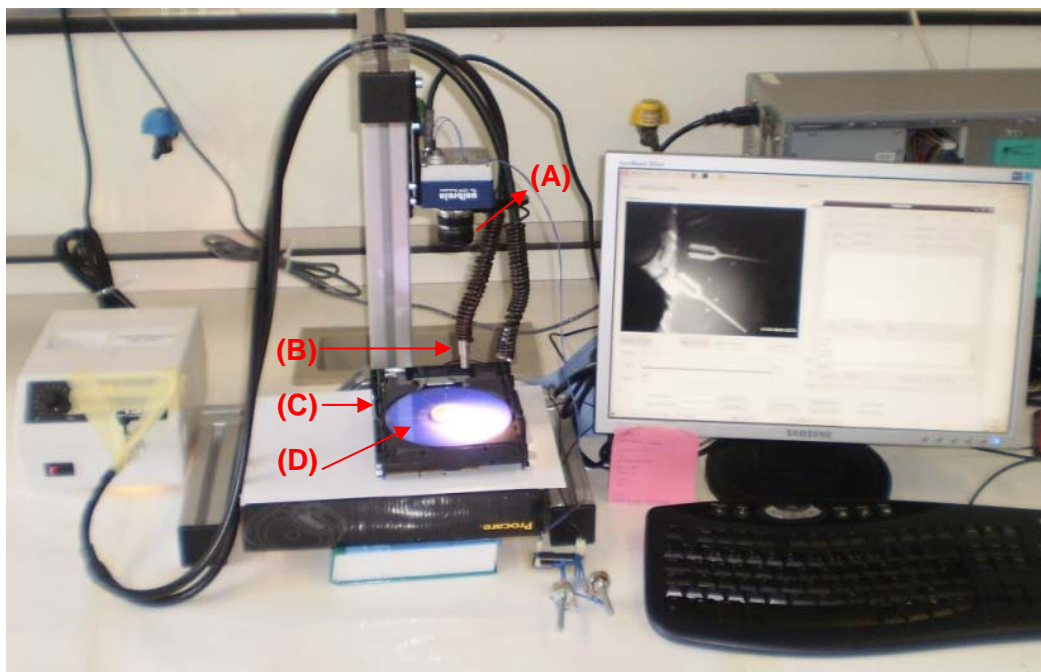
### 3.3 Equipamento e componentes

Os testes foram efectuados no equipamento representado na Figura 3.3.

O equipamento é constituído por 3 principais componentes:

- **Motor:** modelo *cool muscle 2* e permite velocidades de rotação até 8000 RPM (aproximadamente 133 Hz).
- **Iluminação:** pode ser livremente posicionada para otimizar as condições de exposição.
- **Camera:** os vídeos das experiências foram obtidos por uma camera CCD monocromática da Unibrain (modelo 501b) com resolução VGA (640x480). A velocidade de “shutter” da camera é de 1 microsegundo e a taxa de aquisição máxima de frames é de 86 FPS. A aquisição de imagens é definida por um sinal externo de trigger enviado pelo motor para a camera.

Os testes são controlados por computador com um software que permite enviar para o motor comandos que definem a frequência e aceleração desejadas. Outro software permite observar e gravar em vídeo o que está a acontecer na experiência em tempo real.



**Figura 3.3.** Equipamento utilizado para o teste. (A) Camera (lente com zoom), (B) Iluminação, (C) Motor, (D) Disco protótipo.

### 3.4 Procedimento experimental

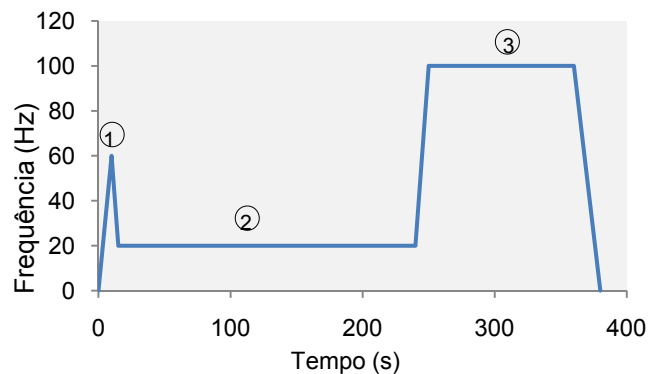
O disco foi testado com dois tipos de amostra de sangue. Nos testes preliminares foi utilizado sangue capilar, retirado através de uma picada no dedo com uma lanceta. Nos testes finais, onde é comparado o método tradicional de Westergren com o método em disco, foi usado sangue capilar e sangue venoso com anticoagulante ( $K_3EDTA$ ).

A seguir é descrito o procedimento experimental (Figura 3.4).

A amostra de sangue de 2  $\mu L$  é carregada para o reservatório de entrada da estrutura. O disco é posto a rodar a uma frequência de 60 Hz e a uma aceleração de 5  $Kpps^2$  durante 5 segundos. Este primeiro passo faz com que o sangue passe de uma forma rápida e turbulenta para o canal principal, onde vai ser medida a VSE e o Htc (Figura 3.4 (1)).

Após essa passagem, o disco é desacelerado a 5  $Kpps^2$  para a frequência de 20 Hz. Esta velocidade é mantida durante 240 segundos e é observada a sedimentação das células no plasma (Figura 3.4 (2)).

Após o passo da sedimentação, o disco é acelerado a 5  $Kpps^2$  para a frequência de 100 Hz, a qual é mantida durante 180 segundos. Durante este período a sedimentação dos eritrócitos é completada e a interface entre as células e o plasma atinge uma posição radial estacionária com definição da fase eritrocitária e plasmática, possibilitando a medição do hematócrito (Figura 3.4 (3)).



**Figura 3.4.** Protocolo de rotação utilizado para medir a VSE e o Htc. (1) O disco é posto a rodar a 60 Hz para que o sangue passe do reservatório de entrada para o canal principal da estrutura onde vai ser medida a VSE e o Htc. (2) Medição da VSE a uma frequência de 20 Hz. (3) Após a medição da VSE, o disco é posto a rodar a uma frequência de 100 Hz para a medição do Htc.

O protocolo de rotação (Figura 3.4) foi definido empiricamente com base em testes realizados para diferentes acelerações, frequências e tempos de rotação. O disco foi rodado a várias acelerações (5, 10 e 15  $Kpps^2$ ), sendo que a aceleração mais baixa foi a

escolhida pois foi aquela em que houve menos separação das células do sangue nos primeiros segundos, quando o sangue ainda está a passar do canal de entrada para o de medição. Para essa passagem inicial foram testadas duas frequências angulares (50 e 60 Hz). A de 60 Hz foi a escolhida, para o processo ser o mais rápido e menos turbulento possível. A frequência utilizada para a medição da VSE foi 20 Hz, pois foi a frequência mínima em que a interface das células com o plasma ficava bem definida durante a sedimentação sem que ficassem células na fase do plasma. Não foram escolhidas frequências mais altas, para não acelerar demasiado o processo de sedimentação, com risco de perda de informação, a qual poderá ser relevante para medir a VSE nos primeiros segundos. Para a medição do Htc foram testadas três frequências (80, 90 e 100 Hz). A escolhida foi a de 100 Hz, pois foi aquela em que se obteve mais compactação das células, possivelmente devido ao plasma ter mais facilidade em se libertar do fundo do reservatório e migrar para a fase plasmática.

Foram testados dois tipos de profundidades da estrutura (50 e 100  $\mu\text{m}$ ), sendo a escolhida a de 100  $\mu\text{m}$ , pois foi aquela em o processo de sedimentação foi menos turbulento e se efectuou de uma forma mais homogénea e reprodutível.

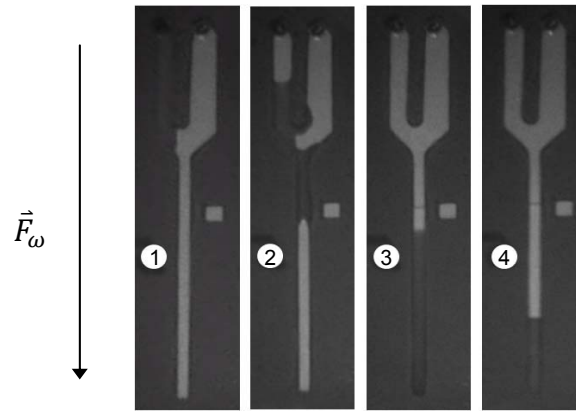
A Figura 3.5 mostra as fotografias retiradas dos vídeos ao longo do procedimento experimental.

O sangue é colocado com uma pipeta no reservatório de entrada da estrutura microfluídica (Figura 3.5 (1)). Nesta fase o disco encontra-se parado.

Na Figura 3.5 (2) o disco está em rotação com uma velocidade angular de 60 Hz. Esta passagem para o canal de medição tem de ser o mais rápido possível, para evitar que as células comecem a sedimentar.

Na Figura 3.5 (3) é visível a sedimentação das células no plasma a uma frequência de 20 Hz. A interface vai descendo ao longo do canal e encontra-se bem definida.

Quando a interface entre as células e o plasma estabiliza, é medido o hematócrito (Figura 3.5 (4)).



**Figura 3.5.** Fotografias dos diferentes passos do procedimento experimental para a medição da VSE e do Htc. A sedimentação está sob a acção da força centrífuga ( $\vec{F}_\omega$ ). 1) A amostra de sangue de 2  $\mu\text{L}$  é carregada para o reservatório de entrada da estrutura. 2) O disco roda a uma frequência de 60 Hz para a amostra passar para o canal onde vai ser efectuada a medição da VSE e do Htc. 3) Sedimentação das células no plasma a uma frequência de 20 Hz. 4) Após a sedimentação, o Htc pode ser determinado.

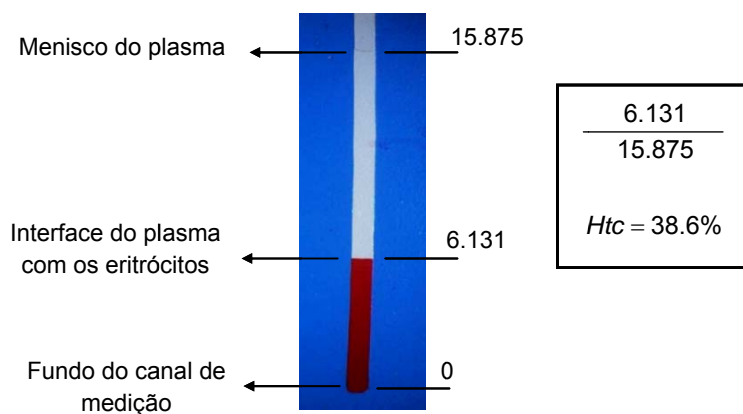
### 3.5 Método de medição

Para a medição da VSE e do Htc foram gravados vídeos das experiências para se analisar o que estava a acontecer ao longo do protocolo de rotação. De cada vídeo foram retiradas imagens com intervalos de tempo definidos entre cada uma delas. Essas imagens foram posteriormente analisadas num programa de processamento de imagem (*ImageJ*).

Antes dessa análise, cada uma das estruturas microfluídicas foi caracterizada através da medição das dimensões do canal ao microscópio, para depois se calcular o factor de conversão de escala de  $\mu\text{m}$  (medida no micrómetro do microscópio) para pixéis (medida no *ImageJ*).

Para medir a VSE foi necessário determinar a posição radial da interface do plasma com os eritrócitos para cada uma das imagens ao longo dos 240 segundos. Registada essa posição para as várias imagens obtidas em vídeo, é possível construir a curva de sedimentação.

Quando a interface entre as células e o plasma estabiliza e as células atingem o estado de compactação máximo, o Htc pode ser determinado. Para medir o Htc procedeu-se à análise apenas de uma imagem, e nela foram retiradas as medidas do menisco do plasma e da interface do plasma com os eritrócitos (Figura 3.6). O Htc é determinado pela razão entre a altura das células e a altura total da coluna. Foram consideradas as alturas e não os volumes, pois as profundidades e larguras dos canais são mantidas ao longo do canal de medição.



**Figura 3.6.** Fotografia do canal de medição da VSE e do Htc após a sedimentação das células. Pode-se observar o menisco do plasma, a interface entre o plasma e os eritrócitos e o fundo do canal. Nesta fase a interface do plasma com as células está estabilizada, sendo atingido o estado de compactação máximo. O Htc pode ser determinado (exemplo:  $6.131 / 15.875 \rightarrow Htc = 38.6\%$  ).

