

# **Desenvolvimento de um Método Semi-Automático em MatLab para Calcular o Coeficiente de Dispersão de Eritrócitos em Microcanais**

**Ana Rita Afonso Curralo**

Relatório Final do Trabalho de Projecto apresentado à  
**Escola Superior de Tecnologia e de Gestão  
Instituto Politécnico de Bragança**

para obtenção do grau de Mestre em  
**Tecnologia Biomédica**

Novembro de 2013



# **Desenvolvimento de um Método Semi-Automático em MatLab para Calcular o Coeficiente de Dispersão de Eritrócitos em Microcanais**

**Ana Rita Afonso Curralo**

Relatório Final do Trabalho de Projecto apresentado à  
**Escola Superior de Tecnologia e de Gestão  
Instituto Politécnico de Bragança**

para obtenção do grau de Mestre em  
**Tecnologia Biomédica**

Orientadores:  
**Dr<sup>a</sup>. Ana Isabel Pereira  
Dr. Rui Lima  
Dr<sup>a</sup>. Carla Fernandes**

Este Relatório final do Trabalho de Projecto inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri.

Novembro de 2013

*Este Relatório Final do Trabalho de Projeto está escrito de acordo com o antigo acordo ortográfico.*

*"Os avanços da medicina proporcionam maior longevidade  
e melhor qualidade de vida ao ser humano.  
Mas, sem o contributo da Engenharia Biomédica  
esta afirmação poderia ser contestada."*

*Anónimo*



*Aos meus fantásticos pais e à minha inigualável irmã  
que sempre me apoiaram e ajudaram de forma incondicional.  
O meu sincero Obrigado!*





# Agradecimentos

Este trabalho representa diversas realizações pessoais que, certamente, sem o contributo de algumas pessoas muito dificilmente teria conseguido chegar a qualquer resultado digno de menção.

As minhas primeiras palavras de agradecimento têm de ir, forçosamente, para os meus pais. Possivelmente não teria conseguido realizar-me pessoalmente em tantos níveis sem o amor, carinho, dedicação e todo o apoio que sempre me deram ao longo dos anos. Desde muito cedo me concederam liberdade para escolher o meu caminho, sempre apoiada por eles, e, simultaneamente, me inculcaram o sentido de responsabilidade que essa liberdade acarretava. Obrigado por sempre acreditarem e confiarem em mim. Por estas razões, e muitas outras, tenho muito orgulho deles e penso que eles sentem o mesmo por mim.

À minha irmã, uma grande amiga, que soube presentear-me com paciência e respeito em todos os momentos, especialmente os mais difíceis, desta caminhada. Desde a compreensão dos dissabores que suportou diversas vezes sem ter qualquer culpa, à privação de muito tempo na companhia da sua irmã, mas nunca esteve ausente transmitindo, incansavelmente, força e apoio.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Professora Doutora Ana Isabel Pereira, a quem eu reconheço a oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transpira sabedoria. O incentivo incondicional demonstrado em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos. A minha admiração pela sua

serenidade, capacidade de trabalho e pelo seu dom no ensino, inibindo sempre a vaidade em prol da simplicidade e eficiência. O meu muito obrigado por toda a ajuda, atenção, dedicação e apoio com que me brindou nesta etapa tão importante na minha vida e a disponibilidade e incentivo em abrir portas a novas oportunidades.

Agradeço também ao Professor Doutor Rui Lima, pela sua prontidão em orientar-me neste trabalho, pela sua forma entusiasta e prazenteira com que sempre se disponibilizou em debater assuntos relacionados com este trabalho, transmitindo sempre conhecimentos com rigor científico e sugerindo incansavelmente novas ideias e reptos que coadjuvaram neste trabalho.

De igual modo, agradeço imenso à Professora Doutora Carla Fernandes pela orientação e pelas imensas e valiosas sugestões ao longo destes meses de trabalho. Toda a sua disponibilidade em qualquer momento, o seu incentivo e a sua ajuda constante, principalmente quando surgiam incertezas, foram um contributo bastante importante no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas e amigos com que me cruzei nesta escola de conhecimento que é o Instituto Politécnico de Bragança, um obrigado pelas lições de vida que me ensinaram.

Quero expressar o meu sincero agradecimento à minha colega e amiga Telma Rocha pelo apoio, ajuda e incentivo em todos os instantes e pela companhia e paciência ao longo do tempo.

Aos meus amigos que me ajudaram a crescer como pessoa e com quem partilho muitos momentos únicos, em especial ao Pedro Silva e à Andreia Ribeiro, obrigado.

Por detrás das minhas realizações pessoais, além de um notório esforço próprio, esconde-se um número enorme de contribuições directas e indirectas, apoios, sugestões, comentários e críticas vindos de muitas pessoas, bem como os que contribuíram para o ponto de partida deste trabalho.

# Resumo

A incidência de diversas patologias no sistema cardiovascular constitui uma elevada importância na compreensão e antevisão do comportamento dos elementos sanguíneos.

O objectivo principal deste trabalho é desenvolver um método semi-automático para o cálculo do coeficiente de dispersão dos eritrócitos. O coeficiente de dispersão permite-nos avaliar o comportamento do escoamento do eritrócito, relativamente à sua flutuação no fluido. Desta forma é possível substituir os métodos manuais existentes por um método mais simples e portanto mais fácil de utilizar, bastante mais rápido de implementar e mais eficaz, diminuindo a possibilidade de ocorrência de erros. Para isso foi necessário efectuar o seguimento de elementos (partículas fluorescentes e eritrócitos humanos) ao longo de uma sequência de imagens captadas no centro de um microcanal produzido em *polidimetilsiloxano*, através do *software Image J* para a obtenção dos valores do deslocamento radial. Para o cálculo do coeficiente de dispersão foi desenvolvido um método em programação *MatLab*.

O método desenvolvido foi aplicado em diversos segmentos de imagens e foi comparado com um método manual aplicado que recorre ao *Microsoft Office Excel* para o cálculo do coeficiente de dispersão. Após a análise dos diversos resultados, foi verificado que o método semi-automático desenvolvido efectuou correctamente o cálculo do coeficiente de dispersão de elementos sanguíneos em microcanais.

O método desenvolvido foi aplicado na sequência de imagens de forma a analisar a influência

de uma bifurcação, divergente e convergente, no comportamento dos elementos existentes nos fluidos em questão. Para o caso das partículas fluorescentes em água pura não se verificou qualquer alteração dos valores do coeficiente de dispersão, o que significa que a montante e a jusante das bifurcações, estas não têm qualquer influência no seu comportamento. Contrariamente, no caso dos eritrócitos em  $D \times 40$  verificou-se que após a presença de uma bifurcação convergente ocorre um aumento dos valores do coeficiente de dispersão.

**Palavras Chave:** Coeficiente de dispersão, Método semi-automático, Seguimento de elementos.

# Abstract

The incidence of various pathologies in the cardiovascular system constitute a high importance on understanding and foresight of the behavior of blood elements.

The main objective of this work is to develop an semi-automated method to calculate the dispersion coefficient. The dispersion coefficient allows us to evaluate the behavior of the erythrocyte flow, relatively to it fluctuation in the fluid. In this way it's possible to replace the existing manual methods by a method simpler and therefore easier to use, much faster to implement and more effective, reducing the possibility of occurring errors. For that it was necessary to perform the tracking of the elements (fluorescent particles and human erythrocytes) over an image sequence captured in the center of polydimethylsiloxane microchannel, through the Image J software to obtain the values of radial displacement. To calculate the dispersion coefficient a method was developed in MatLab programming.

The method has been applied in various segments of images and has been compared with a manual method applied that uses the Microsoft Office Excel to calculate the dispersion coefficient. After the analysis of the various results, it was verified that the semi-automated method developed has performed correctly the calculation of the dispersion coefficient of blood components in microchannels.

The developed method was applied in the image sequence in order to analyze the influence of a bifurcation, divergent and convergent, in the behavior of the existing elements in the fluids in

question. For the case of fluorescent particles in pure water there was no alteration of coefficient of dispersion, which means that the upstream and downstream of bifurcations, they have no influence on they behavior. Contrary, in the case of erythrocytes in  $D \times 40$  it was verified that after the presence of a bifurcation convergent there is an increase of the coefficient of dispersion.

**Key Words:** Dispersion coefficient, Semi-automated method, Tracking elements.

# Conteúdo

<b>Conteúdo</b>	<b>xi</b>
<b>Índice de Tabelas</b>	<b>xv</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xv</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>xvii</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Motivação . . . . .	1
1.2 Objectivos . . . . .	2
1.3 Estrutura do relatório . . . . .	3
<b>2 Revisão Bibliográfica</b>	<b>5</b>
2.1 Reologia do sangue na microcirculação . . . . .	5
<b>3 Hemodinâmica</b>	<b>9</b>
3.1 Introdução . . . . .	9
3.2 Descrição do sistema cardiovascular . . . . .	10

3.3	Sistema vascular . . . . .	11
3.4	Estrutura da microcirculação . . . . .	14
3.5	Sangue . . . . .	17
3.5.1	Constituintes do sangue . . . . .	17
3.6	Comportamento dos fluidos . . . . .	22
3.6.1	Fluxo sanguíneo . . . . .	23
3.6.2	Reologia do sangue . . . . .	24
3.6.3	Comportamento reológico na microcirculação . . . . .	28
<b>4</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>31</b>
4.1	Litografia suave . . . . .	31
4.2	Sistema micro-PIV confocal . . . . .	33
4.3	Seguimento de objectos . . . . .	35
4.3.1	Metodologias para detecção e seguimento de objectos . . . . .	36
4.3.2	Identificação manual dos eritrócitos - <i>Mtrack J</i> . . . . .	37
4.4	MatLab . . . . .	39
<b>5</b>	<b>Método Semi-Automático</b>	<b>41</b>
5.1	Introdução . . . . .	41
5.2	Métodos Utilizados . . . . .	43
5.2.1	Detecção e seguimento dos elementos nos segmentos de imagens . . . . .	45
5.2.2	Cálculo do Coeficiente de Dispersão ( $D_{yy}$ ) . . . . .	49
<b>6</b>	<b>Apresentação e Discussão dos Resultados</b>	<b>53</b>
6.1	Comparação <i>MatLab Vs Excel</i> . . . . .	53
6.1.1	Partículas fluorescentes em água pura . . . . .	54
6.1.2	Eritrócitos humanos em $D \times 40$ . . . . .	56
6.2	Determinação do Coeficiente de Dispersão ( $D_{yy}$ ) . . . . .	58
6.2.1	Partículas fluorescentes em água pura . . . . .	58



---

6.2.2	Eritrócitos humanos em $D \times 40$ . . . . .	62
6.2.3	Partículas fluorescentes em água pura Vs Eritrócitos humanos em $D \times 40$ . . . . .	65
<b>7</b>	<b>Conclusões e Trabalho Futuro</b> . . . . .	<b>69</b>
7.1	Conclusões . . . . .	69
7.2	Trabalho futuro . . . . .	71
	<b>Bibliografia</b> . . . . .	<b>73</b>
	<b>Anexos</b> . . . . .	<b>i</b>
	Anexo A . . . . .	i
	Anexo B . . . . .	vii
	Anexo C . . . . .	xix



# Lista de Tabelas

3.1	Concentração das células sanguíneas (Adaptado de [Lima, 2007]). . . . .	18
3.2	Principais factores determinantes da deformabilidade eritrocitária [Silva, 1984]. . . . .	27
5.1	Lista dos vídeos seleccionados, respectivo fluido presente no vídeo e zona de observação.	44
7.1	Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 1 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração). . . . .	vii
7.2	Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 1 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração). . . . .	viii
7.3	Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 2 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração). . . . .	ix
7.4	Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 2 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração). . . . .	x
7.5	Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 2 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração). . . . .	xi
7.6	Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 3 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração). . . . .	xii
7.7	Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 4 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração). . . . .	xiii

---

7.8	Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 5 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração). . . . .	xiv
7.9	Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 6 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração). . . . .	xv
7.10	Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 7 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração). . . . .	xvi
7.11	Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 8 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração). . . . .	xvii
7.12	Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 9 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração). . . . .	xviii

# Lista de Figuras

3.1	Ilustração da circulação pulmonar e da circulação sistémica [Seeley et al., 2007]. . . . .	12
3.2	Histologia de um vaso sanguíneo (Adaptado de [Seeley et al., 2007]). . . . .	13
3.3	Rede capilar (Adaptado de [Seeley et al., 2007]). . . . .	15
3.4	Ilustração dos componentes do sangue (Adaptado de [Seeley et al., 2007]). . . . .	18
3.5	Dimensão e forma de um eritrócito humano [Lima et al., 2012]. . . . .	20
3.6	Variação da tensão de corte em função do gradiente de velocidade. . . . .	22
3.7	Variação da velocidade ao longo da rede vascular [Seeley et al., 2007]. . . . .	24
4.1	Processo de fabricação do modelo em PDMS (Adaptado de [Novais, 2012]). . . . .	33
4.2	Comparação entre a microscopia convencional (A) e a confocal (B) [Lima et al., 2013]. . . . .	34
4.3	Instalação experimental de um sistema micro-PIV confocal [Lima et al., 2013]. . . . .	35
4.4	Marcação da trajectória dos eritrócitos ao longo do microcanal com o <i>software Image J</i> . . . . .	38
5.1	Geometria completa dos microcanais (a), <i>Detail A</i> (b) e <i>Detail B</i> (c) mostram a geometria real das bifurcações e a geometria utilizada nas simulações. Todas as dimensões estão em micrometros ( $\mu m$ ) [Leble et al., 2011a]. . . . .	42
5.2	Comparação do número de elementos nos segmentos de imagens nos diferentes fluidos em estudo. . . . .	46