# 4

## Resultados

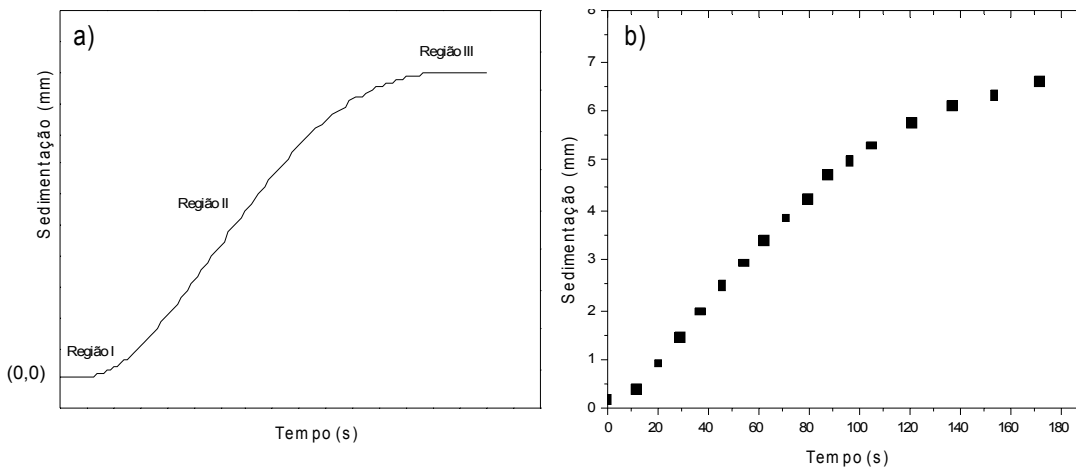
---

Neste capítulo são descritos os principais resultados obtidos nas experiências realizadas, nomeadamente experiências preliminares importantes para controlar e medir o processo de sedimentação, o qual depende da técnica de prototipagem utilizada, da profundidade das estruturas fluídicas, do protocolo de rotação e da intensidade da força centrífuga na determinação do hematócrito. Os testes finais incluem a comparação entre sangue capilar e sangue venoso com anticoagulante, a determinação da VSE e Htc em disco e comparação com a técnica convencional.

### 4.1 Caracterização da curva de sedimentação

Nas experiências realizadas observou-se que, após uma fase inicial não linear, a posição da interface entre os eritrócitos e o plasma desce ao longo do reservatório de medição de forma linear durante a sedimentação, seguindo-se um regime de sedimentação não linear.

A Figura 4.1. a) representa uma curva típica de sedimentação, onde se podem observar três regiões distintas: uma fase inicial, onde os eritrócitos se agregam formando *rouleaux*, uma fase linear de sedimentação, onde a interface do plasma com os eritrócitos desce rapidamente e uma fase de conclusão do processo de sedimentação e compactação completa das células, onde a descida da interface das células estabiliza. Na Figura 4.1. b) está representado um exemplo de uma curva de sedimentação obtida experimentalmente, onde é possível observar uma primeira fase de agregação, uma fase linear de sedimentação e por último uma fase de sedimentação não linear. Esta curva exhibe o comportamento semelhante a uma curva típica de sedimentação.



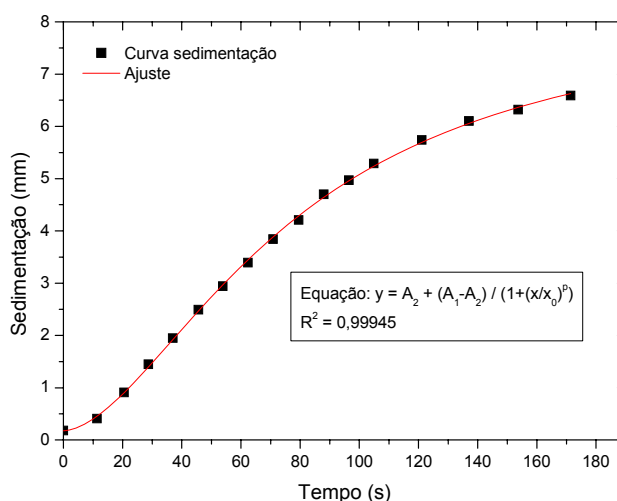
**Figura 4.1.** a) Ilustração do perfil da curva típica (padrão) do processo de sedimentação. As regiões representadas correspondem: I – início do processo de sedimentação (agregação); II – sedimentação; III – fim do processo de sedimentação (compactação). b) Exemplo de uma curva de sedimentação obtida nas experiências. A curva foi construída a partir de várias posições da interface dos eritrócitos com o plasma durante a centrifugação da amostra de sangue ao longo do tempo.

A curva de sedimentação do sangue pode ser ajustada a partir de uma regressão não linear de modo a obter-se uma expressão analítica que permita reproduzir no intervalo de medição, a posição do menisco dos eritrócitos. Para o caso foi utilizada a função Logística,

$$y = \frac{(A_1 - A_2)}{(1 + (x/x_0)^p)} + A_2 \quad (4.1)$$

onde  $y$  representa o valor de sedimentação em milímetros e  $x$  o tempo em segundos. A sedimentação refere-se há variação da posição entre o menisco das células e o menisco do plasma ( $\Delta r = r_{células} - r_{plasma}$ ), que corresponde à altura que as células descenderam na coluna.  $A_1, A_2, x_0, p$  são parâmetros de ajuste.

Na Figura 4.2 os pontos correspondem à curva de sedimentação experimental e a linha vermelha corresponde ao ajuste feito à curva experimental.



**Figura 4.2.** Comparação entre a curva de sedimentação experimental e a ajustada. A curva de sedimentação é ajustada correctamente a partir da equação 4.1, como se pode observar pelo elevado coeficiente de correlação ( $R^2 = 0.99945$ ).

Na Tabela 4.1 estão representados os valores das constantes obtidas a partir do ajuste à curva de sedimentação considerada como exemplo.

**Tabela 4.1.** Valores das variáveis obtidas através do ajuste feito à curva de sedimentação.

Constante	Significado	Valor	Erro
$A_1$	Valor inicial	0.1751	0.04099
$A_2$	Valor final	8.29673	0.17162
$x_0$	Valor central	78.34063	2.0474
$p$	Índice de potência	1.72674	0.05155

Após a obtenção dos valores das variáveis é calculada a derivada de 1º grau,  $y'$ , da função anterior,

$$y' = \frac{p(A_2 - A_1)(t/x_0)^{p-1}}{x_0(1 + (t/x_0)^p)^2} \quad (4.2)$$

A variável  $y'$  representa a velocidade de sedimentação em milímetros por segundo, que depois é passada para milímetros por hora.

Foi feita uma correcção para a velocidade de sedimentação medida em disco (aceleração =  $N^\circ \times G$ ) para que seja comparável com o esquema de velocidades de sedimentação obtida em campo gravítico (aceleração =  $G$ ). É de notar que para a mesma frequência de rotação a aceleração centrífuga varia ao longo da posição radial no disco e

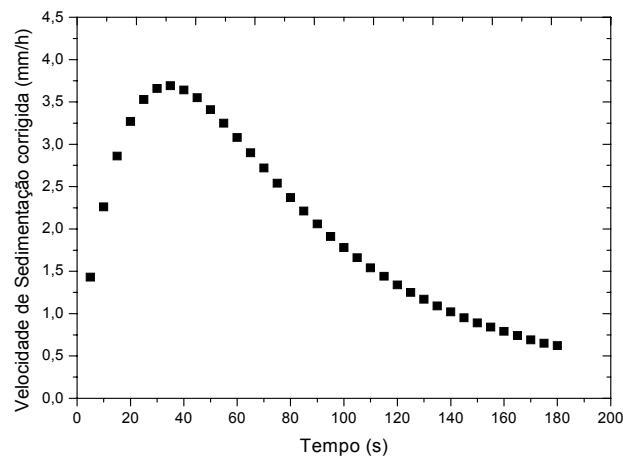
essa variação foi incluída na normalização feita. Para tal calculou-se o número de G's em função da posição radial e de seguida calculou-se a velocidade corrigida, como mostram as equações 4.3 e 4.4:

$$N^{\circ} \text{ de } G's = ((2\pi v)^2 \cdot r)/G \quad (4.3)$$

sendo que a aceleração gravítica,  $G$ , é  $9800 \text{ mm/s}^2$  e  $r$  vem em mm.

$$V_{\text{corrigida}} = V/(N^{\circ} \text{ de } G's) \quad (4.4)$$

A curva de velocidade de sedimentação corrigida está representada na Figura 4.3.



**Figura 4.3.** Curva de velocidade de sedimentação calculada (em milímetros por hora) ao longo do tempo (em segundos). É obtida a partir da derivada da função de ajuste da curva de sedimentação corrigida para o número de G's de cada posição radial da interface dos eritrócitos com o plasma ao longo do tempo.

## 4.2 Experiências preliminares

### 4.2.1 Comparação entre as técnicas de prototipagem

Após algumas experiências concluiu-se que a técnica de prototipagem por ablação a laser não é a mais adequada na prototipagem de estruturas para medir a VSE e o Htc. Uma desvantagem da ablação a laser é a formação de saliências nas superfícies das estruturas, fazendo com que estas fiquem muito rugosas (Figura 4.4 a)) [34].

Devido a essa rugosidade uma porcentagem dos eritrócitos fica agarrada à superfície das paredes e ao fundo do reservatório (Figura 4.4 b)), contribuindo com contaminações de eritrócitos na fase plasmática e dificultando a medição da posição da interface ao longo do tempo.

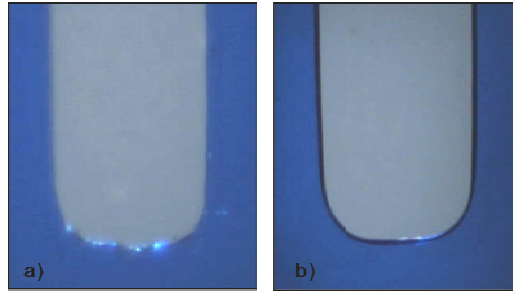


**Figura 4.4.** a) Fotografia de um reservatório feito a laser, com saliências nas superfícies das estruturas. b) Fotografia de uma estrutura maquinada por ablação a laser. Após a centrifugação do sangue é visível que bastantes células não sedimentam, ficando no meio do plasma agarradas à superfície das paredes e do fundo do reservatório.

As técnicas de fotolitografia e de corte do DFR na plotter foram usadas com sucesso para prototipar as estruturas. De seguida vão ser comparadas as características destas duas técnicas de prototipagem e qual a escolhida para a realização das experiências finais.

Na técnica da fotolitografia foram utilizadas dois tipos de máscaras: as máscaras impressas numa impressora de jacto de tinta e as máscaras de alta resolução. As máscaras feitas numa impressora convencional são muito mais rápidas de obter e mais baratas, do que as máscaras de alta resolução. No entanto, depois do desenho da estrutura não sofrer mais modificações, optou-se por usar uma máscara de alta resolução, pois tem a vantagem das estruturas ficarem com melhor definição.

A Figura 4.5 mostra a comparação entre as estruturas obtidas através de DFR cortado na plotter de corte e as obtidas por fotolitografia com uma máscara de alta resolução.



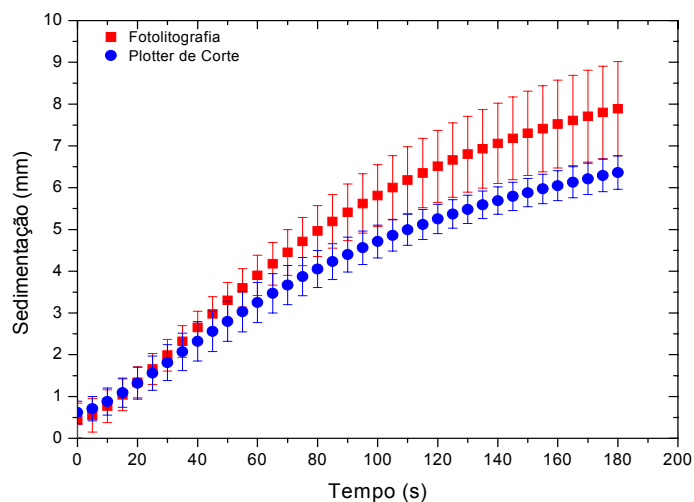
**Figura 4.5.** (a) Fotografia da estrutura feita em DFR cortado na plotter de corte. (b) Fotografia da estrutura feita em fotolitografia com uma máscara de alta resolução.

As paredes das estruturas cortadas na plotter de corte têm pior definição e qualidade, do que as obtidas a partir da fotolitografia. As dimensões das larguras das estruturas têm uma variação maior para a plotter de corte do que para a fotolitografia. Estruturas feitas em fotolitografia com uma máscara de alta resolução têm a vantagem de oferecer melhor definição das estruturas e das suas paredes.

Embora as estruturas obtidas através do corte do DFR na plotter tenham pior definição, foram usadas com sucesso, pois a integridade dimensional da estrutura foi mantida, podendo ser produzidas mais facilmente e de forma mais rápida do que por fotolitografia, sendo portanto uma grande vantagem para a produção em grande escala.

Para uma melhor comparação, foram calculadas as posições da interface dos eritrócitos com o plasma para ambas as técnicas, tendo-se obtido as curvas de sedimentação representadas na Figura 4.6. É possível observar que os eritrócitos sedimentam mais rapidamente em estruturas feitas em fotolitografia do que em DFR cortado na plotter de corte. A hipótese que pode explicar este comportamento é que a superfície do fundo do reservatório de fotolitografia é constituída por DFR revelado, como foi explicado na secção 3.1.2 do capítulo 3. A superfície do fundo do reservatório pode não estar completamente limpa, podendo conter resíduos de DFR, fazendo com que algumas células fiquem agarradas ao fundo do reservatório. Como a coluna de células de sedimentação vai conter menos células, vão existir menos interações electrostáticas e mais espaços livres e consequentemente as células sedimentam mais rápido. Devido a esta perda de células é de esperar que o hematócrito obtido nos ensaios da fotolitografia seja um pouco inferior ao obtido através do DFR cortado na plotter de corte.

Quando o DFR é cortado na plotter o fundo reservatório de PC mantém uma superfície lisa e limpa. A coluna de plasma fica limpa, sem que haja adesão dos eritrócitos às paredes do reservatório.