5.3	Imagem obtida no <i>Image J</i> do seguimento dos vários eritrócitos do Vídeo 4 (elemento 1 e 2 foram utilizados para a segunda calibração). . . . .	48
5.4	Imagem ilustrativa de um ficheiro, no programa <i>Microsoft Office Excel</i> , que contém os valores dos deslocamentos radiais dos seguimentos e indicação das colunas seleccionadas - a primeira coluna identifica o seguimento e a segunda coluna refere o valor do deslocamento radial. . . . .	50
6.1	Comparação dos resultados obtidos através do método semi-automático e através do método manual para as partículas fluorescentes em água pura, antes da bifurcação divergente.	54
6.2	Comparação dos resultados obtidos através do método semi-automático e através do método manual para as partículas fluorescentes em água pura, depois da bifurcação convergente. . . . .	55
6.3	Comparação dos resultados obtidos através do método semi-automático e através do método manual para os eritrócitos humanos em solução $D \times 40$ , antes da bifurcação divergente. . . . .	56
6.4	Comparação dos resultados obtidos através do método semi-automático e através do método manual para os eritrócitos humanos em solução $D \times 40$ , depois da bifurcação convergente. . . . .	57
6.5	Resultados obtidos pelo método semi-automático no cálculo do $D_{yy}$ para as partículas fluorescentes em água pura, antes da bifurcação divergente. . . . .	59
6.6	Resultados obtidos pelo método semi-automático no cálculo do $D_{yy}$ para as partículas fluorescentes em água pura, depois da bifurcação convergente. . . . .	60
6.7	Comparação dos resultados obtidos pelo método semi-automático no cálculo do $D_{yy}$ para as partículas fluorescentes em água pura, antes da bifurcação divergente e depois da bifurcação convergente. . . . .	61
6.8	Resultados obtidos pelo método semi-automático no cálculo do $D_{yy}$ para os eritrócitos humanos em solução $D \times 40$ , antes da bifurcação divergente. . . . .	63
6.9	Resultados obtidos pelo método semi-automático no cálculo do $D_{yy}$ para os eritrócitos humanos em solução $D \times 40$ , depois da bifurcação convergente. . . . .	64

6.10	Comparação dos resultados obtidos pelo método semi-automático no cálculo do $D_{yy}$ para os eritrócitos humanos em solução $D \times 40$ , antes da bifurcação divergente e depois da bifurcação convergente. . . . .	65
6.11	Comparação dos resultados obtidos pelo método semi-automático no cálculo do $D_{yy}$ . . . . .	66
6.12	Comparação dos valores do $D_{yy}$ para os eritrócitos humanos em $D \times 40$ obtidos pela implementação do método semi-automático desenvolvido com valores apresentados por investigadores. . . . .	67
7.1	Imagem dos seguimentos efectuados ao Vídeo 1. . . . .	i
7.2	Imagem dos seguimentos efectuados ao Vídeo 2. . . . .	ii
7.3	Imagem dos seguimentos efectuados ao Vídeo 3. . . . .	ii
7.4	Imagem dos seguimentos efectuados ao Vídeo 4. . . . .	iii
7.5	Imagem dos seguimentos efectuados ao Vídeo 5. . . . .	iii
7.6	Imagem dos seguimentos efectuados ao Vídeo 6. . . . .	iv
7.7	Imagem dos seguimentos efectuados ao Vídeo 7. . . . .	iv
7.8	Imagem dos seguimentos efectuados ao Vídeo 8. . . . .	v
7.9	Imagem dos seguimentos efectuados ao Vídeo 9. . . . .	v
7.10	Representação gráfica dos coeficientes de dispersão calculados através do <i>software MatLab</i> dos seguimentos analisados do Vídeo 1. . . . .	xix
7.11	Representação gráfica dos coeficientes de dispersão calculados através do <i>software MatLab</i> dos seguimentos analisados do Vídeo 2. . . . .	xx
7.12	Representação gráfica dos coeficientes de dispersão calculados através do <i>software MatLab</i> dos seguimentos analisados do Vídeo 3. . . . .	xx
7.13	Representação gráfica dos coeficientes de dispersão calculados através do <i>software MatLab</i> dos seguimentos analisados do Vídeo 4. . . . .	xxi
7.14	Representação gráfica dos coeficientes de dispersão calculados através do <i>software MatLab</i> dos seguimentos analisados do Vídeo 5. . . . .	xxi

- 7.15 Representação gráfica dos coeficientes de dispersão calculados através do *software MatLab* dos seguimentos analisados do Vídeo 6. . . . . xxii
- 7.16 Representação gráfica dos coeficientes de dispersão calculados através do *software MatLab* dos seguimentos analisados do Vídeo 7. . . . . xxii
- 7.17 Representação gráfica dos coeficientes de dispersão calculados através do *software MatLab* dos seguimentos analisados do Vídeo 8. . . . . xxiii
- 7.18 Representação gráfica dos coeficientes de dispersão calculados através do *software MatLab* dos seguimentos analisados do Vídeo 9. . . . . xxiii



# Introdução

*Este capítulo constitui uma nota introdutória ao estudo que é descrito neste relatório. Inicialmente é apresentado um resumo das diversas motivações que levaram à realização deste trabalho. Seguidamente são enumerados os objectivos deste trabalho e, por fim, é exposta detalhadamente a estrutura adoptada na elaboração deste relatório final.*

## 1.1 Motivação

O sangue é um fluido biológico de elevada importância para o normal funcionamento do organismo humano. Desempenha funções essenciais à vida que, quando existe a ocorrência de uma anormalidade, compromete todos os outros sistemas constituintes do organismo. Um ser humano possui cerca de cinco litros de volume sanguíneo no organismo onde, aproximadamente, metade desse volume é composto por elementos sanguíneos e a outra metade por plasma. Os eritrócitos são os elementos sanguíneos mais numerosos. Acredita-se que os eritrócitos influenciam fortemente as propriedades do escoamento sanguíneo, comparativamente com os outros elementos constituintes do sangue. A principal função dos eritrócitos consiste no transporte de oxigénio desde os pulmões até todos os tecidos que constituem o corpo humano, elemento vital para o normal e bom funcionamento do organismo humano. O estudo do comportamento dos eritrócitos, desde o movimento, as deformações, as velocidades, entre outros, apresenta uma ele-

vada importância na avaliação precoce de alterações comportamentais dos mesmos evitando o aparecimento e a evolução de patologias no organismo.

A microcirculação possui uma elevada importância na circulação sanguínea devido ao facto de ser nesse local que ocorre em maior número as trocas gasosas, de nutrientes e outros elementos entre o sangue e os tecidos vizinhos. É também nesse instante que o volume sanguíneo é muito mais reduzido, tendo em conta a capacidade dos capilares, os vasos mais finos e mais frágeis do sistema vascular. São várias as patologias que podem alterar as propriedades reológicas do sangue, afectando assim o normal e bom funcionamento do organismo, como a viscosidade do plasma e as propriedades mecânicas dos eritrócitos. Entre elas estão presentes a diabetes, a anemia falciforme, a malária, os derrames e alguns tipos de cancro.

## 1.2 Objectivos

A compreensão e antevisão do comportamento dos elementos sanguíneos nos vasos da microcirculação constituem uma elevada importância na prevenção, no diagnóstico e no tratamento das patologias associadas ao sistema circulatório, tendo em conta que aproximadamente oitenta por cento da queda de pressão que ocorre entre a artéria aorta e a veia cava ocorre na microcirculação.

Diversos estudos têm sido desenvolvidos com o objectivo de estudar o comportamento dos elementos sanguíneos na microcirculação. Para efectuar estes estudos, os investigadores recorrem ao cálculo do coeficiente de dispersão. Os métodos por eles utilizados são manuais e requerem bastante tempo e cuidado na sua aplicação. Com os valores do deslocamento radial dos elementos sanguíneos em estudo é possível efectuar o cálculo do coeficiente de dispersão através de programas matemáticos, como por exemplo o programa *Microsoft Office Excel*. Neste caso, bastante utilizado, é necessário separar por ficheiros os valores do deslocamento radial correspondentes a cada elemento e proceder ao cálculo do coeficiente de dispersão. Este método é bastante moroso, cansativo e propício à ocorrência de erros na colocação manual dos valores do

deslocamento radial de cada elemento nos ficheiros individuais.

Com este trabalho, pretende estabelecer-se uma estratégia para estudar o comportamento dos elementos sanguíneos na microcirculação em que sejam colmatadas as falhas identificadas, e enunciadas anteriormente, no método manual. Para tal, é proposto um método semi-automático mais simples e portanto mais fácil de utilizar, mais rápido de implementar e mais eficaz, diminuindo a possibilidade de ocorrência de erros humanos. A utilização deste método exige a obtenção prévia dos valores do deslocamento radial dos elementos, neste caso com recurso ao *software Image J*. O segundo objectivo consiste na análise dos resultados obtidos pelo método semi-automático desenvolvido de forma a estudar a influência da presença de uma bifurcação no escoamento sanguíneo num microcanal. Para isso são estudados os dois locais antes e depois da bifurcação de modo a no final ser possível comparar os resultados e retirar as devidas conclusões.

### 1.3 Estrutura do relatório

A estrutura deste relatório foi definida de forma a que o leitor entenda facilmente a sua natureza, se enquadre sem problemas nos diversos conceitos desta área de trabalho, compreenda todas as etapas desenvolvidas ao longo deste trabalho, quer na parte da investigação quer na parte prática, e para incentivar o estudo nesta área, dada a elevada importância que detém para a humanidade.

No **Capítulo 1**, o presente capítulo, é apresentada uma nota introdutória do relatório. É exposta a motivação para a realização deste estudo e a importância da sua realização; seguidamente são enumerados os objectivos traçados na elaboração deste estudo descrito no relatório; e por fim é citada a descrição da estrutura do relatório.

No **Capítulo 2** é efectuada uma revisão bibliográfica da área de estudo abordada neste relatório, de forma a compreender a evolução já atingida neste vasto campo do estudo reológico na microcirculação. Houve a necessidade de introduzir diversos fundamentos teóricos sobre a área da hemodinâmica, que é descrito no **Capítulo 3**, onde é abordado o sistema circulatório, a rede

vascular, o sangue e seus constituintes, o fluxo sanguíneo e a reologia do sangue, entre outros fundamentos teóricos que foram considerados pertinentes introduzir no relatório.

No **Capítulo 4** são descritos os vários métodos que foram necessários utilizar para desenvolver este trabalho prático. O procedimento da técnica de Litografia Suave para a produção dos microcanais para o estudo *in vitro*. O funcionamento do Sistema Micro-PIV Confocal de forma a serem obtidos os vídeos onde se verifica a passagem do fluido seleccionado pelos microcanais previamente fabricados. Os procedimentos utilizados no *software Image J* para a detecção e seguimento dos eritrócitos humanos ou das partículas fluorescentes que se encontram no fluido em questão. Por último, o uso do *software MatLab* para o cálculo do coeficiente de dispersão dos eritrócitos humanos ou das partículas fluorescentes detectadas e seguidas através do *software Image J*.

O **Capítulo 5** contém uma descrição pormenorizada de todo o trabalho prático realizado e, posteriormente, são apresentados e discutidos os resultados obtidos no **Capítulo 6**. Desta forma, chegamos às conclusões que estão apresentadas no **Capítulo 7** e analisando todo o trabalho, resultados e respectivas conclusões, são apresentadas algumas sugestões para trabalhos futuros que podem ser desenvolvidos de forma a melhorar e desenvolver o desígnio deste relatório.

## **Revisão Bibliográfica**

*Neste capítulo pretende-se efectuar uma revisão bibliográfica sobre o assunto em estudo neste relatório - o estudo do escoamento sanguíneo na microcirculação - de forma a demonstrar a evolução cronológica dos conhecimentos desta extensa área. Para isso são referenciados alguns estudos desenvolvidos por investigadores, nomeadamente referidas algumas informações por eles confirmadas assim como métodos por eles desenvolvidos.*

### **2.1 Reologia do sangue na microcirculação**

Ao longo de diversos anos, vários estudos foram desenvolvidos na área da hemodinâmica, avaliando o comportamento e os fenómenos ocorridos na circulação sanguínea. O sangue é um biofluido de elevada importância devido ao seu grande contributo no organismo humano para a manutenção da vida, desempenhando diversas funções através do sistema cardiovascular.

O sangue é uma suspensão de 45% de células (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) no plasma. As diversas células apresentam tamanhos e morfologias diferentes. Estudos anteriores revelam que esta diferença visualizada nos tamanhos das células conduz a diferentes velocidades de migração entre as mesmas em canais com diâmetros mais reduzidos [Pires, 2012, Novais, 2012].

Na microcirculação, as interações entre as células sanguíneas e os vasos sanguíneos tornam-se bastante importantes. Como resultado dessas interações, Silva afirma que as células não se

encontram uniformemente distribuídas no sangue ao longo dos microcanais [Silva, 1984] .

Segundo Fung, a reologia do sangue tem um papel de elevada importância na circulação devido ao coeficiente de viscosidade do sangue. A viscosidade é uma propriedade dos fluidos que se caracteriza pela medida da resistência ao escoamento que um fluido oferece quando se encontra sujeito a um esforço tangencial [Fung, 1996]. Analisando a razão entre o diâmetro dos microcanais mais estreitos e o diâmetro dos elementos celulares sanguíneos, Silva afirma que não é possível classificar o fluxo sanguíneo na microcirculação como o de um fluido homogêneo [Silva, 1984]. As características hidrodinâmicas do fluxo sanguíneo nos microcanais (resistência, distribuição do fluxo e os seus constituintes) encontram-se dependentes dos factores reológicos do sangue e da concentração dos seus elementos celulares.

Silva afirma que, em condições normais, a resistência ao fluxo aumenta gradualmente da área arterial (ou venosa) para os capilares [Silva, 1984]. Isto porque a resistência ao fluxo em qualquer vaso isolado depende da geometria vascular e de factores reológicos, como a viscosidade sanguínea. À medida que o diâmetro vascular diminui acentua-se a resistência ao fluxo, o que, de certa forma, é compensado pela diminuição do hematócrito. Segundo Baskurt e Meiselman, a viscosidade aparente do sangue depende da existência de forças de corte e é determinada pelo hematócrito, pela viscosidade do plasma, pela agregação eritrocitária e pelas propriedades mecânicas dos eritrócitos [Baskurt and Meiselman, 2003]. Os eritrócitos possuem a grande capacidade de se deformarem e esta propriedade física contribui significativamente para auxiliar o fluxo sanguíneo na microcirculação.

Diversos estudos mostram que as informações obtidas relativamente às propriedades reológicas do sangue em capilares de vidro apresentam diferenças comparativamente com estudos *in vivo* [Pries et al., 1994]. Lima et al. afirmam que diversos investigadores efectuaram alterações nos seus estudos relativamente aos sistemas microvasculares utilizados [Lima et al., 2012]. Devido à complexidade de controlar e obter medições confiáveis sobre o comportamento do fluxo sanguíneo através de sistemas microvasculares *in vivo* optaram por utilizar sistemas microvas-

culares *in vitro*. Desta forma, os modelos permitem um controlo mais preciso sobre as variáveis experimentais de interesse e extrair a informação detalhada do comportamento do fluxo de glóbulos individuais. Grande parte da compreensão de fenómenos hemodinâmicos na microcirculação foi obtida através de estudos na macro e microrreologia do sangue através de microtubos de vidro. Embora os microcanais de vidro apresentem semelhanças com os microcanais *in vivo* é claro que apresentam vários aspectos diferentes que provocaram resultados conflituosos entre estudos sobre o fluxo sanguíneo *in vivo* e *in vitro* relativamente à resistência ao fluxo e à deformabilidade dos eritrócitos.

De forma a ser possível vencer as limitações visíveis no uso de microcanais de vidro, é sugerido por diversos investigadores o uso de tecnologias de sistemas microelectromecânicos para a fabricação de microdispositivos para o estudo *in vitro* do fluxo sanguíneo num ambiente com condições muito próximas do *in vivo* [Lima et al., 2012, Lima et al., 2008b, Leble et al., 2011a, Lima et al., 2013, Lima et al., 2009c]. Através da utilização da técnica de litografia suave é possível fabricar microcanais em polidimetilsiloxano (PDMS) com geometrias complexas, semelhantes a arteríolas e redes capilares humanos. Os microcanais fabricados através desta técnica, para além de terem geometrias complexas têm outras propriedades notáveis, como a boa transparência óptica, biocompatibilidade e permeabilidade a gases. Esta última propriedade faz com que estes microcanais sejam adequados para estudos que envolvam células vivas e, consequentemente, oferecem uma maneira poderosa para estudar vários fenómenos na microcirculação.

Ao longo do tempo, diversas técnicas de visualização de escoamentos têm sido aplicadas para a determinação de grandezas físicas e químicas do escoamento sanguíneo, para compreender em detalhe o comportamento dos escoamentos à microescala. No passado, o fluxo sanguíneo nos microcanais foi analisado através de técnicas de medição, como por exemplo métodos fotométricos e o anemómetro laser-Doppler [Lima et al., 2012, Lima et al., 2013]. Embora os resultados obtidos através destas técnicas fossem satisfatórios, Lima et al. indicam que estudos detalhados efectuados a nível microscópico sobre o comportamento sanguíneo têm sido bastante limitados

devido a vários factores como o caso da baixa resolução espacial, a dificuldade verificada na obtenção de medições exactas em escalas tão reduzidas, os erros ópticos oriundos das paredes dos microcanais, a presença de concentrações elevadas das células sanguíneas e a dificuldade verificada na visualização dos resultados devido ao reduzido poder de computação e à inexistência de métodos de análise de imagem rigorosos [Lima et al., 2013].

Nos últimos anos, com os avanços existentes na área da informática e da óptica, nas técnicas de aquisição de imagens de alta velocidade e nos métodos computacionais de processamento e análise de imagem, surgiu o sistema convencional de velocimetria por imagem de partículas (PIV) que permite efectuar estudos sobre propriedades do fluxo sanguíneo na microcirculação [Lima et al., 2012, Lima et al., 2008b, Leble et al., 2011a, Lima et al., 2013, Garcia et al., 2012, Nakano et al., 2005]. Combinando este sistema PIV com um microscópio invertido verifica-se um melhoramento considerativo na resolução espacial e temporal. Este sistema, conhecido como micro-PIV, tem vindo a ser bastante utilizado em diversos estudos sobre o comportamento reológico do sangue em diversas áreas de investigação [Lima et al., 2013, Lima et al., 2009a, Lima et al., 2009b, Pinho, 2011, Fujiwara et al., 2009, Pinho et al., 2010].

Mais tarde, segundo Lima et al., foi desenvolvida uma técnica de imagiologia, por um estudante de pós-doutoramento na Universidade de Harvard, em 1955, denominada por sistema micro-PIV confocal [Lima et al., 2013]. Esta nova técnica, comparativamente com a convencional, permite a obtenção de imagens com uma melhor definição e resolução, através do uso de um microscópio confocal, diminuindo o aparecimento de erros na detecção de partículas na zona de focagem [Lima et al., 2006, Garcia et al., 2012, Saadatmand et al., 2011, Leble et al., 2011b, Lima et al., 2009c].



## Hemodinâmica

*Neste capítulo é feita uma abordagem à hemodinâmica, área inserida na mecânica de fluidos na qual se efectua o estudo do escoamento do sangue no sistema cardiovascular. É efectuada uma breve descrição do sistema cardiovascular, seguida de uma abordagem um pouco mais detalhada do sistema vascular. É também realizada uma descrição promenorizada da microcirculação, relativamente à sua estrutura, onde são detalhadas as características das bifurcações existentes no limite da microcirculação. Relativamente ao sangue, um fluido de elevada importância no organismo do ser vivo, são descritas as suas características e funções, assim como enumerados e descritos os componentes presentes na sua constituição. Por fim é feita uma abordagem ao comportamento dos fluidos com ênfase ao fluxo sanguíneo e ao comportamento reológico do sangue na microcirculação.*

### 3.1 Introdução

A hemodinâmica é uma área inserida na mecânica dos fluidos e procura fazer o estudo do escoamento do sangue no sistema cardiovascular. Esta disciplina caracteriza o sangue como um fluido em movimento, estudando o comportamento deste e subsequentes efeitos da interacção com as fronteiras que o delimitam [Pinho, 2011, Caiado, 2009].

No geral, o conceito fluido é descrito como uma substância capaz de escoar e cujo volume

adquire a forma do recipiente que o contém. No entanto, esta descrição não constitui uma definição científica. Por definição, um fluido é uma substância cuja estrutura molecular não oferece resistência à sua deformação, quando submetida a tensões de qualquer magnitude. Num fluido, entende-se por tensão o resultado dos esforços internos que ocorrem como reacção a forças externas aplicadas sobre o fluido, ou como reacção de forças internas [Seeley et al., 2007].

Entre as tensões consideradas no estudo dos fluidos, temos a tensão de corte e a tensão superficial. A primeira, é uma tensão resultante de uma força tangencial aplicada sobre a superfície do fluido que induz a sua deformação contínua, por outras palavras, o escoamento do fluido dá-se enquanto a tensão de corte se fizer sentir. A tensão superficial relaciona-se com as propriedades coesivas dos fluidos, sendo capaz de explicar fenómenos como a formação de gotas ou a flutuação de pequenos objectos [Lima et al., 2012].

Para além das tensões, as características mais importantes que descrevem o escoamento dos fluidos são a velocidade, a densidade, a viscosidade e a temperatura. A velocidade de um fluido descreve a variação do seu deslocamento em relação ao tempo. A densidade é uma propriedade física que corresponde à razão da quantidade de matéria, ou massa, por unidade de volume. A viscosidade é uma propriedade intrínseca de cada fluido e caracteriza as tensões internas que se criam entre moléculas contíguas, que resultam no deslocamento destas a diferentes velocidades [Pereira, 1999, Lima, 2007, Sugihara-Seki and Fu, 2005, Stuart and Kenny, 1980].

## **3.2 Descrição do sistema cardiovascular**

O sistema cardiovascular é um dos oito sistemas do corpo humano. É um sistema circulatório fechado que contribui para a manutenção da homeostasia do organismo. Dele fazem parte o coração e os vasos sanguíneos, nomeadamente, as artérias, as arteríolas, as veias, as vénulas e os capilares.

O coração é denominado de bomba propulsora da circulação do sangue em todos os vasos

sanguíneos do organismo. Este órgão possui na sua constituição células que têm a capacidade de gerar potenciais de acção, isto é, ondas de descarga eléctrica que se propagam pelo músculo do coração, sendo responsáveis pela contracção do músculo cardíaco em intervalos regulares. A diferença de pressão gerada pelas contracções musculares é a força motriz da circulação do sangue no organismo [Pinho, 2011, Caiado, 2009].

A circulação sanguínea ocorre por dois percursos distintos: a circulação pulmonar e a circulação sistémica, como é possível verificar na Figura 3.1. O sangue proveniente dos tecidos entra no coração pelo lado direito, primeiramente pela aurícula direita, chegando ao ventrículo direito. Quando este enche, contrai e envia o sangue para a artéria pulmonar, onde inicia a circulação pulmonar. A artéria pulmonar conduz o sangue venoso para os pulmões, local onde ocorrem as trocas gasosas. Nos capilares pulmonares, o dióxido de carbono é libertado da corrente sanguínea e o oxigénio difunde-se no sangue. O sangue arterial entra nas veias pulmonares e retorna ao coração pela aurícula esquerda passando depois para o ventrículo esquerdo. O ventrículo, quando cheio, contrai e impulsiona o sangue para a artéria aorta, onde se inicia a circulação sistémica. Da artéria aorta o sangue é conduzido para todas as partes do corpo através das artérias de maior calibre para as de menor, passando pelas arteríolas e chegando aos capilares. Aqui fazem-se as trocas necessárias ao metabolismo celular e o sangue segue para as vénulas, passando pelas veias de menor calibre, seguindo até às de maior calibre, regressando ao coração pelas veias cavas. O sangue possui um fluxo unidireccional ao longo da sistema circulatório conseguido pela força motriz gerada pelo coração e pela existência de diversas válvulas ao longo dos vasos sanguíneos, responsáveis por impedir o retrocesso do sangue [Lima et al., 2012, Seeley et al., 2007].

### **3.3 Sistema vascular**

O sistema cardiovascular abrange o sistema vascular sanguíneo e o sistema vascular linfático.

O sistema vascular sanguíneo consiste em redes microvasculares compostas por segmentos de

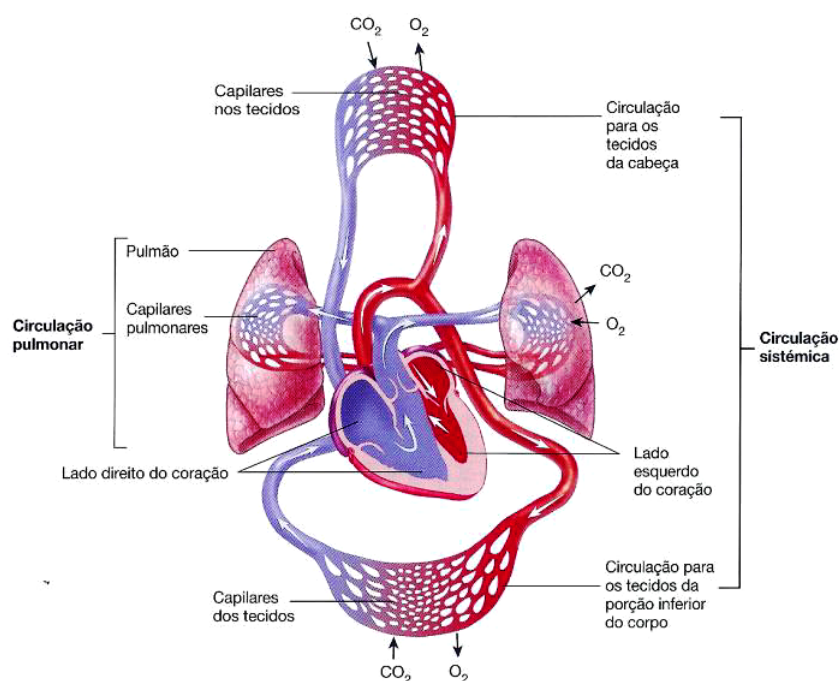


Figura 3.1: Ilustração da circulação pulmonar e da circulação sistêmica [Seeley et al., 2007].

vasos curtos irregulares que estão ligados por inúmeras bifurcações. Os vasos sanguíneos são classificados anatomicamente de acordo com a dimensão e estrutura histológica da sua parede. O sistema vascular sanguíneo é composto pelas seguintes estruturas: artérias, arteríolas, capilares, vénulas e veias. Na parede de todos os vasos sanguíneos, independentemente da sua dimensão, e à exceção dos capilares e das vénulas, reconhecem-se três camadas concêntricas: a túnica íntima, a mais interna, a túnica média e a túnica adventícia, mais externa [Lima et al., 2012, Seeley et al., 2007, Pinho, 2011], como podemos verificar na Figura 3.2.

As artérias que emergem do coração e os seus principais ramos, devido ao seu grande diâmetro e à predominância de fibras elásticas nas suas paredes, são designadas de grandes artérias do tipo elástico. Na túnica íntima possuem uma camada sub-endotelial bem desenvolvida, com fibras musculares lisas e, além disso, é evidente a abundância de fibras de colagénio e fibras elásticas. Contudo, a capacidade elástica também está presente na túnica média, onde predomina o componente elástico da matriz extracelular. É constituída predominantemente por lamelas

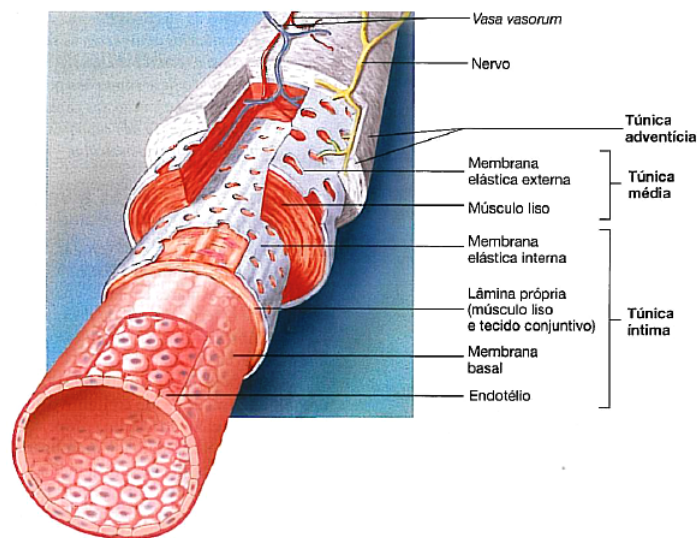


Figura 3.2: Histologia de um vaso sanguíneo (Adaptado de [Seeley et al., 2007]).

elásticas concêntricas, entre as quais estão presentes algumas fibras musculares lisas e fibras de colagénio .

À medida que as grandes artérias do tipo elástico se ramificam, o seu diâmetro diminui e aumenta a quantidade de fibras musculares lisas nas suas paredes, característica que as permite classificar como artérias musculares. Cerca de três quartos da túnica média destas artérias são constituídos por fibras musculares, organizadas circunferencialmente em várias camadas. O restante da túnica média é constituído por componentes da matriz extracelular produzidos pelas fibras musculares, nomeadamente fibras elásticas, colagénio e proteoglicanos.

A contínua ramificação das artérias origina vasos sanguíneos de pequeno diâmetro mas com uma espessura considerável de fibras musculares nas suas paredes, estes vasos são classificados como arteríolas. A sua túnica média é constituída por algumas camadas de células musculares lisas, cada camada com a espessura de uma célula muscular. À medida que as arteríolas se ramificam dão origem a vasos de menor diâmetro, apresentando apenas uma camada descontínua de células musculares lisas na túnica média que, ao ramificarem-se, dão origem à rede capilar.

Os capilares possuem uma parede muito fina que permite a difusão de substâncias entre o

sangue e o fluido intersticial. De uma forma geral, os capilares consistem numa única camada de células endoteliais rodeada por uma lâmina basal. Consoante as características do endotélio, os capilares podem ser classificados em três grupos distintos: capilares contínuos, capilares fenestrados e capilares sinusóides. Os capilares contínuos e fenestrados apresentam células endoteliais bem unidas entre si, no entanto as células endoteliais dos capilares fenestrados são perfuradas por poros. Os capilares sinusóides apresentam grandes espaços entre as células endoteliais, para além de sistemas de poros que atravessam as células endoteliais.