**Figura 4.6.** Comparação entre as curvas de sedimentação obtidas por fotolitografia e por DFR cortado na plotter de corte. A sedimentação é mais rápida em fotolitografia do que na plotter de corte. O erro entre os vários ensaios realizados para a fotolitografia é superior ao erro da plotter de corte.

Para cada uma das técnicas foram realizados 6 ensaios da mesma amostra de sangue para obtenção das curvas de sedimentação. As barras de erro entre os vários ensaios para a fotolitografia é em geral superior às barras de erro obtidas para a plotter de corte, o que faz da fotolitografia uma técnica menos reprodutível entre os diferentes testes, dado possuir um desvio padrão superior.

No final de cada ensaio, foram ainda medidos os hematócritos para ambas as técnicas. Na Tabela 4.2 são apresentados a média e o erro dos hematócritos para os vários ensaios.

**Tabela 4.2.** Média e erro (em %) dos valores de hematócrito para os vários ensaios realizados em fotolitografia e em DFR cortado na plotter. Estes ensaios são feitos para a mesma amostra de sangue.

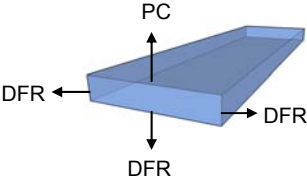
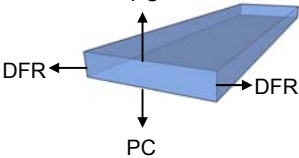
	Hematócrito	
	Média (%)	Erro (%)
Fotolitografia	36,9	2,19
Plotter de Corte	38,7	1,2

Como era esperado o hematócrito para a estrutura de DFR cortado na plotter de corte foi mais elevado do que para a fotolitografia. O valor da medição do hematócrito para fotolitografia é falsamente mais baixo que o valor real, pois existem células que

ficaram agarradas às superfícies. A percentagem de erro entre os vários ensaios é maior para a fotolitografia.

As características dos dois métodos são comparadas e resumidas na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3.** Comparação entre as técnicas de prototipagem da Fotolitografia e do DFR cortado na Plotter de Corte.

<b>Fotolitografia</b>		<b>Plotter de Corte</b>
Elevada, definida pela espessura do DFR	<b>Precisão da profundidade</b>	Elevada, definida pela espessura do DFR
Alta	<b>Precisão das dimensões laterais</b>	Média
30 min	<b>Tempo de fabrico de um disco</b>	15 min
	<b>Tipo de superfícies das 4 paredes da estrutura</b>	
Média, fundo pode não estar completamente limpo (DFR)	<b>Rugosidade da superfície do fundo</b>	Baixa, fundo de PC
0,7	<b>Desvio padrão entre as curvas de sedimentação</b>	0,39
2,19	<b>Erro (%) entre os hematócritos</b>	1,2

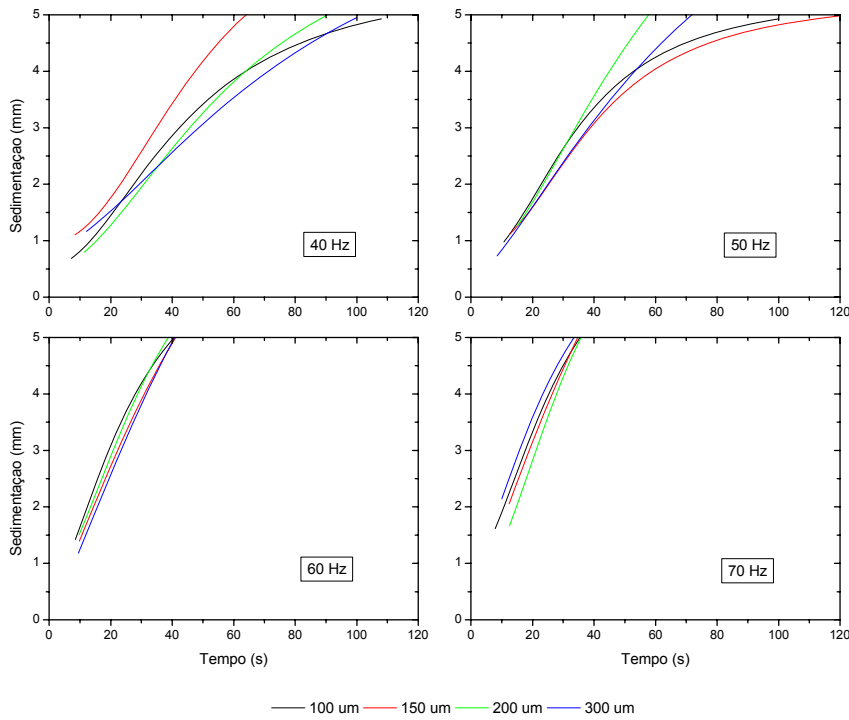
Devido a estas conclusões, a técnica escolhida para prototipar as estruturas para os testes de medição da VSE e do Htc foi a de DFR cortado na plotter de corte.

#### 4.2.2 Comparação entre diferentes profundidades e frequências de rotação

Nesta experiência foram testadas diferentes profundidades e diferentes frequências de rotação. O principal objectivo no estudo das profundidades é aferir se existe uma influência substantiva das paredes do reservatório de medida nas curvas de sedimentação, sendo que o mesmo será importante para desenhar a estrutura microfluídica. O mesmo ocorre para as velocidades de sedimentação. Sendo expectável que com o aumento da frequência de rotação aumente a velocidade de sedimentação, a observação da forma das curvas de sedimentação será importante para o planeamento do protocolo de rotação final do teste. Para testar profundidades superiores a 130  $\mu\text{m}$  não se pode utilizar a técnica adoptada neste trabalho (dry film cortado na plotter de corte), pois dry film com espessura superior a 130  $\mu\text{m}$  não estava disponível no laboratório. Estes resultados foram obtidos através da técnica de maquinação CNC. Esta técnica de prototipagem de movimento contínuo consiste na remoção de material mecanicamente, através de uma ferramenta de corte, denominada fresa, permitindo assim a produção de estruturas à escala micro com um grau de precisão e acabamentos na superfície maquinada bastante satisfatórios. No entanto esta técnica só foi utilizada nesta experiência preliminar e não nas experiências finais, devido à morosidade e complexidade associados ao processo de prototipagem. Para produção destas estruturas, foi utilizada uma máquina da *Minitech Machinery Corporation*, modelo *Mini-Mill/3* e o material utilizado foi PC. É feita a laminação de DFR (20  $\mu\text{m}$ ) sobre um disco de PC com espessura de 0,6 mm. A montagem é feita através da laminação do disco de PC com dry film, com o disco de PC maquinado.

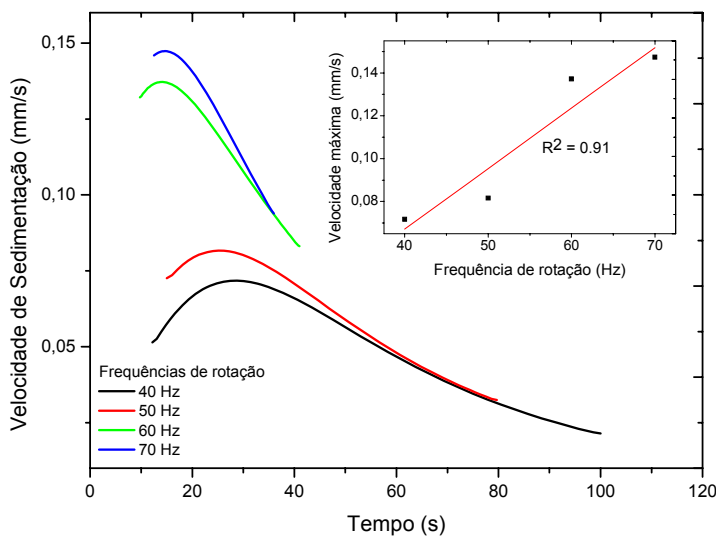
A Figura 4.7 representa as curvas de sedimentação para estruturas com 100, 150, 200 e 300  $\mu\text{m}$  de profundidade, testadas para protocolos de rotação de 40, 50, 60 e 70 Hz. A frequência mínima utilizada (40 Hz), foi aquela a partir da qual não ficaram células agarradas à parede de dry film que revestia uma das superfícies maiores da estrutura, anulando o efeito de interacção entre os eritrócitos e o dry film.

Para cada frequência (40, 50, 60 e 70 Hz) parece haver concordância razoável na fase dos 0 aos 40 segundos entre os vários testes efectuados, a qual não é garantida para os tempos mais longos. Ainda assim, tendo em conta os erros experimentais associados às medições, não foi observada uma dependência significativa e parametrizável das curvas de sedimentação com a profundidade. É de notar que para o intervalo de profundidades testado, a dimensão menor é mais de uma ordem de grandeza superior ao tamanho médio dos eritrócitos (7-8  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 4.7.** Curvas de sedimentação para várias frequências (40, 50, 60 e 70 Hz) e para várias profundidades (100, 150, 200, 300 μm).

Dada a semelhança entre as curvas foi efectuada uma média dos dados obtidos para as várias profundidades, com o objectivo de estudar o comportamento da curva de velocidade de sedimentação para diferentes frequências de rotação (Figura 4.8).



**Figura 4.8.** Médias das curvas de velocidades de sedimentação a diferentes profundidades para obtenção de quatro curvas respeitantes a quatro frequências de rotação (40, 50, 60 e 70 Hz).

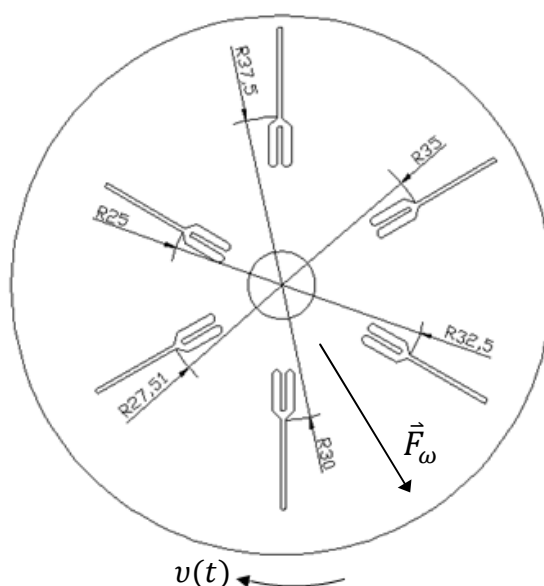
Analisando as quatro curvas, observa-se um aumento da velocidade de sedimentação com a frequência sobretudo na região anterior à fase de compactação e que o máximo é atingido para tempos mais curtos nas frequências mais elevadas. O gráfico interior mostra que existe uma correlação aproximadamente linear entre o máximo de velocidade e a frequência de rotação. É de notar que para as frequências de 40 e 50 Hz a definição da curva de velocidade, nomeadamente a região anterior ao valor máximo, é mais completa, o que pode ser relevante no trabalho futuro.

Apesar disto os resultados indiciam que a obtenção da VSE e posterior correlação com técnica convencional pode ser feita para as diferentes velocidades de rotação testadas.

#### 4.2.3 Influência da força centrífuga no hematócrito

Apesar de já ter sido evidenciado na tese que para diferentes frequências de rotação o valor do hematócrito é diferente (secção 3.4), neste teste pretende-se estudar a influência da posição radial do canal de medição no valor do hematócrito. Para tal foi usado o mesmo protocolo de rotação para a mesma estrutura fluidica em diferentes posições radiais do disco. Estes dados serão da maior importância no desenho futuro da estruturação de medição.

Foram testadas seis posições radiais:  $r = 25$ ;  $r = 27,5$ ;  $r = 30$ ;  $r = 32,5$ ;  $r = 35$ ;  $r = 37,5$ , onde cada um dos raios corresponde à posição radial em milímetros desde o centro do disco até ao início do canal de medição. O desenho CAD do disco com as estruturas é mostrado na Figura 4.9.

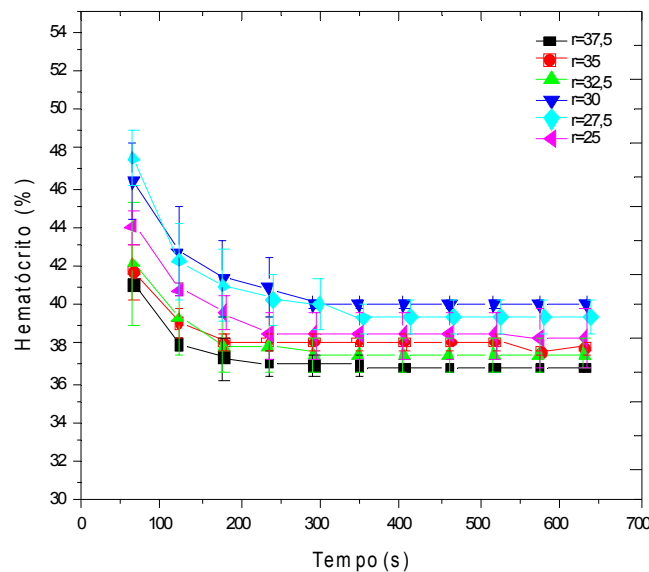


**Figura 4.9.** Disco microfluídico com várias estruturas para medição da VSE e do Htc em seis posições radiais diferentes ( $r = 25$ ;  $r = 27,5$ ;  $r = 30$ ;  $r = 32,5$ ;  $r = 35$ ;  $r = 37,5$ ).