A confluência de dois ou mais capilares resulta num vaso denominado vénula pós-capilar. Estes vasos são histologicamente idênticos aos capilares, constituídos por endotélio e lâmina basal, apresentando pericitos. À medida que convergem, formam-se vasos com diâmetro cada vez maior e obedecem ao padrão geral da parede de um vaso sanguíneo, apresentando as três túnicas. Estas vénulas são designadas vénulas musculares por apresentarem fibras musculares, embora escassas, na túnica média [Seeley et al., 2007].

As veias resultam da convergência das vénulas e caracterizam-se por apresentar pequena espessura de parede e lúmen com diâmetro considerável. A túnica média é pouco desenvolvida e formada por escassas camadas de células musculares lisas e matriz extracelular, que é predominante, onde existem fibras de colagénio e fibras elásticas. Nas veias de maior diâmetro, mais perto do coração, a camada subendotelial da túnica íntima torna-se desenvolvida. Existe também a aparição de projecções da túnica íntima para o interior do lúmen constituindo as válvulas venosas.

### **3.4 Estrutura da microcirculação**

A principal função do sistema cardiovascular consiste no transporte de substâncias por todo o corpo por convecção, ou seja, através de um fluido. Enquanto que o transporte por difusão celular é eficaz apenas em distâncias muito curtas, o transporte por convecção não possui esta

limitação [Lima, 2007, Pinho, 2011].

O transporte por difusão entre grandes distâncias tem a necessidade da presença de um grande fluxo do fluido, sendo necessário a presença de canais relativamente largos. No entanto, o transporte de substâncias para todas as partes do organismo requer um grande número de pequenos vasos finamente distribuídos ao longo dos tecidos - a microcirculação - entidade que se refere aos pequenos ramos do sistema vascular com diâmetros variando entre algumas centenas de micrometros e alguns micrometros [Secomb and Pries, 2011, Lima, 2007, Pinho, 2011].

A rede microvascular possui estruturas bastante complexas. Em alguns tecidos do corpo, a microcirculação pode ser equiparada a uma ramificação divergente de arteríolas que alimentam os capilares, os que, por sua vez, drenam para uma ramificação convergente de vénulas, como é possível verificar na Figura 3.3. A microcirculação é frequentemente idealizada como um conjunto de vasos de diferentes categorias, ligados em série, em que os vasos paralelos em cada categoria apresentam propriedades idênticas. No entanto, na realidade, as propriedades dos vasos são dissemelhantes. Esta dissemelhança tem efeitos importantes no comportamento funcional da microcirculação [Seeley et al., 2007, Lima, 2007].

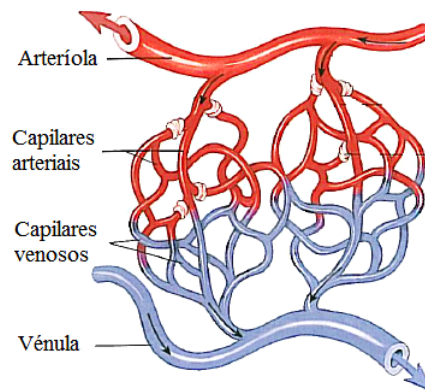


Figura 3.3: Rede capilar (Adaptado de [Seeley et al., 2007]).

A rede microvascular pode consistir em vários vasos ou vários milhares de vasos, pode ser fornecida por uma ou mais arteríolas ou artérias de alimentação e drenada através de uma ou mais vénulas ou veias de recolha [Seeley et al., 2007, Lima, 2007, Pinho, 2011].

A rede vascular arterial consiste numa série de vasos em forma aproximadamente cilíndrica que sofrem uma diminuição do diâmetro e do comprimento e sofrem um aumento do número de canais paralelos quando se move a partir da artéria principal, da aorta, para os capilares.

A interação entre um número crescente de vasos e a diminuição do diâmetro e comprimento dos vasos conduz a um gradiente de pressão através da rede arterial que é significativo nas pequenas artérias (artérias de resistência) e é mais pronunciado nas arteríolas onde a relação entre a espessura da parede e o diâmetro do lúmen também é maior. Esta estrutura anatómica permite a regulação do fluxo sanguíneo principalmente pela variação do diâmetro através da vasodilatação e vasoconstrição. Estas modificações do diâmetro conduzem a alterações na resistência hidrodinâmica, definidas como a razão entre a queda de pressão e a taxa de fluxo volumétrico [Popel and Johnson, 2005, Lima, 2007].

As redes capilares consistem em vários canais paralelos com tipicamente 3 a 6 capilares resultantes de cada arteríola pré-capilar. A ramificação adicional ocorre ao longo do comprimento da rede capilar e o diâmetro é um pouco maior na porção distal da rede capilar. A de pressão-pressão sofre uma variação nos diferentes canais vasculares em condições normais e depende do número, comprimento e diâmetro dos capilares. Os capilares carecem de células musculares lisas e desta forma não conseguem dilatar ou contrair.

Os capilares proporcionam uma grande área de superfície para a realização de trocas de nutrientes e outros elementos e são especializados de forma a proporcionar difusão a uma distância mínima do sangue para os tecidos. A morfologia especializada desta região permite a troca de nutrientes e de produtos residuais entre o sangue e os tecidos, a manutenção do equilíbrio dos fluídos, a comunicação entre as glândulas endócrinas e os respectivos órgãos alvo, a transferência em massa entre os órgãos, a defesa imunológica, entre outras coisas.

As vénulas imediatamente após os capilares colectam o sangue proveniente de vários capilares e, assim como os capilares, são tubos endoteliais simples rodeados por uma membrana basal, que juntamente com as células do parênquima, fornece suporte mecânico ao endotélio.



A rede venosa assemelha-se à rede arterial na arquitectura da ramificação excepto que os vasos venosos são mais numerosos e os segmentos individuais são correspondentemente mais curtos e mais largos. Em algumas regiões, os vasos venosos e arteriais encontram-se lado a lado permitindo a troca de agentes vasoactivos entre os vasos.

## **3.5 Sangue**

O organismo tem a capacidade de gerar diversos fluidos biológicos, denominados de biofluidos, como é o caso da água do corpo, o líquido amniótico, o suor, a saliva, o pus, o sangue, entre outros. O sangue é considerado o biofluido mais importante, desempenha inúmeras funções vitais no organismo e sem ele a complexa organização do organismo não valeria de nada [Pinho, 2011]. Entre as funções deste biofluido podem citar-se:

- Transporte de substâncias essenciais ao metabolismo celular: gases, nutrientes, produtos de degradação, enzimas, hormonas.
- Regulação do pH e da osmose, assim como a regulação da temperatura do corpo.
- Protecção do sistema imunitário contra substâncias exógenas, toxinas e microrganismos.
- Permite a formação de coágulos que protegem contra a perda excessiva de sangue aquando da lesão de um vaso sanguíneo.

### **3.5.1 Constituintes do sangue**

O sangue é um fluido não homogéneo composto por uma suspensão de células, proteínas e iões no plasma. Pode ser descrito como um fluido opaco, com viscosidade superior à da água e é composto na sua maioria por um líquido de cor amarelada - o plasma - e uma série de componentes celulares - os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas - como é possível verificar na Figura 3.4.

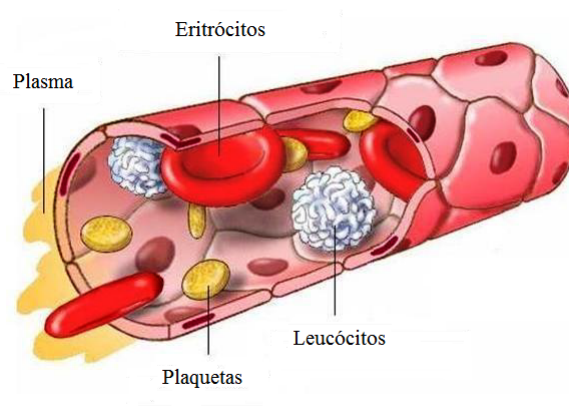


Figura 3.4: Ilustração dos componentes do sangue (Adaptado de [Seeley et al., 2007]).

Os componentes celulares presentes no sangue correspondem a cerca de 46% do volume total do sangue, como é possível verificar na Tabela 3.1. O sangue encontra-se contido no sistema circulatório, através de sistemas fechados, mantendo-se em movimento segundo um movimento unidireccional. Num adulto com cerca de 70kg, o volume de sangue corresponde a cerca de 7% do peso do corpo, ou seja, cerca de 5 litros, dos quais, aproximadamente, 54% correspondem ao plasma [Lima et al., 2012, Seeley et al., 2007].

Tabela 3.1: Concentração das células sanguíneas (Adaptado de [Lima, 2007]).

Elementos celulares sanguíneos	Concentração volumétrica no sangue(%)
Eritrócitos	45%
Leucócitos + Plaquetas	1%

### Plasma

O plasma é a parte líquida do sangue. Consiste num fluído de cor amarelo pálido com uma constituição de aproximadamente 90% de água e os restantes 10% correspondem a proteínas (como

albumina e fibrinogéneo), substâncias inorgânicas (como íões sódio e íões cloreto), substâncias nutritivas, gases, produtos de degradação e substâncias reguladoras. Trata-se de uma substância coloidal, isto é, um líquido que contém substâncias em suspensão, a maioria das quais são proteínas. As proteínas existentes no plasma, em especial a albumina, têm um papel importante na regulação do movimento da água entre os tecidos e o sangue. Como as proteínas possuem em grande tamanho molecular não permitem a sua passagem através da parede dos capilares, o que incita a ocorrência de pressão osmótica [Lima et al., 2012, Seeley et al., 2007, Pinho, 2011].

### **Eritrócitos**

Os eritrócitos, glóbulos vermelhos ou hemácias, são as células sanguíneas mais abundantes (700 vezes mais numerosos que os leucócitos e 17 vezes mais numerosos que as plaquetas), contêm hemoglobina e são desprovidos de núcleo e organelos. São produzidos na medula óssea pelo processo denominado de eritropoiese, e são degradados no mesmo local de formação. Quando entram no sistema circulatório não se movem activamente, são movidos através da circulação pelas forças responsáveis pela circulação sanguínea. A sua principal função é realizar o transporte de gases: oxigénio para os tecidos e dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões [Pinho, 2011].

Estas células possuem a forma de disco, um disco bicôncavo, com um diâmetro de aproximadamente  $8 \mu m$ , em que a porção periférica é mais espessa que o centro da célula, como se pode verificar na Figura 3.5. Esta característica aumenta a sua área superficial, tornando mais rápida a entrada e saída dos gases na célula. Para além disso, permite que a célula se dobre pelo centro, diminuindo o seu tamanho e tornando mais fácil a sua passagem através dos vasos sanguíneos de pequeno calibre. Os principais componentes do eritrócito são o citoplasma e uma fina membrana composta por uma bicamada lipídica e de proteínas [Lima et al., 2012, Seeley et al., 2007, Silva, 1974].

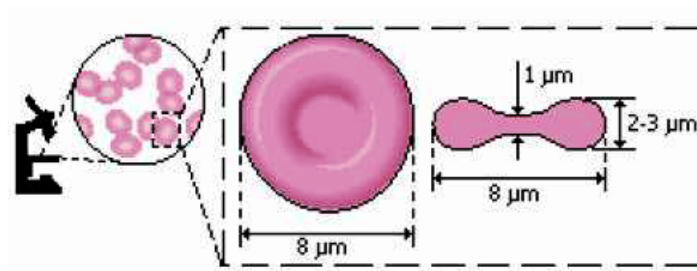


Figura 3.5: Dimensão e forma de um eritrócito humano [Lima et al., 2012].

### Leucócitos

Os leucócitos, ou glóbulos brancos, são células claras ou esbranquiçadas, sem hemoglobina mas com núcleo. São responsáveis pela resposta imunitária, protegem contra os microrganismos invasores e removem células e corpos estranhos do organismo pelo processo de fagocitose. Geralmente possuem uma forma esférica, as suas superfícies são rugosas e o seu diâmetro varia entre 7 e 22  $\mu m$  [Lima et al., 2012, Seeley et al., 2007, Pinho, 2011].

Existem cinco tipos diferentes de leucócitos: os neutrófilos, os eosinófilos, os basófilos, os linfócitos e os monócitos. Grande parte destas células são móveis, têm a capacidade de se mover através de projecções irregulares do citoplasma. Os leucócitos são também capazes de sair da circulação e entrar nos tecidos por diapedese para, desta forma, conseguirem realizar as suas funções [Seeley et al., 2007].

### Plaquetas

As plaquetas, ou trombócitos, são minúsculos fragmentos de células gigantes da medula óssea, os megacariócitos. São compostas por uma pequena quantidade de citoplasma envolvida por uma membrana plasmática. Estas células podem ter a forma de discos, oval ou redonda, e o seu diâmetro varia entre 1 e 2  $\mu m$ . A sua superfície possui glicoproteínas e proteínas que permitem às plaquetas fixarem-se a outras moléculas, como o colagénio no tecido conjuntivo. As plaquetas encontram-se em circulação no sangue cerca de 5 a 9 dias sendo depois destruídas no baço

[Lima et al., 2012, Seeley et al., 2007, Pinho, 2011].

Estas células têm um papel importante na prevenção das perdas de sangue, através da formação do rolhão plaquetário, que oclui os orifícios nos pequenos vasos, e promovendo a formação e contração dos coágulos que ajudam a ocluir lesões maiores existentes nos vasos.

As células constituintes do sangue têm um tempo de vida curto, por isso, são continuamente substituídas por células novas. O processo responsável pela formação das células do sangue é denominado de hematopoiese e ocorre no embrião e no feto em tecidos como o saco vitelino, fígado, timo, baço, nódulos linfáticos e medula óssea vermelha. Durante a infância toda a medula óssea é hematopoiética, mas à medida que a idade aumenta, a medula óssea dos ossos longos vai sendo substituída por tecido adiposo, de tal forma que no adulto a medula hematopoiética fica confinada ao esqueleto axial e às extremidades proximais do úmero e fêmur.

A hemocitopoiese resulta da proliferação e diferenciação gradual a partir de células tronco (células progenitoras multipotentes e comuns a todas as linhagens celulares) até aos elementos celulares que são libertados na corrente sanguínea. Ao longo deste processo, células progenitoras provenientes da proliferação e diferenciação da célula tronco são sucessivamente restringidas no seu potencial de diferenciação. As células progenitoras, quando colocadas num meio de cultura apropriado, podem originar colónias de tipos específicos de células do sangue, por isso são designadas unidades formadoras de colónias. Estas células progenitoras uni ou bipotentes, dão origem a células precursoras (blastos) associadas apenas a a linhagens específicas de células do sangue. Ao atingirem o estado de célula precursora só poderão originar uma linhagem celular específica, embora estas células precursoras sofram inúmeras alterações morfológicas e se dividam intensamente por mitoses sucessivas [Lima et al., 2012, Seeley et al., 2007].

## 3.6 Comportamento dos fluidos

Os fluidos são classificados de acordo com o seu comportamento reológico como Newtonianos e não-Newtonianos. Os fluidos não-Newtonianos podem ainda ser classificados em dois grupos, independentes do tempo e dependentes do tempo. Os fluidos não-Newtonianos independentes do tempo podem ser classificados como dilatantes, pseudoplásticos e plásticos de Bingham.

O corpo viscoso mais simples é o fluido Newtoniano, para o qual a viscosidade é constante, em qualquer velocidade de escoamento. Apresenta um comportamento viscoso ideal onde a variação entre a tensão de corte e o gradiente de velocidade é linear. São exemplos de fluidos Newtonianos, em condições normais, a água, soluções de açúcar e o óleo vegetal.

O fluido não-Newtoniano apresenta uma variação na sua viscosidade e esta ocorre de acordo com o grau de deformação aplicado. Desta forma, a viscosidade do fluido não-Newtoniano não constante, pelo facto de não obdecer à lei de Newton da viscosidade.

A Figura 3.6 representa a variação da tensão de corte em função do gradiente de velocidade para os fluidos Newtonianos e não-Newtonianos.

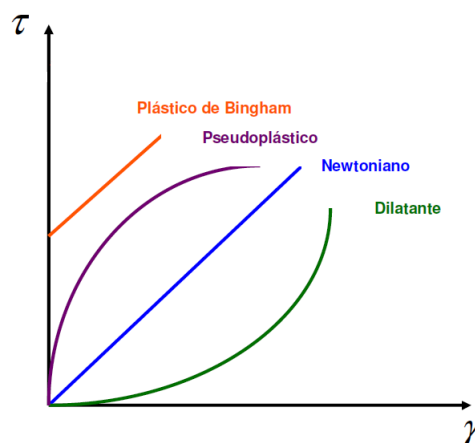


Figura 3.6: Variação da tensão de corte em função do gradiente de velocidade.

### 3.6.1 Fluxo sanguíneo

O fluxo sanguíneo, isto é, a quantidade ou o volume de sangue que passa num intervalo de tempo, apresenta uma variação acentuada entre os diferentes vasos existentes no sistema cardiovascular de acordo com os tecidos e as suas funções, sendo que alguns necessitam de um fluxo bastante maior do que outros.

O fluxo sanguíneo nos vasos ( $Q$ ) é directamente proporcional ao gradiente de pressão ( $P$ ) entre os segmentos contíguos e inversamente proporcional à resistência ( $R$ ), como podemos verificar na Equação 3.1. Isto é, aumentando a pressão, o fluxo aumenta e aumentando a resistência, o fluxo diminui [Pereira, 1999].

$$Q = \frac{P}{R} \quad (3.1)$$

A pressão consiste na força exercida pelo sangue sobre qualquer unidade de área da parede vascular. A resistência é a oposição exercida pela rede vascular à progressão da corrente sanguínea. É inversamente proporcional à quarta potência do raio da circunferência do vaso e o principal factor determinante da resistência ao fluxo é o espaço disponível para a circulação do sangue [Pereira, 1999]. Desta forma, conclui-se que a resistência depende directamente do comprimento e diâmetro do vaso e da viscosidade do sangue.

A resistência ao fluxo sanguíneo pode ser calculada através da Equação 3.2 [Pereira, 1999].

$$R = \mu \frac{LQ}{r^4} \quad (3.2)$$

em que  $L$  é o comprimento do vaso,  $\mu$  é a viscosidade do sangue e  $r$  é o raio do vaso. O que significa que a resistência é directamente proporcional ao comprimento do vaso e inversamente proporcional à área de secção do vaso.

À medida que o sangue avança no sistema vascular, a área de secção total dos vasos aumenta, graças ao aumento do número de vasos, e a velocidade diminui, atingindo o seu valor mínimo

nos capilares, Figura 3.7, local onde ocorre com maior intensidade o fenómeno de trocas gasosas entre os vasos e os tecidos envolventes, através das paredes dos capilares.

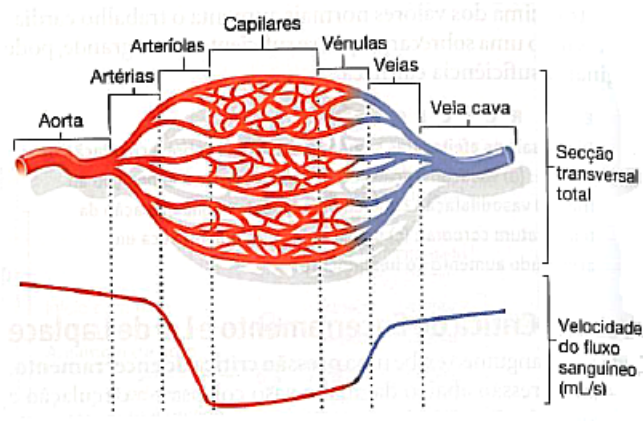


Figura 3.7: Variação da velocidade ao longo da rede vascular [Seeley et al., 2007].

A Lei de Poiseuille, descrita na Equação 3.3, correlaciona os factores que determinam o fluxo líquido num tubo. Esta lei diz que o volume de um fluido ( $Q$ ) que passa através de um tubo na unidade de tempo é directamente proporcional à diferença de pressão entre a entrada e a saída do tubo ( $\Delta P$ ) e à quarta potência do raio do tubo ( $r^4$ ); e é inversamente proporcional ao comprimento do tubo ( $L$ ) e ao coeficiente de viscosidade do líquido ( $\mu$ ) [Pereira, 1999, Lima, 2007]. Esta mesma Lei de Poiseuille explica as modificações da corrente sanguínea conforme a complexidade do sistema vascular.

$$Q = \frac{\Delta P r^4}{\mu L} \quad (3.3)$$

### 3.6.2 Reologia do sangue

A reologia é o ramo da mecânica dos fluidos que estuda o comportamento deformacional, da matéria sólida, e as propriedades físicas que influenciam o escoamento de um fluido, submetido a tensões, sob determinadas condições termodinâmicas ao longo de um período de tempo. Estuda



propriedades como: elasticidade, viscosidade e plasticidade. A viscosidade é a propriedade reológica mais conhecida e a única que caracteriza os fluidos newtonianos.

A reologia do sangue depende directamente da viscosidade do fluido, a medida da resistência interna ou fricção interna de uma substância ao fluxo quando submetido a uma tensão. Interferem na viscosidade sanguínea as alterações do hematócrito, a deformabilidade eritrocitária, a agregação eritrocitária e a viscosidade plasmática. Sendo os eritrócitos os principais elementos do sangue, as propriedades reológicas do mesmo encontram-se fortemente influenciadas pelos eritrócitos [Sugihara-Seki and Fu, 2005].

### **Hematócrito**

O hematócrito consiste na percentagem de eritrócitos ocupada no volume total de sangue. Os valores médios dependem do sexo e idade do indivíduo, o valor normal do hematócrito varia entre 40 e 45% [Chandran et al., 2007].

Pelo facto dos eritrócitos serem os elementos celulares predominantes no sangue, justifica-se que o hematócrito seja importante na determinação da viscosidade do sangue. O aumento progressivo do número de eritrócitos, relativamente à quantidade de plasma, afecta as características laminares da corrente sanguínea, reduzindo a fluidez do sangue. Esta interrelação traduz-se num aumento desproporcional da viscosidade sanguínea relativamente ao hematócrito [Lima, 2007, Karsheva et al., 2009, Stuart and Kenny, 1980].

Actualmente, o hematócrito é obtido por aparelhos automatizados. A metodologia automatizada não mede directamente o hematócrito mas mede o volume do eritrócito ou o tamanho médio dos eritrócitos e quantifica o número de eritrócitos no sangue. O hematócrito é obtido através de um pequeno e simples cálculo [Pinho, 2011].

### **Deformabilidade eritrocitária**

Verifica-se a existência de uma interdependência do comportamento físico do sangue com a deformabilidade do sistema cardiovascular. As propriedades e interações de todos os seus componentes, os elementos celulares e o plasma, bem como as condições externas, implícitas na dinâmica circulatória, influenciam o comportamento reológico do sangue [Silva, 1974, Chandran et al., 2007, Lima, 2007, Pinho, 2011].

A "incompatibilidade" geométrica entre os eritrócitos, os elementos celulares predominantes, e o diâmetro da rede capilar, afecta em grande escala o comportamento reológico do sangue. Desta forma, na sequência deste desequilíbrio, é possível afirmar que a fluidez normal do sangue e a perfusão de todos os sectores corporais se encontram dependentes da existência de eritrócitos flexíveis, capazes de se deformarem ao nível dos segmentos mais estreitos da microcirculação e zonas de bifurcação vascular [Silva, 1984, Lima, 2007, Secomb et al., 2007, Stuart and Kenny, 1980].

A deformabilidade eritrocitária indica a facilidade com que os eritrócitos são capazes de mudar de forma, em função das forças mecânicas incidentes, tornando-se capazes de atravessar capilares com diâmetros reduzidos. A alteração da conformação globular é condicionada pela forma como as forças mecânicas se distribuem na superfície do eritrócito e resulta do facto dos eritrócitos possuírem na sua constituição uma solução de hemoglobina que preenche incompletamente o volume globular, limitado por uma membrana flexível. Diversos factores influenciam significativamente a deformabilidade eritrocitária, tanto intrínsecos como extrínsecos, e os principais encontram-se enunciados na Tabela 3.2 [Silva, 1982, Chandran et al., 2007, Lima, 2007, Shevkoplyas et al., 2006].

É ao nível da microcirculação que a deformabilidade eritrocitária assume maior relevância fisiológica, por duas principais razões: o percurso microvascular torna-se possível apenas aos glóbulos que mantêm intactas as respectivas potencialidades de deformação; e a isquemia tec-

dual é raramente causada por uma doença primária dos microvasos.

Tabela 3.2: Principais factores determinantes da deformabilidade eritrocitária [Silva, 1984].

<i>Factores intrínsecos</i>	<i>Factores extrínsecos</i>
- Viscosidade intraglobular	- Tensão de corte à superfície
- Geometria eritrocitária	
- Propriedades viscoelásticas da membrana globular	

### **Agregação eritrocitária**

A agregação eritrocitária é determinada principalmente pela composição proteica do plasma e pelas propriedades superficiais dos eritrócitos. A agregação eritrocitária, assim como a deformação eritrocitária, depende da tensão de corte incidente nos glóbulos [Silva, 1974, Pinho, 2011].

Quando existem baixos níveis do gradiente de velocidade, particularmente quando associados à elevação do hematócrito, a agregação eritrocitária é favorecida. Desta forma vai haver um aumento da viscosidade sanguínea e uma acentuação da tensão de corte limiar. A formação de agregados eritrocitários é favorecida por algumas características da membrana eritrocitária e depende da concentração e tipo de proteínas plasmáticas. Destas, as mais importantes são as macromoléculas assimétricas que, ao serem absorvidas pela superfície dos glóbulos, estabelecem pontes de união inter-eritrocitária e subsequente agregação [Silva, 1984, Chandran et al., 2007, Lima, 2007, Stuart and Kenny, 1980].

### **Viscosidade plasmática**

O plasma consiste numa fase de suspensão onde se encontram os elementos celulares sanguíneos, desta forma, uma alteração da sua viscosidade afecta directamente a viscosidade sanguínea, in-

dependentemente do hematócrito e das propriedades dos elementos celulares.

No caso do plasma, considera-se que a sua viscosidade é independente do gradiente de velocidade. Todavia, esta característica pode perder-se por acção de factores reológicos; nestas condições é de prever que a viscosidade sofra um aumento ou diminuição por redução ou elevação, respectivamente, do gradiente de velocidade. O aumento da viscosidade plasmática encontra-se relacionado com a concentração proteica no plasma, sobretudo pelo fibrogénio e algumas globulinas [Baskurt and Meiselman, 2003, Silva, 1984, Chandran et al., 2007, Stuart and Kenny, 1980].

### 3.6.3 Comportamento reológico na microcirculação

O escoamento sanguíneo possui duas características surpreendentes, o efeito de Fahareus e o efeito de Faharaeus-Linqdvist. Estes dois efeitos encontram-se fortemente relacionados com o diâmetro dos microvasos e já foram observados em estudos experimentais *in vivo* [Silva, 1984, Lima, 2007, Pinho, 2011, Novais, 2012, Sugihara-Seki and Fu, 2005].

No seu destacável trabalho Robin Faharaeus, observou que tanto o comportamento do fluxo sanguíneo como o hematócrito encontram-se fortemente afectados por microvasos com diâmetro inferior a  $300 \mu m$ . O efeito de Faharaeus indica que o hematócrito sofre uma diminuição à medida que o sangue flui através de microcanais com o diâmetro mais reduzido. Este efeito acontece devido à migração dos eritrócitos para o centro do microcanal e conseqüentemente o movimento das células torna-se mais rápido, em comparação com o meio em suspensão.

Também Faharaeus-Linqdvist realizaram estudos experimentais onde verificaram que para microcanais com diâmetro inferior a  $300 \mu m$  a viscosidade diminuía à medida que o diâmetro dos microcanais também diminuía. Acredita-se que este efeito se deve ao facto de que o hematócrito sofre uma diminuição com o decréscimo do diâmetro dos microcais e, conseqüentemente, a viscosidade do sangue também diminui. Assim como devido à formação da camada de plasma entre os eritrócitos em suspensão e a parede do microvaso, o que contribui para uma redução da viscosidade.

O estudo da reologia do sangue na microcirculação é bastante importante, tendo em conta que aproximadamente oitenta por cento da queda de pressão que ocorre entre a artéria aorta e a veia cava ocorre na microcirculação. Existem diversas patologias que podem alterar as propriedades reológicas do sangue, como a viscosidade do plasma e as propriedades mecânicas dos eritrócitos, como é o caso da diabetes, da anemia falciforme, da malária, derrames e alguns tipos de cancro. A compreensão da hemodinâmica é essencial para prever o comportamento reológico do fluxo sanguíneo de forma a desenvolver ferramentas de diagnóstico de doenças do sistema cardiovascular, elaborar procedimentos que imitem ou alterem o fluxo sanguíneo e, assim, auxiliar no diagnóstico e na terapêutica das patologias cardiovasculares. A caracterização do fluxo e o estudo da resposta dos vasos sanguíneos à circulação do sangue é importante para compreender o comportamento normal e patológico do sistema cardiovascular humano.