Nesta plataforma as células sedimentam devido à força centrífuga, segundo a equação 2.1 referenciada na secção 2.1.3 do capítulo da revisão bibliográfica.

Nestas experiências a velocidade angular ( $\omega = 2\pi\nu$ ) foi mantida, pois a frequência de rotação ( $\nu$ ) utilizada foi 100 Hz e o tempo de rotação foi de 10 minutos. A densidade de massa ( $\rho$ ) também é constante. Para verificar a influência do campo centrífugo na medição do hematócrito só é considerada a distância ao centro de rotação ( $r$ ). Foram efectuados ensaios em triplicado para cada posição radial estudada.

A Figura 4.10 apresenta a evolução do hematócrito ao longo do tempo. Pode-se observar que ao longo do tempo o hematócrito vai diminuindo devido à sedimentação das células. Devido à compactação das células essa descida acaba por estabilizar e pode-se calcular o hematócrito. Através dos vários ensaios realizados conclui-se que o hematócrito estabiliza por volta dos 300 segundos, mas dentro do erro experimental observa-se que para raios mais exteriores (forças centrífugas maiores) o estado estacionário de compactação parece ser atingido mais cedo.



**Figura 4.10.** Curvas do hematócrito em função do tempo para várias posições radiais no disco.

Na Figura 4.10, observou-se que os valores de hematócrito variam consoante a distância radial ao centro de rotação.

A Tabela 4.4 mostra os valores médios de hematócrito para cada uma das posições com os respectivos desvios padrão entre os vários ensaios.

**Tabela 4.4.** Valores médios de hematócrito e desvio padrão para cada uma das posições radiais.

Posição radial (mm)	Hematócrito (%)	Desvio padrão
25	38,3	1,48
27,5	39,4	0,79
30	40,1	0,26
32,5	37,5	0,86
35	37,6	0,15
37,5	36,8	0,31

Como a força centrífuga ( $\vec{F}_\omega$ ) é proporcional à posição radial ( $r$ ), sabemos que para posições radiais maiores, a força que actua sobre as células em sedimentação também é maior. É de esperar que as células sofram uma maior compactação dando origem a um hematócrito mais baixo, o que realmente se verifica (Tabela 4.4).

Pelo contrário, é de esperar que para uma posição radial menor, o hematócrito seja mais alto. No entanto isso não se verifica, pois para  $r = 25$  foi obtido um hematócrito de 38,3%, quando o valor mais alto de hematócrito foi 40,1%.

Portanto, para raios mais externos acontece o esperado, pois o hematócrito é mais baixo. Para raios mais internos, essa tendência não se verifica, sendo o processo menos reprodutível. A força centrífuga que actua é mais pequena, não havendo compactação total das células.

Outra hipótese que pode explicar esta discrepância deve-se a erros experimentais de conversão de escala de pixéis para milímetros no programa *ImageJ*, onde são feitas as medições. A percentagem de erro de conversão de escala entre cada uma das experiências varia entre 2,06% e 16,67%, o que pode explicar a diferença de 36,8% a 40,1% obtida nos valores de hematócritos.

### **4.3 Determinação da velocidade de sedimentação eritrocitária e do hematócrito**

Estas experiências foram realizadas para obter um estudo comparativo dos resultados de velocidade de sedimentação eritrocitária e hematócrito obtidos em disco e obtidos através da técnica convencional, de forma a estabelecer a correlação existente entre os mesmos. A experiência permitiu fazer comparações entre:

- Medidas de VSE e Htc obtidas no laboratório (método convencional) e obtidas em disco.
- Medidas de VSE e Htc em disco para amostras de sangue venoso e sangue capilar.

O método de VSE utilizado para calibrar os resultados em disco é o recomendado pelo ICSH [16] e pelo NCCLS [19]. Este é um método modificado, baseado no método tradicional de Westergren e utiliza amostras de sangue com anticoagulante ( $K_3EDTA$ ) sem diluição.

As amostras de sangue venoso foram fornecidas pelo Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Chaves e contêm anticoagulante sólido ( $K_3EDTA$ ). Durante o período de cada colheita foram tidos alguns cuidados tais como: agitar os tubos para garantir que o sangue e o anticoagulante sejam continuamente misturados; as amostras foram armazenadas a 4° C durante um período de 24 horas.

O sangue capilar foi recolhido no mesmo dia que o sangue venoso, mas por não conter anticoagulante foi recolhido no momento de cada experiência. Foi obtido através de uma picada no dedo, após este ter sido limpo com etanol, com uma lanceta descartável. A picada deve ser suficientemente profunda (1 a 2 mm) para que o sangue flua livremente. A primeira gota foi desprezada, devido a estar contaminada com líquidos tecidulares, e a subsequente colheita deve ser realizada o mais rápido possível sem pressão excessiva dos capilares.

Para garantir a reprodutibilidade dos resultados, para cada amostra de sangue venoso e capilar foram feitos testes em triplicado.

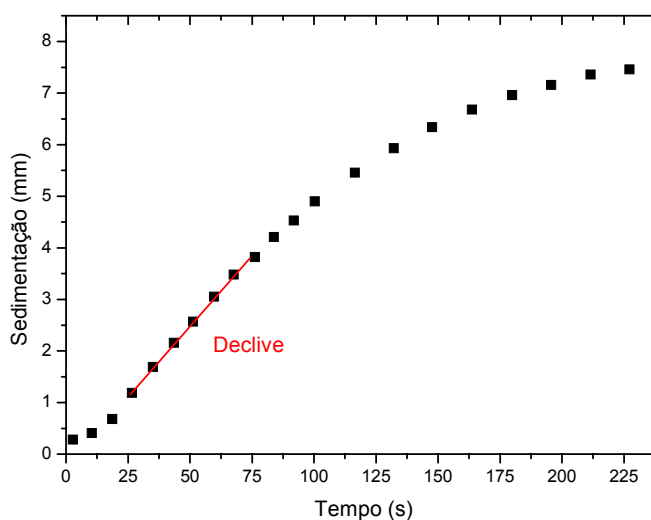
### 4.3.1 Determinação da velocidade de sedimentação eritrocitária

O principal objectivo deste estudo é obter uma correlação entre os valores de VSE medidos em disco,  $VSE_{\text{disco}}$ , e os valores de referência fornecidos pelo laboratório,  $VSE_{\text{ref}}$ , para amostras de sangue venoso. Para tal procedeu-se à parametrização das curvas de sedimentação (posição e velocidade do menisco de eritrócitos) com o objectivo de caracterizar cada uma das curvas obtidas para as várias amostras de sangue incluídas no estudo.

#### I. Primeira correlação: declive da região II da curva de sedimentação

Esta correlação é feita a partir do valor do declive da segunda fase da curva de sedimentação.

A Figura 4.11 representa uma curva de sedimentação obtida através do método em disco para sangue venoso. Através do ajuste linear da região II da curva é determinado um declive,  $m$ , para cada uma das amostras de sangue. O ajuste linear foi feito para um tempo de sedimentação entre os 25 e os 75 segundos, dado que neste intervalo todas as amostras apresentam um comportamento linear.



**Figura 4.11.** Exemplo de uma curva de sedimentação (quadrados a preto) de sangue venoso obtida através do método em disco. Na curva é determinado o valor do declive (linha vermelha) da zona linear da curva.

Se porventura, da comparação dos resultados da parametrização das curvas de sedimentação com os valores de VSE do laboratório,  $VSE_{\text{ref}}$ , não for obtida uma relação entre os valores que possa ser traduzida numa expressão analítica, então a possibilidade de se obter uma boa correlação entre  $VSE_{\text{disco}}$  e  $VSE_{\text{ref}}$  fica comprometida. Comparando

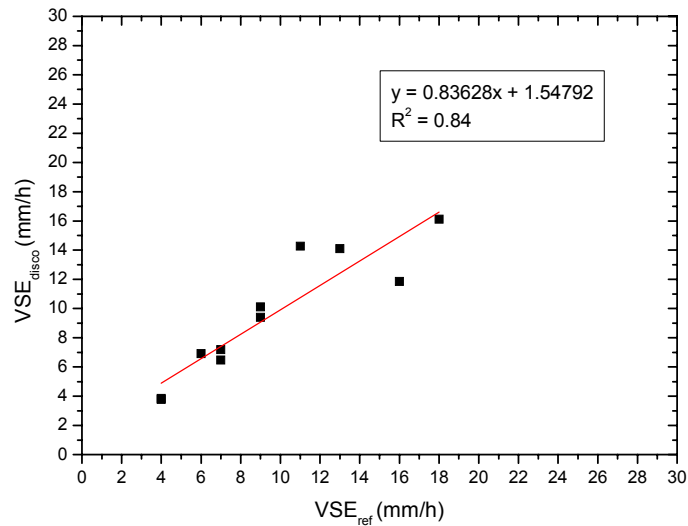
os declives  $m$  com os resultados de  $VSE_{ref}$  observou-se entre eles uma relação aproximadamente linear, a qual será a base da correlação desenvolvida de seguida.

Feita a regressão linear entre os valores de  $m$  e de  $VSE_{ref}$  obteve-se uma regressão linear com declive  $k_1$  e ordenada na origem  $k_2$  para o conjunto de amostras analisadas, a qual é usada para definir a  $VSE_{disco}$  de acordo com a equação seguinte.

$$VSE_{disco} = (m \cdot k_1) + k_2 \quad (4.5)$$

onde  $VSE_{disco}$  é o valor da VSE em unidades de mm/h.

A Figura 4.12 mostra a comparação entre os resultados do método em disco e do método de referência para sangue venoso e o respectivo ajuste.

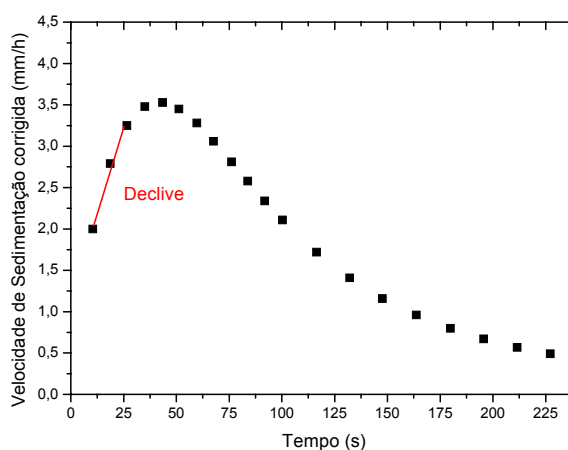


**Figura 4.12.** Curva de calibração entre o método de VSE em disco e o método de referência para 11 amostras de sangue venoso

As próximas correlações foram obtidas a partir da curva de velocidade de sedimentação e seguem o mesmo tratamento de dados descrito anteriormente.

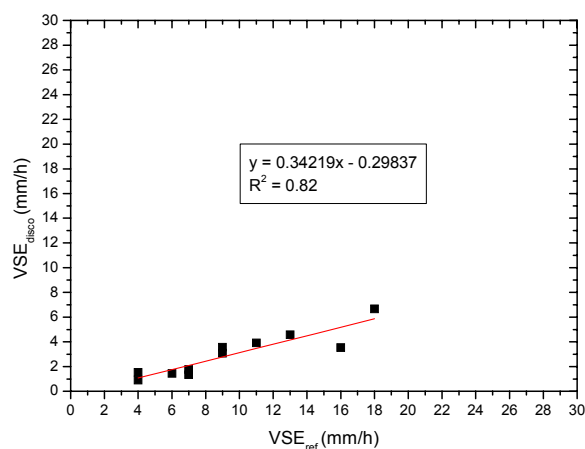
## II. Segunda correlação: declive antes do valor máximo da velocidade de sedimentação

Esta correlação foi definida usando o valor do declive da fase linear inicial da curva de velocidade de sedimentação (linha vermelha da Figura 4.13). Na Figura 4.13 está representada uma curva de velocidade de sedimentação obtida através do método em disco para sangue venoso. O declive da porção linear da curva é determinado para todas as curvas, entre o primeiro ponto obtido para cada curva e os 25 segundos.



**Figura 4.13.** Exemplo de uma curva de velocidade de sedimentação de sangue venoso obtida através do método em disco. É determinado o valor do declive da zona linear antes do valor máximo de velocidade. A zona escolhida para todas as curvas foi entre o primeiro ponto de cada curva e os 25 segundos.

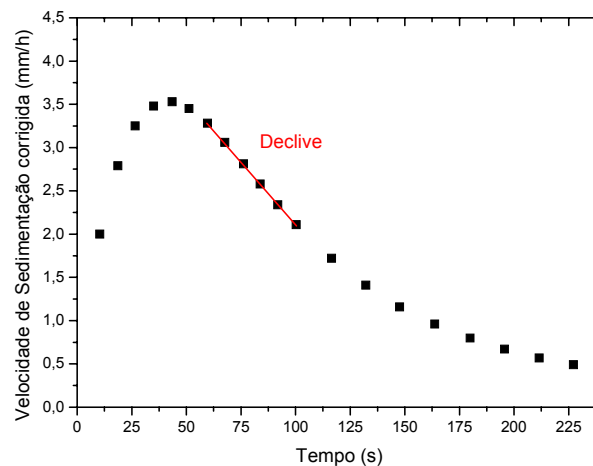
A Figura 4.14 mostra a comparação entre os resultados do método em disco e do método de referência para sangue venoso e o respectivo ajuste.