## **Materiais e Métodos**

*Neste capítulo é feita uma abordagem aos métodos utilizados. Inicialmente é descrito o processo de Litografia Suave, que permite fabricar os microcanais em PDMS utilizados para a análise in vitro. Posteriormente, é abordado o Sistema micro-PIV Confocal, utilizado para a obtenção, em vídeo, do escoamento dos fluidos seleccionados para o estudo através dos microcanais previamente fabricados. É através dos vídeos que se efectua a detecção e seguimento dos objectos presentes nos mesmos de forma a obtermos a informação desejada para o estudo em causa, neste caso a dispersão dos objectos. Existem várias metodologias que podem ser utilizadas, que serão descritas no presente capítulo, dando ênfase à metodologia utilizada no estudo. Por fim, é implementado um programa interactivo de alta performance direccionado para o cálculo da dispersão do objecto.*

### **4.1 Litografia suave**

Nos estudos *in vitro* existe a necessidade de fabricar dispositivos microfluidicos, isto é, microcanais, para visualização do escoamento do fluido neles inseridos. O *polidimetilsiloxano* (PDMS) é um polímero bastante utilizado na fabricação de microcanais pelas inúmeras vantagens que apresenta. É um polímero considerado quimicamente estável, o que significa que não tende a reagir com outros polímeros, apresenta uma boa transparência óptica, biocompati-

bilidade, boa adesão ao vidro, elasticidade e replicação de geometrias finas e complexas. O facto de apresentar permeabilidade elevada a gases e ao vapor de água, características que se devem à geometria da molécula, possibilita a cultura de células no interior dos microcanais [Novais, 2012, Lima et al., 2013, Lima et al., 2008b, Leble et al., 2011b].

A litografia suave é uma técnica de fabricação em microfluidica que permite a fabricação de microcanais planares em PDMS após a obtenção de moldes, por intermédio do processo de fotolitografia. Numa primeira fase é desenhada a geometria do canal com o auxílio de um *software* de modelação geométrica (o *AutoCAD* da Autodesk, o *SolidWorks* da Dassault Systèmes ou o *SolidEdge* da Siemens, por exemplo) e em seguida, uma máscara de poliéster de alta resolução (25400 *dots per inch*) é impressa com o auxílio de uma impressora. Através da aplicação de uma técnica de fotolitografia, o molde principal é fabricado. Uma fina camada de uma resina fotossensível (SU-8) é depositada sobre uma lâmina de vidro, com o auxílio de uma centrífuga de deposição e, em seguida, é exposta à luz ultravioleta por meio da máscara com a geometria projectada onde a resina vai adquirir a geometria pretendida. Após o uso de um revelador do SU-8 é possível obter o molde desejado [Novais, 2012, Lima et al., 2013, Lima et al., 2008b].

O PDMS é feito através de uma mistura de um pré-polímero e um agente de cura numa porção de peso de 10 para 1. É efectuada a mistura do pré-polímero e do agente de cura durante cerca de 3 minutos. Seguidamente o polímero é vazado sobre o molde, como é possível verificar na Figura 4.1, são removidas as bolhas de ar criadas durante a mistura e curado durante 1 hora a 70°C. Posteriormente o PDMS e o molde são arrefecidos até à temperatura ambiente e o PDMS é removido do molde [Novais, 2012, Lima et al., 2013, Lima et al., 2008b].

Finalmente, a estrutura em PDMS com a geometria pretendida é limpa com etanol e colocada sobre uma lamela de vidro, à qual adere espontaneamente. Por fim, por meio de pontas de micro-pipetas inseridas firmemente para dentro dos canais de ligação, onde é exercida pressão no PDMS que proporciona uma boa estanquicidade, são feitas as zonas de entrada e saída. Nas pontas das micro-pipetas são também montados tubos de modo a proporcionar o escoamento dos



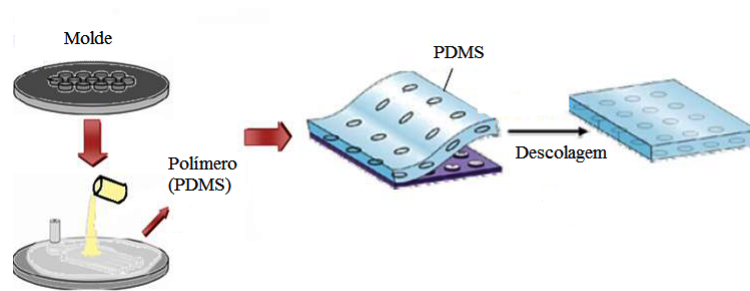


Figura 4.1: Processo de fabricação do modelo em PDMS (Adaptado de [Novais, 2012]).

fluidos provenientes de uma bomba seringa [Novais, 2012, Lima et al., 2013].

## 4.2 Sistema micro-PIV confocal

O sistema micro-PIV confocal (sistema de velocimetria por imagem de partículas (PIV) combinado com um microscópio invertido) foi desenvolvido há mais de 50 anos por um estudante de pós-doutoramento na Universidade de Harvard, Martin Minsky [Lima et al., 2013, Lima et al., 2006]. É uma técnica de imagiologia que permite a microvisualização e determinação de grandezas físicas e químicas de escoamentos que tem desempenhado um papel bastante importante na evolução da investigação na área da microfluidica. O funcionamento do microscópio confocal é muito semelhante ao funcionamento do microscópio convencional, no entanto a microscopia confocal permite a obtenção de imagens com uma melhor definição e resolução. O microscópio confocal possui um disco rotativo (SDCM), isto é, através da combinação de um SDCM com um laser, a intensidade da luz emitida é significativamente melhorada [Lima et al., 2013, Lima et al., 2009b, Lima et al., 2006].

Nos estudos desenvolvidos na área da microfluidica, quando se utiliza um microscópio convencional as partículas são iluminadas num grande volume de amostra, ou seja, as imagens obtidas apresentam, para além das partículas de interesse localizadas no plano de focagem, outras partículas situadas nas zonas fora do plano de focagem. Estas últimas proporcionam o

aparecimento de erros na determinação dos perfis de velocidade. Com o uso de um microscópio confocal é possível obter unicamente as partículas de interesse localizadas no plano de focagem. A existência de vários orifícios de abertura, *pinholes*, possibilita focar a iluminação para o plano de interesse obtendo então o pretendido [Lima et al., 2013]. Na Figura 4.2 é possível observar que a utilização do microscópio confocal permite a obtenção de imagens com uma elevada definição e contraste quando comparadas com um sistema de microscopia convencional. Devido ao facto de a microscopia confocal ter a possibilidade de obter imagens em vários planos de focagem é possível através deste sistema construir imagens tridimensionais [Lima et al., 2013, Lima et al., 2009b].

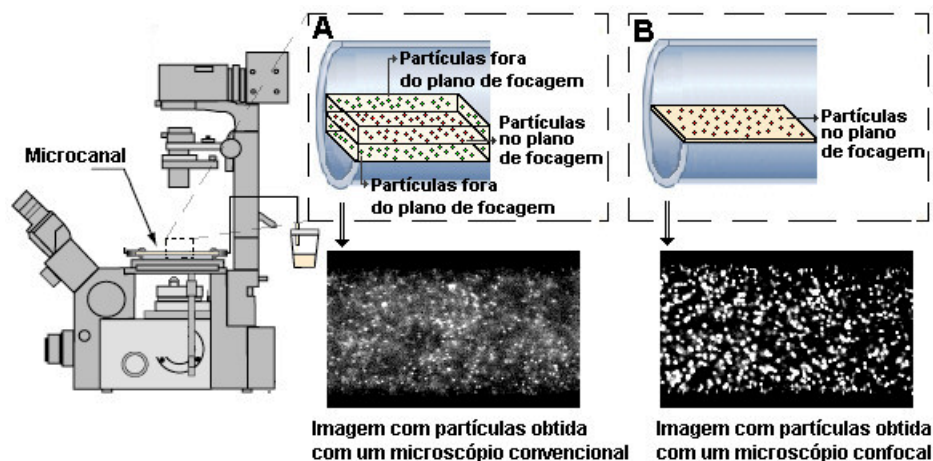


Figura 4.2: Comparação entre a microscopia convencional (A) e a confocal (B) [Lima et al., 2013].

Num sistema de micro-PIV confocal, os principais componentes consistem num microscópio combinado com uma unidade de varrimento confocal (CSU), uma objectiva de alta resolução, uma fonte de luz de elevada potência e uma câmara de imagem de alta velocidade [Lima et al., 2013]. O seu funcionamento, de um modo resumido, consiste na entrada da luz emitida pelo laser na unidade CSU e esta é conduzida para o microscópio com o objectivo de iluminar o microcanal por intermédio de uma objectiva. A luz emitida pelas partículas regressa à unidade CSU, onde é refletida por um espelho dicromático para uma câmara de imagem

de alta velocidade onde as imagens confocais são obtidas, como é possível ver na Figura 4.3 [Lima et al., 2013, Lima et al., 2009b].

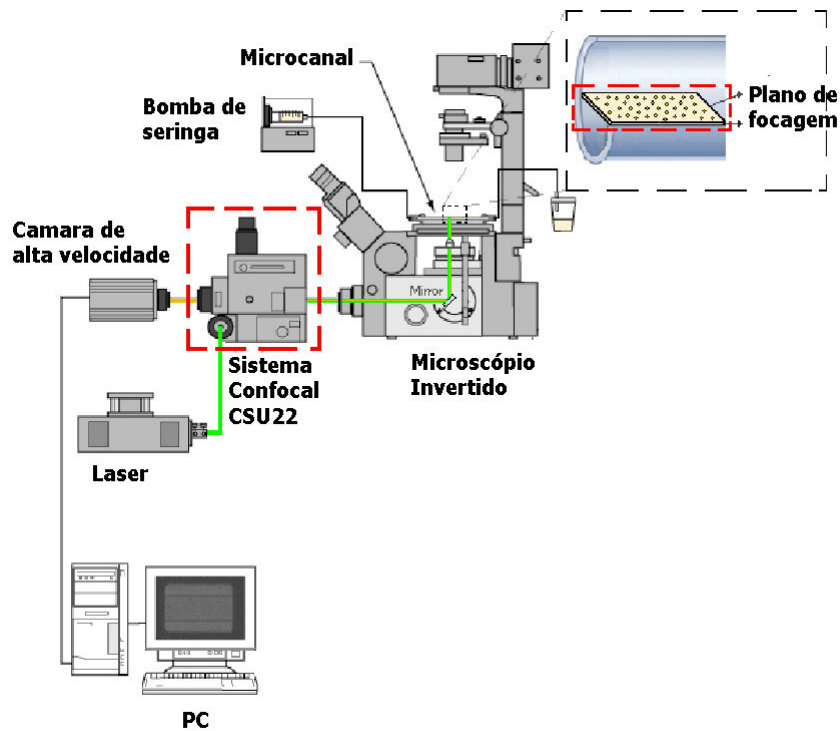


Figura 4.3: Instalação experimental de um sistema micro-PIV confocal [Lima et al., 2013].

## 4.3 Seguimento de objectos

Na realidade, os vídeos consistem em sequências de imagens. A informação contida em quaisquer duas imagens consecutivas normalmente é muito semelhante. Adicionalmente, o facto de as imagens serem reproduzidas a uma velocidade consideravelmente rápida permite que o olho humano não seja capaz de se aperceber da cadência de imagens e de alguma alteração brusca de informações entre imagens sequenciais.

A semelhança verificada entre imagens sequenciais permite a aplicação de metodologias de localização de objectos com base em técnicas de processamento de imagem, baseadas nessa

semelhança [Sousa, 2005].

### **4.3.1 Metodologias para detecção e seguimento de objectos**

A detecção de objectos em vídeo compreende a verificação da presença e, possivelmente, da posição exacta de um determinado objecto na sequência de imagens. O seguimento de objectos consiste no controlo das alterações sofridas por um determinado objecto durante uma sequência de imagens de um vídeo, incluindo a sua presença, posição, tamanho, forma, entre outros.

Numa sequência de imagens existem duas fontes de informação que podem ser utilizadas na detecção e seguimento de objectos. Pelas imagens isoladas, através das quais se pode retirar informação relativa a características visuais como a cor, textura e forma. Pela diferença entre imagens, de onde é possível obter informação relativa ao movimento. a combinação das duas fontes de informação, isto é, as características visuais combinadas com a informação de movimento, resultando da diferença entre imagens, normalmente resulta em abordagens mais eficientes [Sousa, 2005].

Existem diversas abordagens possíveis de realizar para a detecção de objectos em vídeos. Com base em algumas das suas características como a cor ou a forma; com base no modelo do objecto, efectuando a sua correspondência; ou com base no movimento do objecto. Por outro lado, o seguimento de objectos é efectuado com base na informação do movimento da forma e da cor do objecto ou na informação de movimento do objecto [Sousa, 2005].

#### **Seguimento de objectos utilizando informação do movimento**

Para este tipo de abordagens é necessário utilizar métodos cuja função consiste em efectuar o agrupamento de informação visual semelhante ao longo do tempo. O seguimento de objectos de interesse para o estudo é realizado tendo por base medições efectuadas sobre as suas propriedades geométricas (a forma) ou sobre as propriedades da sua região (a cor). Desta forma, as abordagens existentes podem ser divididas em dois grupos com base no tipo de características que utiliza:

abordagens baseadas na forma e abordagens baseadas na cor [Sousa, 2005]. As abordagens baseadas na forma utilizam a informação fornecida pela forma do objecto que é representada por um conjunto discreto de pontos do seu contorno. Este tipo de abordagens apresenta boas razões para ser utilizado, uma vez que a informação obtida não depende do tipo de movimento nem da forma do objecto. As abordagens baseadas na cor são utilizadas em técnicas de cálculo do movimento das regiões dos objectos com base na cor/textura da sua região. O cálculo da velocidade do objecto alvo é baseada na correspondência da sua região, em diferentes instantes de tempo. Desta forma existe a necessidade de uma correspondência ponto a ponto em toda a região, o que torna a operação demasiado morosa. Assim, para diminuir o tempo de operação pode recorrer-se à utilização de modelos de movimento paramétricos, que sejam capazes de descrever o movimento do alvo com um conjunto limitado de parâmetros.

#### **4.3.2 Identificação manual dos eritrócitos - *Mtrack J***

O *software Image J* foi desenvolvido pelo *National Institutes of Health*, é de domínio público, utiliza como base de funcionamento linguagem Java e funciona nos sistemas operacionais *Windows*, *Mac OSX* e *Linux* [Ferreira and Rasband, 2012].

O *Image J* consiste num programa de análise e processamento de imagem. Possibilita a leitura de diversos formatos de imagens, tais como: TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS e também formatos RAW. Este *software* tem a capacidade de visualizar, editar, analisar, processar, guardar e imprimir imagens de 8, 16 e 32 bits. O programa tem a capacidade de suportar várias imagens em série, partilhadas numa única janela, limitadas pela memória disponível.

Este *software* tem a capacidade de calcular áreas, medir distâncias e avaliar ângulos, assim como é capaz de criar histogramas de densidade. Suporta funções de processamento de imagem padrão, tais como operações aritméticas e lógicas entre imagens, manipulação de contraste, convolução, análise de Fourier, nitidez, suavização, detecção de bordas e filtragem mediana. Efectua transformações geométricas como escala, rotação e saltos.

Para se proceder à análise das imagens através do *software Image J* estas devem ser importadas através dos comandos *File>Import>Image Sequence*, seleccionando a primeira imagem da sequência. É possível, quando necessário, efectuar algum pré-processamento das imagens utilizando o comando *Brightness/Contrast*, de forma a facilitar a sua análise. Posto isto, existe a necessidade de efectuar a calibração das imagens, com base nas características em que as mesmas foram adquiridas, de forma a que os dados obtidos na análise pelo *Image J* correspondam à realidade.

Em seguida procede-se à marcação da trajectória dos elementos (eritrócitos ou células marcadas com fluorescente) utilizando o menu *Mtrack J*. Neste menu utiliza-se o comando *Add* para seleccionar a trajectória das células, individualmente, através da sequência de imagens, como é possível verificar na Figura 4.4. No final, os valores obtidos do deslocamento radial, em ordem a  $y$  (altura), são extraídos pelo comando *Measure*.

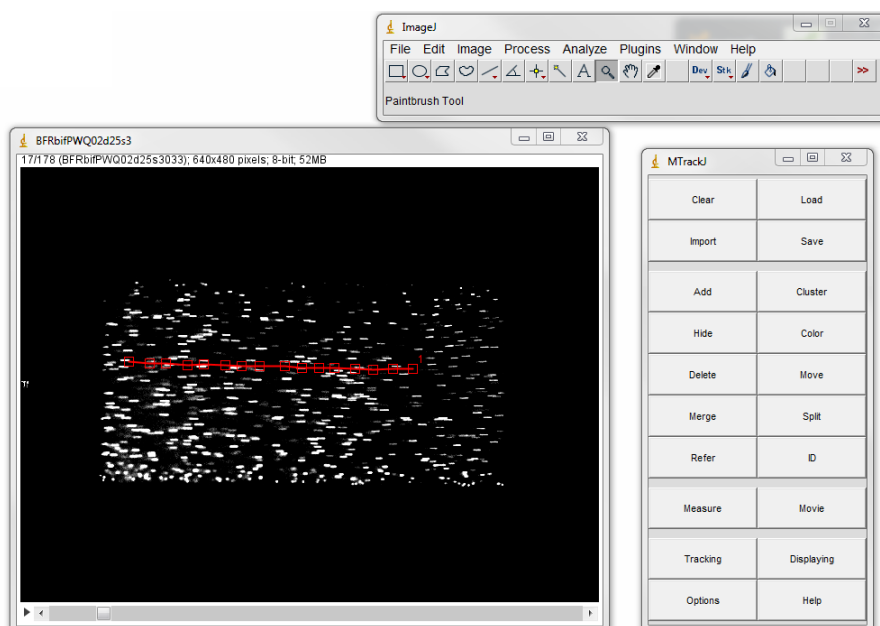


Figura 4.4: Marcação da trajectória dos eritrócitos ao longo do microcanal com o *software Image J*.

## 4.4 MatLab

O *software MatLab* foi criado à cerca de 40 anos pela empresa Norte-Americana *The Mathworks, Inc.* O nome MatLab deriva de MATrix LABoratory e é um *software* interactivo de alta performance direccionado para o cálculo numérico. Este *software*, apesar de denominar-se MatLab, o que por diversas vezes faz idealizar que se trata de um *software* utilizado apenas para as ciências das matemáticas, vai muito além dessa área.

O Matlab é um sistema para cálculo científico que proporciona um ambiente de fácil utilização com uma notação intuitiva mas poderosa. Utiliza a linguagem *MatLab*, por vezes chamada *M-código*, e integra análise numérica, cálculo com matrizes, processamento de sinais e construção de gráficos em ambiente bastante fácil de utilizar, entre outros. A sua versão base é constituída por um vasto conjunto de funções de carácter genérico, no entanto existem bibliotecas de funções adicionais, designadas de *Toolbox*, que expandem a capacidade do *software* em domínios de aplicações mais específicos. Este *software* tem a capacidade de resolução de muitos problemas numéricos em apenas uma fracção do tempo que se gastaria para escrever um programa semelhante em linguagem Fortran, Basic ou C. Para além disso, as soluções dos problemas obtidas têm a particularidade de serem expressas quase exatamente como elas são escritas matematicamente.

O *software MatLab* foi utilizado neste trabalho de forma a efectuar o cálculo do coeficiente de dispersão dos eritrócitos humanos ou das partículas fluorescentes presentes no fluido introduzido no microcanal fabricado em PDMS. Para tal foram utilizados os valores do deslocamento radial obtidos através do *software Image J* correspondentes à trajectória, em ordem a  $y$  (altura), efectuada pelos mesmos ao longo do microcanal.

A realização de medições detalhadas do movimento dos eritrócitos individuais ao nível microscópico são essenciais para elucidar ambas as propriedades mesoscópicas e macroscópicas do fluxo sanguíneo. O cálculo do coeficiente de dispersão consiste numa forma aceite para correla-

cionar os eventos microscópicos com o comportamento do fluxo macroscópico, e este é calculado pela seguinte equação [Lima et al., 2009a, Lima et al., 2008a]:

$$D_{yy}(t) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{\langle R_{i,y}(t) - R_{i,y}(0) \rangle^2}{2t} \quad (4.1)$$

onde  $R_{i,y}$  é o deslocamento radial,  $R_{i,y}(t) - R_{i,y}(0)$  é a distância radial percorrida por cada eritrócito, na posição  $y$ , durante o intervalo de tempo  $t$  e  $N$  é o número de células.

Posteriormente foi desenvolvido o código no *software MatLab* onde é feita a importação dos dados obtidos através do *software Image J* e com os mesmos foi efectuado o cálculo do coeficiente de dispersão para cada elemento (eritrócito humano ou partícula fluorescente). O intervalo de tempo considerado no estudo foi [0.02 : 0.02 : 0.44] *segundos* tendo em conta as características de quando foram obtidos os vídeos através do Sistema Micro-PIV Confocal.

Na área da hemodinâmica, em estudos *in vitro* a detecção e o seguimento de elementos presentes nos fluidos que atravessam os microcanais através de *softwares* especializados, como é o caso do *Image J*, com posterior estudo do coeficiente de dispersão, apresentam ser uma mais valia nos avanços científicos. O método de identificação manual dos eritrócitos é classificado como suficiente e relativamente eficiente. No entanto, o mesmo torna-se bastante moroso para o utilizador pelo facto de os eritrócitos terem uma dimensão bastante reduzida o que torna mais exigente ao utilizador a marcação da posição dos eritrócitos em cada imagem. A implementação do cálculo do coeficiente de dispersão através do *software MatLab* foi efectuado com o objectivo de melhorar a velocidade e a eficácia na obtenção dos resultados comparativamente com outros programas de cálculo, como por exemplo o *Microsoft Office Excel*.



## Método Semi-Automático

*Neste capítulo é feita a descrição detalhada de todos os procedimentos experimentais efectuados para o desenvolvimento do método semi-automático descrito neste trabalho. É efectuada primeiramente uma introdução onde é descrito resumidamente o trabalho efectuado por Leble et al. que consistiu no ponto de partida para este trabalho [Leble et al., 2011a]. Seguidamente é relatado pormenorizadamente o desenvolvimento do método semi-automático. São enunciados os materiais desenvolvidos por Leble et al. utilizados neste trabalho e todos os procedimentos efectuados nomeadamente a detecção e seguimentos dos elementos nos segmentos de imagens e o cálculo do coeficiente de dispersão [Leble et al., 2011a].*

### 5.1 Introdução

Leble et al. ao longo do seu percurso de investigação depararam-se com a importância de investigar detalhadamente o comportamento do escoamento sanguíneo que ocorre nas bifurcações divergentes e convergentes [Leble et al., 2011a]. Desta forma, decidiram investigar a variação do perfil de velocidade dos componentes sanguíneos em dois fluidos distintos que fluem através de bifurcações: eritrócitos humanos em suspensão numa solução de dextrano 40 com 14% de nível de hematócrito ( $D \times 40$ ) e água pura com partículas marcadas com fluorescente.

Foram efectuadas inúmeras investigações de forma a conhecer a geometria e todas as caracte-

rísticas das bifurcações divergentes e convergentes nos microcanais, analisando diversos vídeos e imagens onde eram perfeitamente visíveis as paredes dos microcanais. Após a obtenção das características da geometria a utilizar no estudo, uma bifurcação divergente seguida de uma bifurcação convergente, como se verifica na Figura 5.1, esta foi constituída através da técnica de *Soft Lithography* (Litografia suave) com recurso a *Polydimethylsiloxane* (PDMS). O microcanal originado foi colocado em ambiente controlado com recurso a micropipetas, de forma a manter o valor do caudal constante,  $Q = 3 \times 10^{-12} \text{ m}^3/\text{s}$ , por meio de uma bomba de seringa.

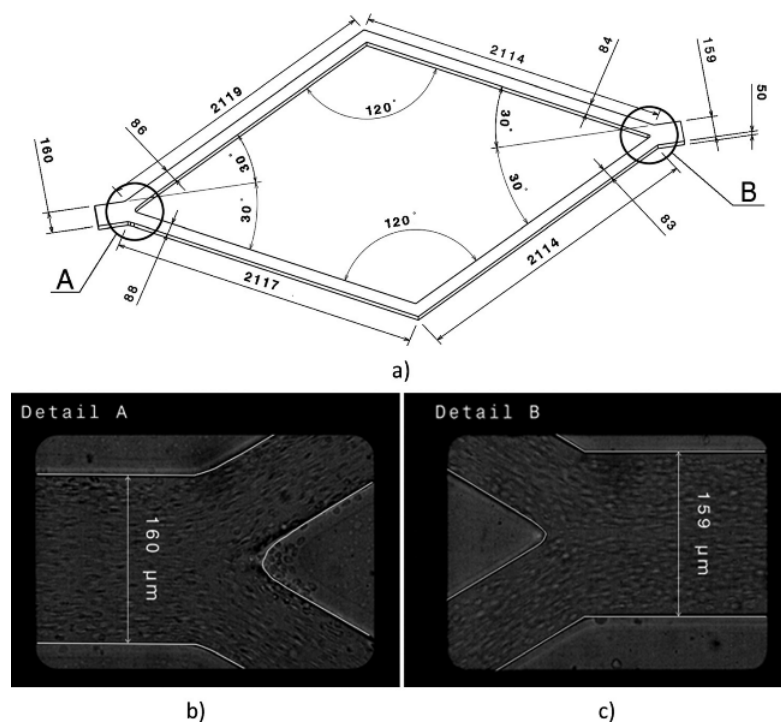


Figura 5.1: Geometria completa dos microcanais (a), *Detail A* (b) e *Detail B* (c) mostram a geometria real das bifurcações e a geometria utilizada nas simulações. Todas as dimensões estão em micrometros ( $\mu\text{m}$ ) [Leble et al., 2011a].

Procedeu-se à passagem dos líquidos anteriormente referidos e, a cada passagem individual na geometria apresentada, foram produzidos vídeos, com auxílio de um sistema específico para o efeito, onde foi possível visualizar o fluxo dos eritrócitos humanos e das partículas fluorescentes. Seguidamente, os vídeos foram convertidos em segmentos de imagens, a 100 imagens/s com um

tempo de exposição de 9,4 ms.

As imagens obtidas foram importadas para o *software Image J* e analisadas através do sistema manual de detecção e seguimento de objectos, *Mtrack J*. Com isto era pretendido detectar e seguir as partículas fluorescentes na água pura e os eritrócitos humanos no  $D \times 40$  obtendo posteriormente o perfil de escoamento dos elementos no microcanal com uma bifurcação divergente e uma bifurcação convergente.

Por fim, foi realizada a implementação através do *software MatLab* de códigos onde foram introduzidos os valores obtidos através do *software Image J*, com o objectivo de obter o perfil de dispersão do fluxo das partículas fluorescentes e dos eritrócitos humanos no escoamento ao longo do microcanal contendo uma bifurcação divergente e uma bifurcação convergente.

## 5.2 Métodos Utilizados

Tendo por base o trabalho desenvolvido por Leble et al., foi pensado reutilizar alguns dados obtidos pelos mesmos e, com eles, efectuar um estudo de análise do coeficiente de dispersão dos elementos que fluem no micronal de PDMS (partículas fluorescentes e eritrócitos humanos) [Leble et al., 2011a]. Para tal foi desenvolvido um método semi-automático para o cálculo do coeficiente de dispersão dos eritrócitos nos microcanaís, com os valores do perfil do escoamento obtidos através do uso do *software Image J*.

Foram analisados os vídeos obtidos por Leble et al. e seleccionados alguns deles nos quais é visível o escoamento de dois fluidos distintos através de microcanaís de PDMS: água pura com partículas fluorescentes e eritrócitos humanos numa solução  $D \times 40$  [Leble et al., 2011a]. Os vídeos seleccionados correspondem às zonas antes e depois da zona de bifurcação, como se pode verificar na Tabela 5.1. Adicionalmente, o *software Image J*, que foi o recurso utilizado neste estudo, não permite efectuar a relação da inclinação do microcanal onde se verifica uma bifurcação com o valor do perfil de escoamento obtido. Desta forma, o estudo centraliza-se no

estudo do efeito da zona de bifurcação, divergente ou convergente, no coeficiente de dispersão dos eritrócitos nos microcanais.

Tabela 5.1: Lista dos vídeos seleccionados, respectivo fluido presente no vídeo e zona de observação.