**Figura 4.14.** Curva de calibração entre o método de VSE em disco e o método de referência, em sangue venoso para 11 amostras. O valor da VSE para o método em disco foi determinado a partir do declive antes do valor da velocidade máxima da curva de velocidade de sedimentação.

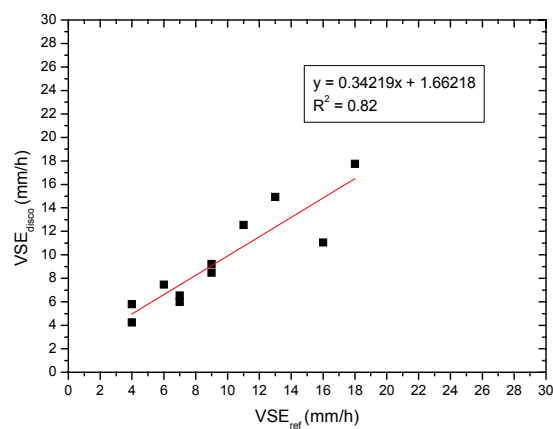
### III. Terceira correlação: declive após o valor máximo da velocidade de sedimentação

Esta correlação representa o declive da fase linear antes da curva de velocidade de sedimentação. Na Figura 4.15 está representada uma curva de velocidade de sedimentação obtida através do método em disco para sangue venoso. O declive da porção linear da curva é determinado para todas as curvas entre os 62,5 e os 100 segundos.



**Figura 4.15.** Exemplo de uma curva de velocidade de sedimentação onde é determinado o valor do declive da zona linear depois do valor máximo de velocidade. A zona escolhida para todas as curvas foi entre os 62,5 e os 100 segundos.

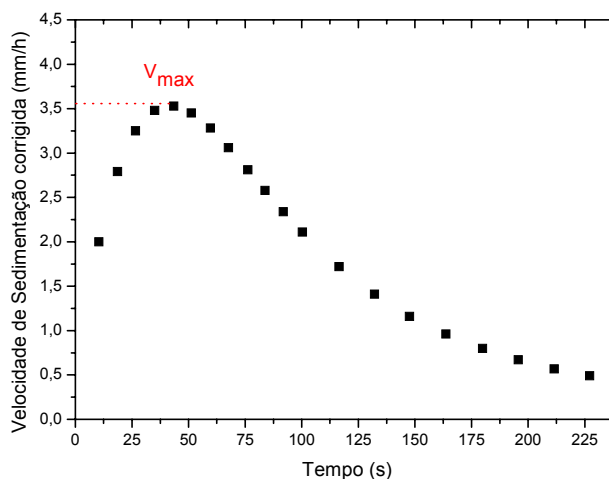
A Figura 4.16 mostra a comparação entre os resultados do método em disco e do método de referência para sangue venoso e o respectivo ajuste.



**Figura 4.16.** Curva de calibração entre o método de VSE em disco e o método de referência, em sangue venoso para 11 amostras. O valor da VSE para o método em disco foi determinado a partir do declive após a velocidade máxima da curva de velocidade de sedimentação.

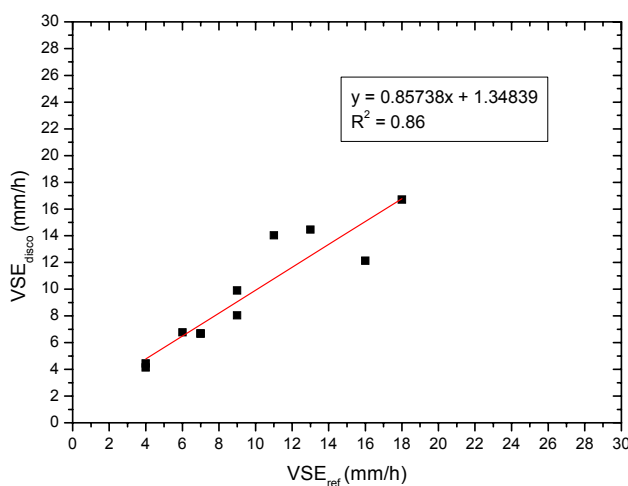
#### IV. Quarta correlação: valor máximo da curva de velocidade de sedimentação

Esta correlação representa o valor máximo da velocidade de sedimentação. Na Figura 4.17 está representada uma curva de velocidade de sedimentação obtida através do método em disco para sangue venoso.



**Figura 4.17.** Exemplo de uma curva de velocidade de sedimentação onde é determinado o valor máximo de velocidade.

A Figura 4.18 mostra a comparação entre os resultados do método em disco e do método de referência para sangue venoso e o respectivo ajuste.



**Figura 4.18.** Curva de calibração entre o método de VSE em disco e o método de referência, em sangue venoso para 11 amostras. O valor da VSE para o método em disco foi determinado a partir do valor de velocidade máxima da curva de velocidade de sedimentação.

Analisando todas as correlações obtidas a que apresenta melhores resultados é a quarta correlação onde é determinado o valor máximo de velocidade de sedimentação. O critério utilizado para escolher a melhor correlação foi o coeficiente de correlação,  $R^2$ , (Tabela 4.5).

**Tabela 4.5.** Diferentes correlações testadas e respectivos valores de coeficientes de correlação ( $R^2$ ).

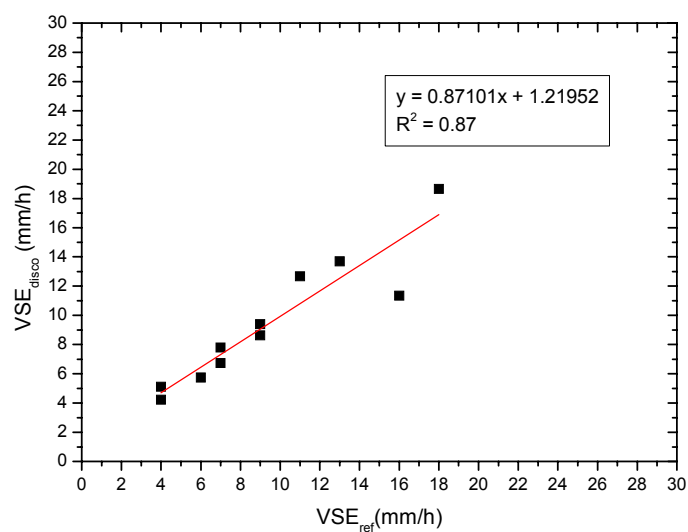
Correlação	$R^2$
I – declive 2ª fase	0.84
II – declive antes $V_{max}$	0.82
III – declive depois $V_{max}$	0.82
IV - $V_{max}$	0.86

Uma vez obtidos vários parâmetros para cada uma das curvas de sedimentação ou valores de outras medições hematológicas, é possível combiná-los para construir correlações mais sofisticadas que traduzem com maior fiabilidade o complexo processo de sedimentação. Dado o hematócrito ter influência no valor de VSE, foi testada mais uma correlação a partir do valor máximo da velocidade de sedimentação,  $V_{max}$ , e do hematócrito,  $Htc$ , através da equação

$$VSE_{disco} = [(V_{max} \cdot Htc) \cdot k_1] + k_2 \quad (4.6)$$

onde  $VSE_{disco}$  é o valor de da VSE em unidades de mm/h,  $V_{max}$  é o valor da velocidade máxima,  $Htc$  é o valor de hematócrito medido em disco (ver detalhes na próxima secção),  $k_1$  é a constante de declive e  $k_2$  é a ordenada na origem.

A Figura 4.19 mostra a comparação entre os resultados do método em disco e do método de referência para sangue venoso e o respectivo ajuste.

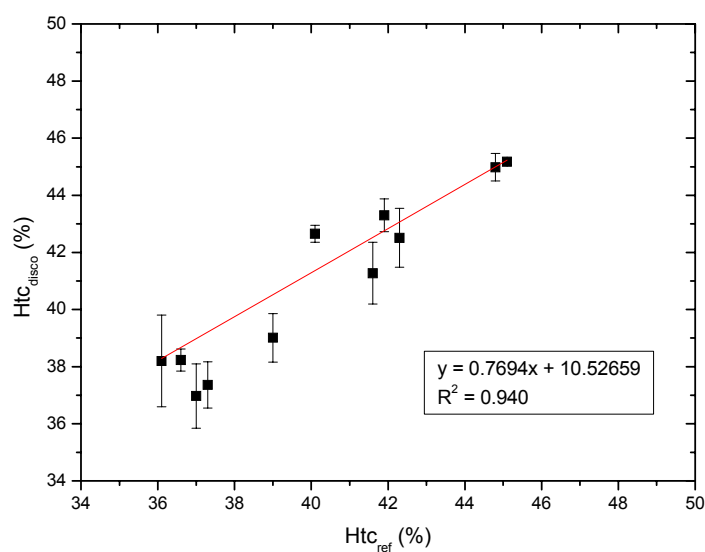


**Figura 4.19.** Curva de calibração entre o método de VSE em disco e o método de referência, em sangue venoso para 11 amostras. O valor da VSE para o método em disco foi determinado a partir do valor máximo da curva de velocidade de sedimentação e do hematócrito.

### 4.3.2 Determinação do hematócrito

As experiências para determinação do hematócrito em disco seguiram o protocolo de rotação descrito na secção 3.4 para sangue venoso e os valores obtidos comparados com um método de referência (microhematócrito), que utiliza sangue anticoagulado com K<sub>3</sub>EDTA.

Na Figura 4.20 está representada a curva de calibração entre os resultados de medição de Htc obtidos pelo método de referência e obtidos pelo método em disco.



**Figura 4.20.** Curva de calibração dos resultados experimentais da medição do hematócrito em disco com o método de referência. Estas experiências seguiram o protocolo de rotação de uma frequência de 100 Hz, como mostra a Figura 3.4. A boa linearidade do  $R^2=0.94$  permitiu efectuar medições com precisão. As barras de erro verticais representam o desvio padrão existente entre os triplicados medidos em disco para cada amostra.

As barras de erro representam o desvio padrão existente entre as medições feitas em triplicado para cada amostra em disco.

Na Tabela 4.6 estão representados os valores de Htc para sangue venoso medido em disco e pelo método de referência para cada amostra e desvio padrão entre eles.

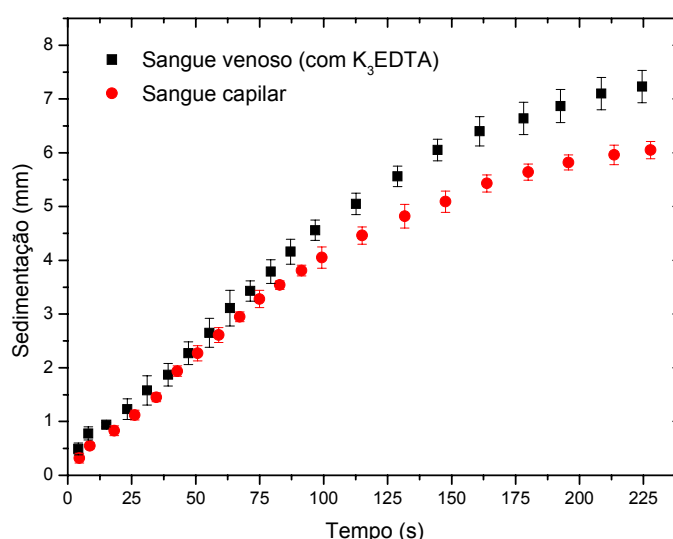
**Tabela 4.6.** Comparação dos resultados de medição de hematócrito para sangue venoso com anticoagulante, obtidos em disco e através do método de referência. A última coluna representa o desvio padrão entre o Htc em disco e de referência.

	Htc <sub>disco</sub> (%)	Htc <sub>ref</sub> (%)	Desvio Padrão ( $\sigma$ )
Amostra 1	37,4	37,3	0,0
Amostra 2	42,6	40,1	1,8
Amostra 3	38,2	36,6	1,2
Amostra 4	38,2	36,1	1,5
Amostra 5	41,3	41,6	0,2
Amostra 6	43,3	41,9	1,0
Amostra 7	42,5	42,3	0,1
Amostra 8	45,2	45,1	0,1
Amostra 9	37,0	37,0	(só 1 ensaio)
Amostra 10	45,0	44,8	0,1
Amostra 11	39,0	39,0	0,0

### 4.3.3 Comparação entre sangue venoso (com $K_3EDTA$ ) e sangue capilar

A determinação da VSE e do Htc em disco foi determinada para sangue capilar e venoso. Uma vez que o método em disco vai utilizar sangue capilar, é importante comparar e perceber o comportamento destes parâmetros para os dois tipos de sangue.

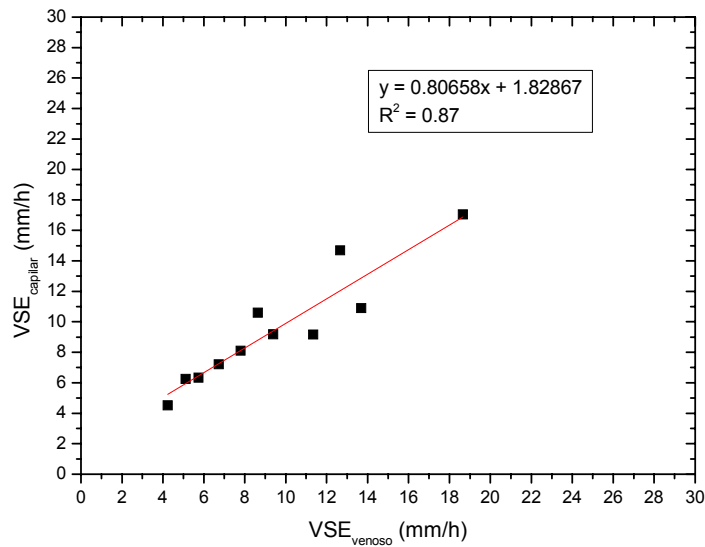
Na Figura 4.21 estão representadas as curvas de sedimentação para sangue capilar e venoso obtido do mesmo dador, a qual é representativa das diferenças observadas para o conjunto de amostras medidas neste estudo. É possível observar que os valores de  $VSE_{disco}$ , para sangue venoso são ligeiramente superiores aos do sangue capilar, sendo que a divergência entre as curvas acentua-se para tempos de sedimentação mais longos próximos da fase de compactação.



**Figura 4.21.** Curvas de sedimentação para sangue venoso com anticoagulante ( $K_3EDTA$ ) e para sangue capilar total, para a mesma amostra de sangue.

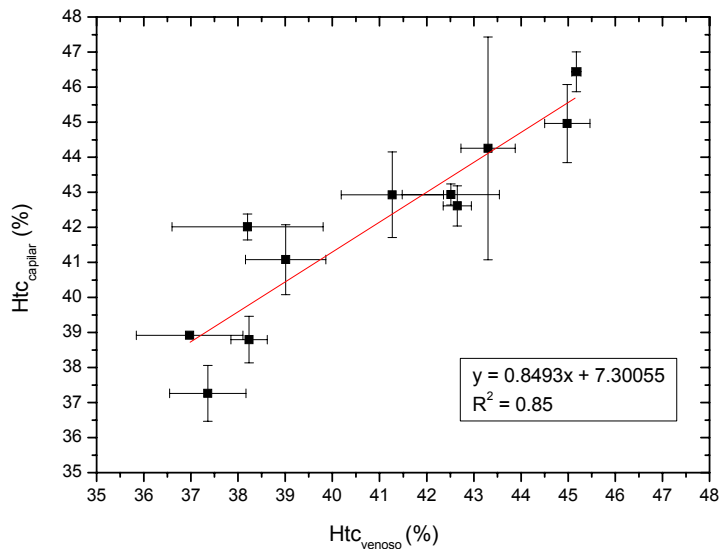
A Figura 4.22 compara o método em disco, para sangue capilar e para sangue venoso com anticoagulante ( $K_3EDTA$ ) para a medição da VSE. Estas medições são relativas à melhor correlação obtida neste trabalho, ou seja, a que diz respeito ao valor máximo da curva de velocidade e do Htc.

A relação linear obtida entre os dois tipos de sangue para o método de medição em disco mostra uma razoável correlação ( $R^2=0.87$ ) para o conjunto de amostras analisadas. Usando os parâmetros do ajuste linear apresentados na Figura 4.22 pode-se escrever uma correlação para os valores de Htc medidos em disco e medidos usando o método de referência.



**Figura 4.22.** Curva de calibração entre os valores de VSE para sangue capilar e para sangue venoso com anticoagulante (K<sub>3</sub>EDTA) para o método em disco.

A Figura 4.23 mostra a curva que compara os resultados de Htc medidos em disco para os dois tipos de amostra. No Anexo 3 estão representados os valores de Htc para sangue venoso e capilar para cada amostra e respectivos desvios padrões.



**Figura 4.23.** Curva de calibração para as medições de Htc obtidas em sangue capilar e em sangue venoso para o método em disco. As barras de erro verticais representam os desvios padrões dos triplicados para cada amostra sangue capilar, e as barras de erro horizontais representam os desvios padrões para sangue venoso.

Os resultados entre os dois tipos de sangue para o método de medição em disco mostram uma razoável correlação ( $R^2=0.85$ ), fazendo com que os valores de Htc para sangue venoso e capilar sejam correlacionáveis.

Não existe diferença significativa entre os valores de Htc para sangue capilar e para sangue venoso (Tabela 4.7). Embora os valores de Htc sejam ligeiramente superiores para o sangue capilar (à exceção da amostra 1), pode-se dizer que os resultados para amostras de sangue capilar e venoso são correlacionáveis.

**Tabela 4.7.** Comparação entre os resultados de Htc das 11 amostras entre sangue capilar e venoso.

<b>Medição do Htc em disco</b>	<b>Sangue Capilar</b>	<b>Sangue Venoso</b>
Amostra 1	37,3	37,4
Amostra 2	42,6	42,6
Amostra 3	38,8	38,2
Amostra 4	42,0	38,2
Amostra 5	42,9	41,3
Amostra 6	44,3	43,3
Amostra 7	42,9	42,5
Amostra 8	46,4	45,2
Amostra 9	38,9	37,0
Amostra 10	45,0	45,0
Amostra 11	41,1	39,0



### **5.1 Comparação da velocidade de sedimentação eritrocitária entre o método em disco e o método convencional**

O tempo de sedimentação para cada uma das fases de agregação, sedimentação e compactação pode variar de pessoa para pessoa e com o método de medição escolhido, por isso a escolha de um intervalo óptimo para medição da VSE não é consensual [35].

De acordo com o descrito na literatura e referenciado na introdução teórica, os valores da velocidade de sedimentação são fortemente afectados pelo método de medição (geometria dos tubos/reservatórios de medição, temperatura, erro de diluição) e pela preparação prévia das amostras de sangue. Sendo a técnica de Westergren o método de referência no qual está convencionado que a VSE corresponde à descida do menisco de eritrócitos após 1 h de sedimentação, o desafio para novas técnicas de medição da VSE será, dentro do seu desenho experimental e de medição, conseguir uma correlação fiável com o método Westergren. Acresce que, o método proposto na tese implica: 1) exposição do sangue a uma elevada área superficial do reservatório de medida; 2) tempo de medição com uma ordem de grandeza abaixo do método de referência; 3) volume de amostra na escala dos  $\mu\text{L}$ . Estes factores adicionais tornam essa correlação menos evidente.

A estratégia definida durante o trabalho experimental passou por duas fases distintas: 1) optimização dos métodos de prototipagem microfluídica e do protocolo de rotação; 2) tratamento e análise de curvas de sedimentação com o objectivo de definir uma boa correlação entre os dados obtidos no sistema em rotação e no método de referência.

Como tal, os dados obtidos em disco, em diferentes regiões das curvas de sedimentação, foram comparados com os valores obtidos pelo teste convencional com intuito de encontrar a melhor correlação.

A primeira hipótese de correlação testada diz respeito ao intervalo correspondente à fase linear da curva de sedimentação. Na medição da VSE num sistema convencional, esta fase é de especial interesse, pois representa a sedimentação rápida dos agregados de eritrócitos sob a influência da força gravítica. Se esta fase for representada graficamente é aproximadamente linear. Quando isso acontece é razoável supor que as forças envolvidas que governam a sedimentação estão a agir num estado estável e completo de agregação [36]. A correlação entre o declive desta fase e os dados medidos pelo teste convencional é satisfatória ( $R^2=0.84$ ), como mostra a Figura 4.12.

A segunda hipótese de correlação recai sobre a primeira fase da curva de velocidade de sedimentação, ou seja, a fase que precede a velocidade máxima de sedimentação. Nesta fase ocorre a agregação eritrocitária e num sistema convencional é desejável que seja o mais curta possível. A razão desse pressuposto é que a medição da VSE é, por razões de conveniência, feita a partir do momento em que o tubo de sedimentação é disposto na vertical, e não a partir do momento em que a agregação está completa e a sedimentação começa. Assim, a primeira fase da formação dos agregados é incluída no resultado final da VSE [36]. No método em disco, nesta fase de separação inicial existe alguma ambiguidade, devido à indefinição da interface dos eritrócitos com o plasma.

Por outro lado, há literatura que refere que o início da agregação dos eritrócitos contém informação qualitativa significativa para a medição da VSE [37]. Assim também nesta fase foi testada uma correlação. A correlação para esta fase piora, ( $R^2=0.82$ ) (Figura 4.14), relativamente à correlação anterior da fase linear.

A terceira correlação proposta foi obtida a partir do intervalo que sucede o ponto de velocidade máxima na curva de velocidade de sedimentação. Nesta fase, os agregados encontram-se bastante próximos uns dos outros e devido a essa interferência mútua e ao diminuto espaço de progressão no reservatório, a velocidade de sedimentação tende a diminuir. De acordo com o descrito na introdução teórica, devido à carga negativa da membrana dos eritrócitos, estes tendem a exercer forças de repulsão entre si. A intensidade da repulsão tende a diminuir com o aumento da concentração de proteínas de fase aguda, nomeadamente fibrinogénio, já que estas proteínas contribuem para a blindagem electrostática dos eritrócitos. Esta diminuição da carga efectiva está inclusive descrita como um factor que potencia a agregação eritrocitária, com consequente influência no valor da VSE. Na fase de empacotamento da curva de sedimentação, devido a uma maior proximidade entre os eritrócitos, o efeito de interacções electrostáticas ganha relevo. Quanto maior forem as forças de repulsão devido a uma menor concentração das proteínas de fase aguda, menor irá ser a facilidade de

empacotamento das células, ou vice-versa. Este foi o princípio que ditou o teste desta correlação, no entanto o factor de correlação obtido de 0.82 (Figura 4.16) foi o mais baixo do estudo.

A quarta hipótese corresponde ao ponto de inflexão na segunda fase da curva de sedimentação, ou seja ao valor da velocidade máxima. Uma característica da segunda fase é a velocidade constante com que as células sedimentam, pensando-se ser um factor determinante na medição da VSE. Nesta correlação foi medida a VSE no período em que as células sedimentam mais rapidamente, ou seja, no valor de velocidade máxima [38]. A taxa de sedimentação nesta fase não é influenciada pela agregação, nem pela compactação das células, estando os agregados já formados e com o seu tamanho completo, pensando-se portanto ser o local mais indicado para medir a VSE [38]. Esta correlação foi a que apresentou um dos coeficientes de correlação mais altos ( $R^2=0.86$ ) (Figura 4.18).

Estando descrito na literatura que o hematócrito tem efeito sobre os resultados da VSE [37], na última correlação testada foram combinados os valores de hematócrito medidos em disco, com os respectivos valores de velocidade máxima de sedimentação. Com efeito observou-se uma melhoria do factor de correlação ( $R^2=0.87$ ), o que corrobora a importância de incluir o hematócrito na análise da velocidade de sedimentação (Figura 4.19). Os factores que podem explicar a influência do hematócrito na VSE são a densidade das células no plasma sanguíneo, o número de células presentes em suspensão e o número de colisões entre as mesmas. Supõe-se que quanto menor o hematócrito, menor é o número de colisões entre os eritrócitos, devido ao significativo aumento do percurso médio livre entre eles. Consequentemente, o processo de sedimentação é facilitado pela ausência de obstáculos. Por outro lado, para hematócritos maiores, apesar do grande número de eritrócitos facilitarem a agregação, o processo de sedimentação é dificultado pelas colisões entre os mesmos, que tendem a retardar a sedimentação [39], e por um menor espaço disponível para progressão. Assim, quanto maior for o valor de hematócrito, mais lenta será a taxa de sedimentação dos eritrócitos, ou vice-versa [38].

Um pressuposto que também pode contribuir para uma melhor compreensão da escolha desta correlação, é o facto de que depois de ser feita a normalização do volume para cada amostra, irá ocorrer um deslocamento na escala da posição radial, ou seja, na altura que as células sedimentaram. Esta normalização de volume é feita devido a pequenos erros de medição do volume da pipeta.

Esta normalização permitirá compreender os fenómenos que ocorrem durante cada um dos testes, independentemente dos volumes em cada amostra. Esta uniformização

em termos de posições radiais permitirá comparar os resultados entre testes e verificar que todos os pontos de inflexão (pontos de velocidade máxima) acontecem aproximadamente no mesmo ponto de sedimentação, mas em tempos diferentes, logo a velocidades diferentes.

O facto dessa velocidade máxima ocorrer na mesma posição radial, ou seja no mesmo ponto de sedimentação, leva-nos a considerar que este ponto poderá ser crucial na medição da VSE.

A Tabela 5.1 mostra que o ponto de velocidade máxima ocorre sempre em posições radiais semelhantes (entre 0,89 e 0,91), à excepção das amostras 3 e 7. O facto da interface descer o mesmo para todas as amostras, mas em tempos diferentes, justifica as diferentes medições de VSE obtidas.

**Tabela 5.1.** Esta tabela mostra a altura de sedimentação dos eritrócitos na estrutura até atingirem o ponto de inflexão ( $h_{pi}$ ), ou seja ponto de velocidade máxima, normalizada para a altura inicial da amostra ( $h_{pi}/h_0$ ), o tempo que as células demoraram a atingir esse ponto, bem como a velocidade nesse ponto.

	$h_{pi} / h_0$	Tempo (s)	Vmax (mm/h)
Amostra 1	0,9	33,05	2,39
Amostra 2	0,91	42,9	2,69
Amostra 3	0,86	44,09	4,15
Amostra 4	0,89	42,52	3,62
Amostra 5	0,9	47,04	2,38
Amostra 6	0,89	31,03	4,66
Amostra 7	0,95	35,21	1,8
Amostra 8	0,91	48,87	2,38
Amostra 9	0,89	44,38	4,05
Amostra 10	0,91	47,34	1,87
Amostra 11	0,88	47,18	3,09

## 5.2 Comparação do hematócrito entre o método em disco e método convencional

Os resultados experimentais da medição do hematócrito em disco, relativamente ao método de referência foram bastante satisfatórios. A boa linearidade do  $R^2=0.94$  (Figura 4.20) permitiu efectuar medições com precisão.

### 5.3 Comparação entre sangue venoso e sangue capilar

Uma vez que o método em disco vai utilizar sangue total capilar, é importante perceber se as medidas de sangue capilar são fiáveis e reprodutíveis e determinar a relação entre os resultados de sangue capilar total e sangue venoso com anticoagulante ( $K_3EDTA$ ).

A utilização de sangue venoso com anticoagulante ( $K_3EDTA$ ), método standard utilizado neste trabalho para calibrar o método em disco, traz algumas vantagens relativamente ao método tradicional, que utiliza a diluição de citrato de sódio, preserva as características morfológicas das células e não interfere com os mecanismos de sedimentação. Além disso, aumenta a estabilidade das células, favorecendo a formação dos agregados e reduzindo o risco de ocorrência de fenómenos anómalos, como a formação de coágulos [40].

Os valores de VSE em disco para sangue venoso são ligeiramente superiores aos obtidos para sangue capilar (Figura 4.21), mas ambos correlacionáveis linearmente. Este fenómeno pode ser explicado por um maior valor de Htc observado nas amostras de sangue venoso e capilar [41], como sumarizado na Tabela 4.7.

Isso pode ser explicado pela concentração de EDTA nos tubos dar origem a resultados de Htc artificialmente mais baixos para sangue venoso [42].

Como o valor de Htc é mais baixo para sangue venoso, é normal que a sedimentação das células seja mais rápida, devido à existência de menos repulsões electrostáticas.

No geral, os resultados destas experiências foram satisfatórios e razoavelmente precisos, observando-se que as amostras de sangue capilar e venoso dão resultados estritamente correlacionáveis (Figura 4.22 e Figura 4.23), para a medição da VSE e do Htc.

Correlações de 0.87 e 0.85 foram obtidas para os valores da VSE e Htc respectivamente, entre sangue venoso e capilar para o método em disco. A relação é boa o suficiente, para questionar a necessidade de utilizar anticoagulante no sangue para medir a VSE em disco, pois o tempo de teste é curto. Supõe-se assim, que a utilização de sangue capilar em disco seja fiável. O único critério que justifique a utilização de sangue com anticoagulante para a medição em disco é obter uma boa reprodutibilidade [37].

## 5.4 Inovações e método em disco

Nas últimas décadas, diversas técnicas de medição da VSE têm sido desenvolvidas e introduzidas na prática clínica laboratorial, para atender às seguintes necessidades: garantir a segurança dos operadores através de sistemas automatizados e fechados; automatizar a medição e otimizar o fluxo de trabalho e de recursos humanos; medir a VSE e executar ao mesmo tempo outro tipo de testes hematológicos; reduzir o tempo e custo do teste, e volume da amostra necessário.

Neste trabalho foi desenvolvido um novo procedimento, que permite uma medição da VSE automática, segura e precisa na prática clínica.

O teste em disco permite uma técnica de colheita muito simples, com uma lanceta descartável e com um volume de apenas 2  $\mu\text{L}$ . A capacidade de colheita de sangue do dedo é essencial em pediatria, em geriatria e doentes oncológicos [42].

Diversos testes têm vindo a ser desenvolvidos recentemente (Tabela 5.2), contribuindo para a segurança e fiabilidade dos procedimentos e resultados da VSE.

**Tabela 5.2.** Tabela de novos métodos e inovações desenvolvidos para medição da VSE.

Método	Fornecedor	Tempo teste (min)	Volume amostra	Determinações: VSE, Htc ou ambos	Correlação com Westergren ( $R^2$ )	Referência
ESR Stat Plus	Hema Technologies	4	25 $\mu\text{L}$	VSE	0,92	[43]
HumaSed 40 instrument	Human	24 or 48	1,5 mL	VSE	0,86	[44], [45]
ESR-Auto Plus	Streck	30	1,2 mL	VSE	0,92	[44]
Ves-Matic Junior / Senior	Diesse	25	1 mL	VSE	0,92	[25], [46]
Mini-Ves	Diesse	20	1 mL	VSE	0,92	[29]
StaRRsed Compact	Mechatronics R&R	30	1,3 mL	VSE	---	[47]

O método em disco apresentado tem algumas vantagens relativamente a estes testes, nomeadamente no volume de amostra utilizado (2  $\mu\text{L}$ ) e no tempo de teste (5-10 minutos). Além disso, nenhuma das inovações apresentadas na Tabela 5.2 realiza a determinação simultânea da VSE e do Htc.

Para validação do método em disco, terão de se realizar mais testes com uma variação dos valores da VSE de 0 a 100 mm/h. Apesar disto, as correlações obtidas para a VSE e Htc são consideradas bastante satisfatórias e com boa concordância.

### **6.1 Conclusões**

Esta dissertação pretendeu dar a conhecer o trabalho desenvolvido em contexto empresarial na Biosurfit S.A., Lisboa. O trabalho constituiu uma experiência muito enriquecedora no que se refere à aquisição de conhecimentos e treino de competências profissionais, permitindo o contacto directo com a realidade empresarial, como complemento à formação académica.

Possibilitou-me experimentar as rotinas inerentes a um projecto de investigação no domínio da ciência aplicada, adquirir uma postura de análise crítica fundamentada, bem como a capacidade de integrar uma equipa multidisciplinar.

Como ponto de partida para este projecto foi realizada uma vasta pesquisa bibliográfica sobre medidas de velocidade de sedimentação eritrocitária, VSE, e hematócrito, Htc, a qual definiu o ponto de partida para este trabalho, que se pretende inovador e competitivo. Uma parte importante do trabalho foi empreendida na aprendizagem de desenho em CAD das estruturas microfluídicas e de várias técnicas de prototipagem de micro dispositivos. Tendo o trabalho sido projectado para uma plataforma centrífuga de microfluidos, a optimização do protocolo de rotação foi necessária para iterativamente com o desenho da estrutura microfluídica se medir em disco a VSE e o Htc

Por questões de conveniência foram efectuadas medidas de VSE e Htc para um grupo de indivíduos saudáveis, dos quais tivemos acesso a amostras de sangue venoso e capilar. Apesar de preliminares, estas experiências permitiram aferir a capacidade discricionária dos testes de VSE e Htc em disco e a respectiva comparação com os resultados medidos em laboratório por uma técnica de referência.

Neste trabalho foram testadas várias hipóteses para obter uma boa correlação entre os valores da VSE e Htc em disco e os valores de referência. A melhor correlação foi obtida na região da curva de velocidade de sedimentação onde as células sedimentam

mais rápido, ou seja, no ponto de velocidade máxima, com inclusão do valor de Htc como parâmetro de correlação. A correlação obtida foi satisfatória ( $R^2=0.87$ ).

Os resultados experimentais da medição do hematócrito em disco, relativamente ao método de referência foram bastante satisfatórios, como se concluiu através da boa linearidade obtida ( $R^2=0.94$ ).

Neste dispositivo, as experiências realizadas demonstraram que o sangue capilar pode ser utilizado nas medições, sendo que os resultados são correlacionáveis com os resultados das experiências, onde foi utilizado sangue venoso com anticoagulante. As correlações obtidas para os valores da VSE e Htc foram de 0.87 e 0.85 respectivamente, entre sangue venoso e capilar para o método em disco.

Em resumo, os testes efectuados durante a tese comprovaram que a medição da VSE e do Htc em disco, fazendo uso da aceleração dos processos de sedimentação devido ao campo centrífugo aplicado, é uma técnica promissora para ensaios clínicos em hematologia. Como vantagens adicionais são de referir o tempo reduzido do teste (inferior a 10 min) e o volume de sangue utilizado (aproximadamente 2  $\mu$ L) recolhido de forma pouco intrusiva (sangue capilar). Combinado com o portfólio tecnológico da Biosurfit, o qual está centrado em dispositivos descartáveis de baixo custo para testes clínicos, medidos numa plataforma portátil, o presente trabalho constitui um contributo importante para a estratégia da empresa.

## 6.2 Trabalho futuro

As experiências realizadas confirmaram o conceito de determinação da velocidade de sedimentação e hematócrito em plataforma centrífuga. Como trabalho futuro, destaca-se a necessidade de otimizar os procedimentos de medição para um maior número de amostras, com valores mais abrangentes de VSE e Htc, incluindo valores que estejam fora dos limites normais e amostras provenientes de indivíduos com patologias específicas. O estudo das curvas de sedimentação para amostras que apresentem valores extremos de VSE e/ou Htc será importante para aferir se os regimes de sedimentação identificados na tese se mantêm. Porventura mais do que uma correlação terá de ser adoptada para estabelecer a equivalência dos resultados em disco com os da técnica convencional, dependendo do intervalo de VSE e Htc.

Estando descrita na literatura a influência do hematócrito na velocidade de sedimentação é imperativo medir as curvas de sedimentação para amostras com a mesma velocidade de sedimentação e diferentes hematócritos, com o objectivo de estabelecer uma correlação entre ambos.

O desenvolvimento e validação do dispositivo, perspectiva a produção em grande escala e sua comercialização. O sistema irá permitir a determinação da VSE e Htc em tempo real e a baixo custo. É um sistema portátil, que utiliza quantidades reduzidas de amostras. Os resultados devem ter a mesma fiabilidade e precisão dos sistemas de análises clínicas, existentes actualmente nos laboratórios de análises.



## Referências Bibliográficas

---

- [1] G. S. Fiorini, and D. T. Chiu, "Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application," *Biotechniques*, vol. 38, no. 3, pp. 429-46, Mar, 2005.
- [2] S. Haeberle, and R. Zengerle, "Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications," *Lab Chip*, vol. 7, no. 9, pp. 1094-110, Sep, 2007.
- [3] M. M. a. G. Kellogg, "LabCD: A centrifuge-based microfluidic platform for diagnostics," *Proc. SPIE*, 3259, pp. 80-93, 1998.
- [4] M. Madou, J. Zoval, G. Jia *et al.*, "Lab on a CD," *Annu Rev Biomed Eng*, vol. 8, pp. 601-28, 2006.
- [5] S. H. T. Brenner, R. Zengerle and J. Ducreé, "Continuous Centrifugal Separation of Whole Blood on a Disk, Proceedings of the mTAS," *Royal Society of Chemistry*, pp. 566-568, 2004.
- [6] S. H. Jens Ducreé, Sascha Lutz, Sarah Pausch, Felix von Stetten and Roland Zengerle, "The centrifugal microfluidic Bio-Disk platform" *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 17, pp. S103–S115, 2007.
- [7] M. G. J. Steigert, T. Brenner, K. Mittenbuhler, T. Nann, J. Ru" he, I. Moser, S. Haeberle, L. Riegger, J. Riegler, W. Bessler, R. Zengerle and J. Ducreé, "Integrated Sample Preparation, Reaction and Detection on a High-Frequency Centrifugal Microfluidic Platform," *JALA*, vol. 10, no. 5, pp. 331-34, 2005.
- [8] S. H. Jens Ducreé, Thilo Brenner, Thomas Glatzel and Roland Zengerle, "Patterning of flow and mixing in rotating radial microchannels " *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 2, no. 2, pp. 97-105, 2005.
- [9] T. B. Jens Ducreé, Stefan Haeberle, Thomas Glatzel and Roland Zengerle, "Multilamination of flows in planar networks of rotating microchannels," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 2, no. 1, pp. 78-84, 2006.
- [10] S. Haeberle, T. Brenner, R. Zengerle *et al.*, "Centrifugal extraction of plasma from whole blood on a rotating disk," *Lab Chip*, vol. 6, no. 6, pp. 776-81, Jun, 2006.
- [11] J. Kim, S. Hee Jang, G. Jia *et al.*, "Cell lysis on a microfluidic CD (compact disc)," *Lab Chip*, vol. 4, no. 5, pp. 516-22, Oct, 2004.
- [12] A. T. Kellogg GJ, Carvalho BL, Duffy DC, Sheppard NF., "Centrifugal microfluidics: applications," pp. pp. 239–42, 2000.

- [13] M. G. J. Steigert, T. Brenner, L. Riegger, J. Harter, R. Zengerle and J. Ducrée, "Fully integrated whole blood testing by real-time absorption measurement on a centrifugal platform," *Lab Chip*, no. 6, pp. 1040-1044, 2006.
- [14] L. Riegger, M. Grumann, J. Steigert *et al.*, "Single-step centrifugal hematocrit determination on a 10- $\mu$ s processing device," *Biomed Microdevices*, vol. 9, no. 6, pp. 795-9, Dec, 2007.
- [15] J. S. L. Riegger, S. Lutz, W. Streule, R. Zengerle, and J. Ducrée, "Automated hematocrit measurement and patient data labeling by a commercial DVD-writer with a low-cost optical add-on," pp. 1249-1251, 2007.
- [16] "ICSH recommendations for measurement of erythrocyte sedimentation rate. International Council for Standardization in Haematology (Expert Panel on Blood Rheology)," *J Clin Pathol*, vol. 46, no. 3, pp. 198-203, Mar, 1993.
- [17] M. D. Malcolm L. Bridgen, B.C., "Clinical utility of the erythrocyte sedimentation rate," *American Family Physician*, no. 60, pp. 1443-50, 1999.
- [18] ICSH, "Reference method for the erythrocyte sedimentation rate (ESR) test on human blood," *J. clin. Pathol.*, no. 26, pp. 301-302, 1973.
- [19] B. S. B. John A. Koepke, Elkin Simson, Onno W. van Assendelft, "Reference and Selected Procedure for the Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) Test; Approved Standard - Fourth Edition " *NCCLS global consensus standard*, vol. 20, no. 27, 2000.
- [20] C. Saadeh, "The erythrocyte sedimentation rate: old and new clinical applications," *South Med J*, vol. 91, no. 3, pp. 220-5, Mar, 1998.
- [21] D. A. Wilson, "Erythrocyte Sedimentation Rate," *Immunologic Tests*, pp. 777-778.
- [22] S. W. M Amjad Hameed, "Physiological basis and clinical utility of erythrocyte sedimentation rate," *Pak J Med Sci*, vol. 22, no. 2, pp. 214-218, 2006.
- [23] J. S. Olshaker, and D. A. Jerrard, "The erythrocyte sedimentation rate," *J Emerg Med*, vol. 15, no. 6, pp. 869-74, Nov-Dec, 1997.
- [24] L. E. Bottiger, and C. A. Svedberg, "Normal erythrocyte sedimentation rate and age," *Br Med J*, vol. 2, no. 5544, pp. 85-7, Apr 8, 1967.
- [25] P. C. John A. Koepke, Linda Johnson, "The evolution erythrocyte sedimentation rate methodology," *Labmedica, Hematology*, 1990.
- [26] WHO, "Guidelines on standart operating procedures for haematology," 2000
- [27] L. J. Wintrobe MM, "A standarized technique for the blood sedimentation test," *Am J Med Sci*, no. 189, pp. 102-15, 1935.
- [28] B. S. Bull, and J. D. Brailsford, "The zeta sedimentation ratio," *Blood*, vol. 40, no. 4, pp. 550-9, Oct, 1972.

- [29] D. F. B. Marc R. Happe, David P. Dooley, Thomas A. Rennie, Frederick T. Murphy, Thomas J. Casey, and John A. Ward, "Validation of the Diesse Mini-Ves Erythrocyte Sedimentation Rate Analyzer Using the Westergren ESR Method," *Am J Clin Pathol*, no. 118, pp. 14-17, 2002
- [30] A. K. Yogesh Shah, "Erythrocyte Sedimentation Rate: Evaluation of a Micro Technique," *Journal of the National Medical Association*, vol. 74, no. 9, 1982.
- [31] N. I. R. A. A Aristov, "Optimization and automation of Erythrocytes Sedimentation Rate measurements," *IEEE Section 5: Modern Level of Technical nd Information Means Usage in Helth Services*, pp. 113-115, 2002.
- [32] M. D. Brian S. Bull, John A. Koepke, M.D., Elkin Simson, M.B., Ch.B., M.Med., Onno W. van Assendelft, M.D., Ph.D., "Procedure for Determining Packed Cell Volume by the Microhematocrit Method; Approved Standard—Third Edition," *NCCLS global consensus standard*, vol. 20, no. 18.
- [33] B. H. D. B.S. Bull, K. Fujimoto, B. Houwen, W. Groner, J.A. Koepke, S.M. Lewis, R.M. Rowan, N. Tatsumi, O.W. van Assendelft, L. van Hove, "Recommended method for the determination of packed cell volume by centrifugation," *World Health Organization*, 2000.
- [34] H. Becker, and C. Gartner, "Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems," *Anal Bioanal Chem*, vol. 390, no. 1, pp. 89-111, Jan, 2008.
- [35] J. A. Koepke, "Welcome innovation in erythrocyte sedimentation testing," *Am J Clin Pathol*, vol. 118, no. 1, pp. 11-2, Jul, 2002.
- [36] J. B. Dawson, "The E.S.R in a new dress," *British Medical Journal*, pp. 1967-1704, 1960.
- [37] W. T. Hung, A. F. Collings, and J. Low, "Erythrocyte sedimentation rate studies in whole human blood," *Phys Med Biol*, vol. 39, no. 11, pp. 1855-73, Nov, 1994.
- [38] A. C. E. M. Dorothy Rourke, "A method for correcting the Erythrocyte sedimentation rate for variations in the cell volume percentage of blood," *From the Thorndike Memorial Laboratory, Boston City Hospital; the Medical Research Laboratories, Beth Israel Hospital; and the Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston*, pp. 545-559, 1929.
- [39] G. S. M. A. V. C. G. A. Marcondes, "Agregação e Sedimentação Eritrociária utilizando VHS (Velocidade de Hemossedimentação) e Espectrofotometria UV-Vis," *Revista Matéria*, vol. 12, no. 1, pp. 206-214, 2007.
- [40] M. P. a. E. Piva, "Erythrocyte Sedimentation Rate. Use of Fresh Blood for Quality Control," *Am J Clin Pathol*, no. 117, pp. 621-626, 2002.

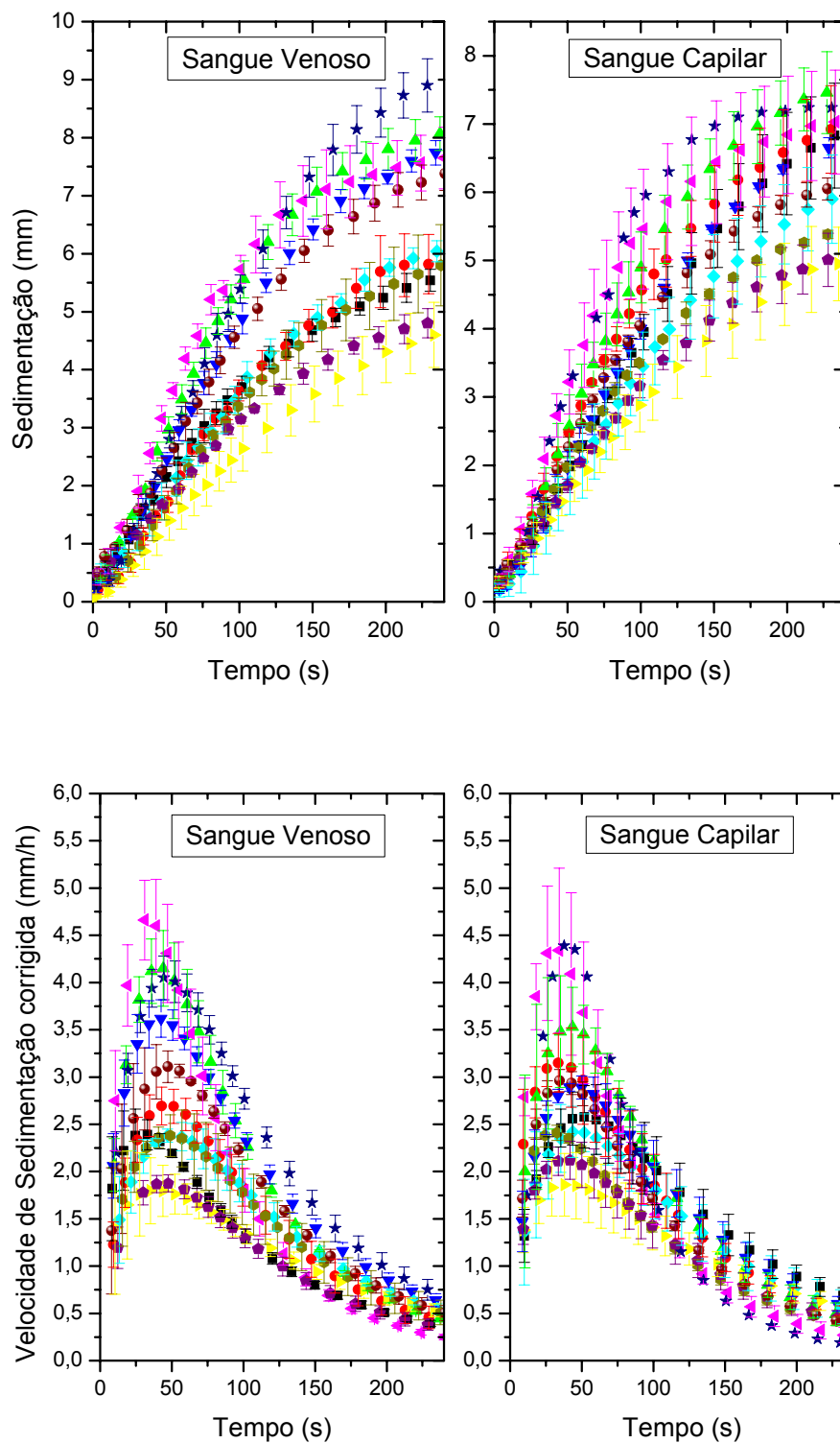
- [41] B. A. B. a. P. I. Hill, "A micromethod for the erythrocyte sedimentation rate suitable for use on venous or capillary blood," *Haematology Department, Children's Hospital, Ladywood Middleway, Birmingham*, pp. 1118-1120, 1980.
- [42] B. A. B. J. Stuart, and D. R. Prangnell, "Capillary blood collection in haematology," *J. clin. Path.*, no. 27, pp. 869-874, 1974.
- [43] H. E. D. LLoyd, "Estimation of the Erythrocyte Sedimentation Rate of Capillary Blood. Description of a new method.," *Ann. rheum. Dis.*, no. 17, pp. 234-239, 1958.
- [44] A. K. Yogesh Shah, "Erythrocyte Sedimentation Rate: Evaluation of a Micro Technique," *Journal of the National Medical Association*, vol. 74, no. 9, pp. 887-889, 1982.
- [45] D. C. Suresh G. Shelat, Susan Shibutani,, "Differences in Erythrocyte Sedimentation Rates Using the Westergren Method and a Centrifugation Method," *Am J Clin Pathol* pp. 127-130, 2008.
- [46] M. D. Johnny Ndoni Mahlangu, "Three-Way Comparison of Methods for the Measurement of the Erythrocyte Sedimentation Rate," *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, no. 22, pp. 346-352, 2008.
- [47] "Manual de Operação HumaSed40, Analisador de acesso randômico para a determinação da Velocidade Hemossedimentação."
- [48] J. S. M Caswell, "Assessment of Diesse Ves-matic automated system for measuring erythrocyte sedimentation rate," *J Clin Pathol*, no. 44, pp. 946-949, 1991.
- [49] "ESRI 109000 StaRRsed Compact Fully Automated Sedimentation Rate Analyzer " *Mechatronics R&R*, pp. 1-2, 2004.

# **Anexos**

---



# Anexo 1



Curvas de sedimentação e de velocidade de sedimentação para 11 amostras em sangue venoso com  $K_3EDTA$  e sangue capilar. Para cada amostra o teste foi repetido em triplicado; cada curva representa a média dos triplicados e as barras de erro verticais representam o desvio padrão entre elas.



## Anexo 2

---

Tabela de comparação dos resultados de medição da VSE para sangue venoso com anticoagulante e para sangue capilar obtidos em disco, e para sangue venoso com anticoagulante para o método de referência.

Medição da VSE	Método em disco (mm/h)		Método ref. (mm/h)
	VSE <sub>capilar</sub>	VSE <sub>venoso</sub>	VSE <sub>venoso</sub>
Amostra 1	6	6	6
Amostra 2	11	9	9
Amostra 3	11	14	13
Amostra 4	9	11	16
Amostra 5	7	7	7
Amostra 6	17	19	18
Amostra 7	5	4	4
Amostra 8	8	8	7
Amostra 9	15	13	11
Amostra 10	6	5	4
Amostra 11	9	9	9



## Anexo 3

Tabela de comparação entre os resultados de hematócrito obtidos em disco para sangue venoso e sangue capilar. Indica os desvios padrões entre os triplicados feitos para cada amostra, tanto em sangue venoso como em sangue capilar. A última coluna representa o desvio padrão existente entre os resultados de hematócrito obtidos para sangue venoso e para sangue capilar.

Medição do Htc em disco	Htc <sub>venoso</sub> (%)	Desvio padrão ( $\sigma$ ) entre triplicados para sangue venoso	Htc <sub>capilar</sub> (%)	Desvio padrão ( $\sigma$ ) entre triplicados para sangue capilar	Desvio padrão ( $\sigma$ ) entre sangue venoso e capilar
Amostra 1	37,4	0,8	37,3	0,8	0,1
Amostra 2	42,6	0,3	42,6	0,6	0,0
Amostra 3	38,2	0,4	38,8	0,7	0,4
Amostra 4	38,2	1,6	42,0	0,4	2,7
Amostra 5	41,3	1,1	42,9	1,2	1,2
Amostra 6	43,3	0,6	44,3	3,2	0,7
Amostra 7	42,5	1,0	42,9	0,3	0,3
Amostra 8	45,2	0,1	46,4	0,6	0,9
Amostra 9	37,0	1,1	38,9	(só 1 ensaio)	1,4
Amostra 10	45,0	1,1	45,0	1,1	0,0
Amostra 11	39,0	0,9	41,1	1,0	1,5
<b>Média</b>		0,8		0,9	0,8