	Vídeo (nome do ficheiro)	Elemento no Fluido	Zona de estudo
#Vídeo 1	BFRbifPWQ02d25s6	Partículas fluorescentes em água pura	Antes da bifurcação
#Vídeo 2	AFTbifPWQ02d25s4	Partículas fluorescentes em água pura	Depois da bifurcação
#Vídeo 3	BFbif32t1	Eritrócitos humanos em $D \times 40$	Antes da bifurcação
#Vídeo 4	BFbif32t2	Eritrócitos humanos em $D \times 40$	Antes da bifurcação
#Vídeo 5	BFTOPsbif32Img15t10	Eritrócitos humanos em $D \times 40$	Antes da bifurcação
#Vídeo 6	AFTOPsbif32Img15t11	Eritrócitos humanos em $D \times 40$	Depois da bifurcação
#Vídeo 7	AFTOPsbif32Img15t12	Eritrócitos humanos em $D \times 40$	Depois da bifurcação
#Vídeo 8	AFTOPsbif32Img15t14	Eritrócitos humanos em $D \times 40$	Depois da bifurcação
#Vídeo 9	AFTOPsbif32Img15t16	Eritrócitos humanos em $D \times 40$	Depois da bifurcação

Os vídeos foram convertidos em segmentos de imagens na ordem das centenas através do *software Phantom*, variando o número de imagens dos segmentos de vídeo para vídeo. Este *software* consiste num sistema de imagens de alta velocidade totalmente digital com a capacidade de realizar gravação de imagem em alta resolução. As suas funções permitem converter um vídeo, neste caso com a extensão .cin, em imagens de modo a conservar a maioria da informação contida no vídeo, considerando a perda de informação no intervalo de criação de duas imagens consecutivas exígua. Os segmentos de imagens obtidos através da conversão individual dos 9

vídeos em estudo foram analisados individualmente.

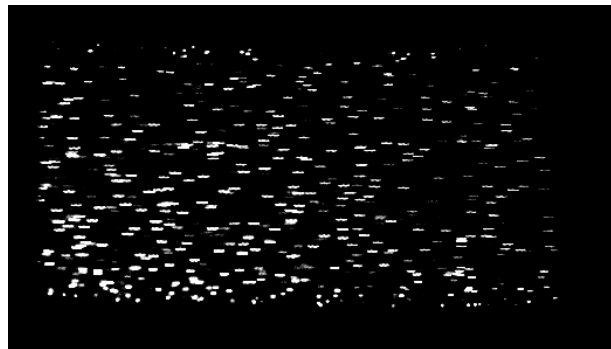
Como é possível verificar através da Tabela 5.1 o número de vídeos estudados para cada fluido é diferente. Isto é, no caso das partículas fluorescentes em água pura foi estudado um vídeo para cada zona de estudo. Já no caso dos eritrócitos humanos em  $D \times 40$  no total foram analisados 7 vídeos. Esta variação no número de vídeos analisados entre os diferentes casos verifica-se porque nos segmentos de imagens do caso das partículas fluorescentes em água pura o número de elementos visíveis é muito superior ao número de elementos visíveis nos segmentos de imagens do caso dos eritrócitos humanos em  $D \times 40$ , como é possível verificar na Figura 5.2. Desta forma, existe a necessidade de analisar um maior número de vídeos para o caso dos eritrócitos humanos em  $D \times 40$  de forma a obter, no total, um número considerado de elementos estudados de forma a ser possível comparar os resultados com o caso das partículas fluorescentes em água pura.

### 5.2.1 Detecção e seguimento dos elementos nos segmentos de imagens

Foi efectuada a importação do primeiro segmento de imagens para o *software Image J* para efectuar a detecção e seguimento dos elementos presentes no vídeo, dependentes do fluido nele presente. Houve a necessidade de efectuar alterações a nível de contraste e luminosidade nas imagens de forma a tornar mais perceptível o conteúdo das mesmas, neste caso as partículas fluorescentes ou os eritrócitos humanos.

O *software* solicitou alguns critérios relacionados com a aquisição dos vídeos e com a geometria do microcanal filmado para a calibração das imagens. Em particular foi necessário definir o passo entre imagens (*increment*) e os valores da largura dos microcanais em estudo, dependendo do local de estudo, que se encontram definidos na Figura 5.1. Os valores definidos foram:

- *Increment* = 2;
- *Know distance* (zona: Antes da bifurcação) =  $160\mu m$ ;



(a) Partículas fluorescentes em água pura

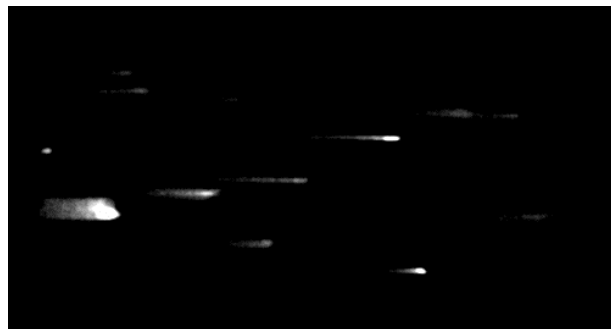
(b) Eritrócitos humanos em  $D \times 40$ 

Figura 5.2: Comparação do número de elementos nos segmentos de imagens nos diferentes fluidos em estudo.

- *Know distance* (zona: Depois da bifurcação) =  $159\mu m$ ;
- *Frame interval* =  $0.02s$ .

Para o cálculo do *Frame interval*, sabendo que o intervalo de tempo entre as imagens em estudo é de  $10000\mu s$  (característica dos vídeos), o que equivale a  $0.01s$  e tendo em atenção que o *Increment* utilizado foi 2 (por opção), efectuando a multiplicação dos dois últimos valores, obtém-se o valor de *Frame interval*.

Feita a calibração do segmento de imagens, através das características do seu vídeo, foi utilizado o menu *Mtrack J* do *software Image J* para proceder à selecção e seguimento dos elementos contidos nas imagens (células fluorescentes e eritrócitos humanos). Esta acção é efectuada através do uso do comando "*Add*" e os valores obtidos posteriormente são referentes ao desloca-

mento radial, posição em  $y$  (altura), do elemento relativamente à área de visualização. Devido à existência de espaço não referente ao microcanal na área de visualização houve a necessidade de efectuar uma segunda calibração, isto é, identificar o valor em  $y$  (altura) da parede superior e inferior do microcanal para posteriormente reajustar os valores do deslocamento radial dos elementos seguidos (admitindo na parede superior  $y = 0$ , subtraindo aos valores dos elementos o valor obtido da parede superior).

Após clicar no comando "*Add*", procedeu-se ao seguimento do elemento seleccionado no segmento de imagens, clicando com o cursor do rato sobre o mesmo ( $n^{\circ}$  cliques =  $n^{\circ}$  pontos) assim que aparecesse do lado esquerdo da área de visualização e continuando a efectuar o mesmo procedimento sobre o mesmo elemento, de imagem em imagem, até este desaparecer do lado direito da área de visualização (cada vez que é efectuado o clique com o cursor sobre o elemento numa imagem, o *software* automaticamente passa para a imagem seguinte para continuação do seguimento). No final foi obtida uma linha resultante do comportamento do elemento seleccionado ao longo do escoamento através do microcanal naquele intervalo de tempo (tempo em que o elemento era visível na área de visualização), como é possível verificar na Figura 5.3, onde são visíveis sobre essa mesma linha os pontos marcados referentes à posição do elemento no microcanal.

Depois de efectuar o seguimento de todos os elementos seleccionados no segmento de imagens em análise, os resultados dos "*Tracks*" (seguimentos) foram gravados e extraídos através do comando *Measure tracks* num ficheiro de formato *.txt* de forma a ser possível a sua posterior utilização. É possível visualizar as imagens obtidas através do *Image J* do seguimento dos elementos em cada vídeo no Anexo A - Imagens dos *Tracks* dos elementos efectuados nos vídeos em análise.

Este procedimento foi efectuado diversas vezes nos 9 segmentos de imagens dos vídeos seleccionados. As primeiras vezes em que o procedimento foi efectuado, os resultados obtidos não foram satisfatórios. Em várias análises efectuadas verificaram-se falhas cometidas como por

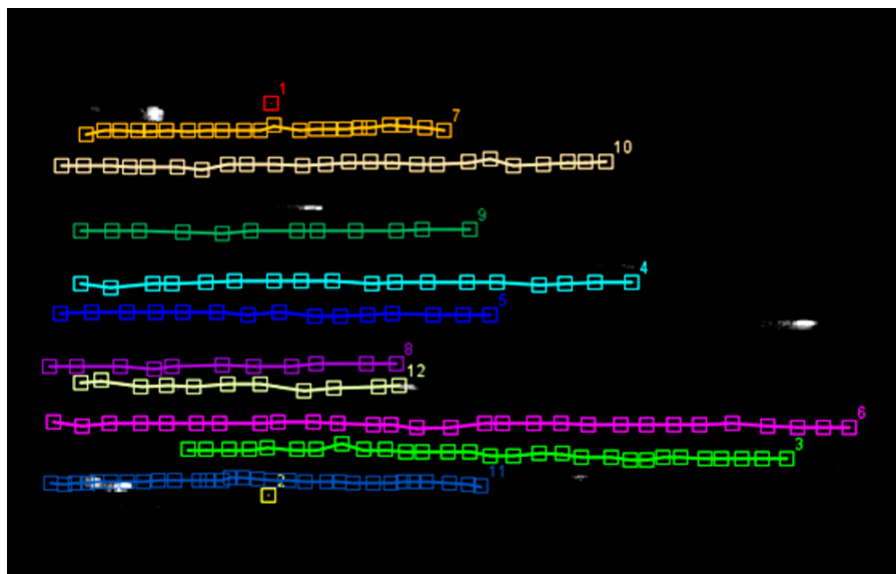


Figura 5.3: Imagem obtida no *Image J* do seguimento dos vários eritrócitos do Vídeo 4 (elemento 1 e 2 foram utilizados para a segunda calibração).

exemplo: falta de introdução de alguns elementos de calibração, número de elementos seleccionados bastante reduzido ou intervalo de tempo do escoamento do elemento no seu seguimento insuficiente. Desta forma existiu a necessidade de criar uns novos parâmetros de forma a garantir que as falhas verificadas seriam colmatadas. Os parâmetros foram:

- Número mínimo de seguimentos efectuados por segmentos de imagens = 5;
- Número mínimo de pontos por seguimento = 7;

Os procedimentos foram então repetidos de acordo com os elementos de calibração e tendo em conta os parâmetros anteriormente referidos. Verificou-se após a análise dos resultados destes novos procedimentos que as falhas verificadas anteriormente já não estavam presentes.

Para efectuar a segunda calibração, a alteração dos valores do deslocamento radial, dos seguimentos dos elementos com base no valor da parede superior do microcanal, efectuou-se a importação do ficheiro *.txt* para o programa *Microsoft Office Excel* onde aos valores dos deslocamentos radiais dos seguimentos dos elementos foi retirado o valor da parede superior do



microcanal. Desta forma, os valores dos deslocamentos radiais estavam calibrados de acordo com a área em estudo, o microcanal, e não com a área de visualização, a imagem que continha o microcanal e informação extra desnecessária. O ficheiro resultante das alterações da segunda calibração foi gravado através do programa *Microsoft Office Excel* com a extensão *.xlsx*. Este mantém sempre o mesmo formato para todos os segmentos de imagens diferenciando-se no número de seguimentos e respectivos pontos e nos valores do deslocamento radial.

### 5.2.2 Cálculo do Coeficiente de Dispersão ( $D_{yy}$ )

O cálculo do coeficiente de dispersão é realizado através da Equação 4.1 apresentada no Capítulo 4. O cálculo do  $D_{yy}$  é normalmente efectuado de forma manual, através do programa *Microsoft Office Excel*, onde no ficheiro se encontra a equação implementada e os dados obtidos pelo *software Image J* têm que ser correctamente separados e colocados no ficheiro, por seguimento, para ser efectuado o cálculo do  $D_{yy}$ . Neste estudo, o método manual foi aplicado a todos os seguimentos de todos os 9 vídeos em análise de forma a existirem valores do  $D_{yy}$  calculados por um método já aceite, para posterior comparação. Este método apresenta algumas desvantagens: é um método bastante moroso; requer bastante atenção e paciência na separação dos dados e na colocação dos mesmos no ficheiro correcto e, como se trata de um método manual, é mais propício à ocorrência de erros.

Posteriormente foi utilizado o *software MatLab* para desenvolver um método semi-automático para o cálculo do coeficiente de dispersão dos elementos seleccionados e seguidos nos segmentos de imagens resultantes dos 9 vídeos em análise. O objectivo é apresentar um método variante do método manual, um método semi-automático, com a mesma finalidade, capaz de calcular o  $D_{yy}$ , mas que seja mais simples e portanto mais fácil de utilizar, mais rápido de implementar e mais eficaz, diminuindo a possibilidade de ocorrência de erros. Foi então desenvolvido o método semi-automático para o cálculo do  $D_{yy}$  através de um código em linguagem *Matlab* de acordo com uma metodologia constituída por duas etapas.

## Etapa 1

Primeiramente foi importado o ficheiro resultante das alterações da segunda calibração e, devido ao facto de este conter mais informação do que a desejada, foi necessário efectuar a selecção da informação necessária para o objectivo em causa (cálculo do  $D_{yy}$ ). Foram então seleccionadas as colunas no ficheiro que continham os valores desejados: a coluna que contém os valores do deslocamento radial por ponto de cada seguimento e a coluna que identifica a que seguimento corresponde o valor do deslocamento radial, como é possível identificar na Figura 5.4. Desta forma, os dados introduzidos no *software MatLab* encontram-se numa matriz geral ( $m \times 2$ ) que possui a informação de todos os valores do deslocamento radial de todos os seguimentos efectuados ( $m$ ) e o respectivo seguimento.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1															
2	Nr	TID	PID	x [f.m]	y [f.m]		t [sec]	l [val]	Len [f.m]	D2S [f.m]	D2R [f.m]	D2P [f.m]	v [f.m/sec]	? [deg]	?? [deg]
3	1	1	1	142,13	84,83		0	0	0	0	NA	NA	NA	NA	NA
4	2	2	1	149,88	243,31		0	0	0	0	NA	NA	NA	NA	NA
5	3	3	1	64,697	97,22	12,39	0	185	0	0	NA	NA	NA	NA	NA
6	4	3	2	70,892	97,22	12,39	0,02	255	6,195	6,195	NA	6,195	309,74	0	NA
7	5	3	3	78,635	97,22	12,39	0,04	254	13,938	13,938	NA	7,744	387,18	0	0
8	6	3	4	87,411	97,736	12,906	0,06	253	22,729	22,72	NA	8,791	439,56	3,366	3,366
9	7	3	5	94,639	97,736	12,906	0,08	254	29,957	29,946	NA	7,227	361,36	0	-3,366
10	8	3	6	102,9	97,736	12,906	0,1	255	38,216	38,205	NA	8,26	412,99	0	0
11	9	3	7	109,61	97,736	12,906	0,12	126	44,928	44,915	NA	6,711	335,55	0	0
12	10	3	8	117,35	97,736	12,906	0,14	34	52,671	52,658	NA	7,744	387,18	0	0
13	11	3	9	125,61	98,252	13,422	0,16	254	60,947	60,924	NA	8,276	413,79	3,576	3,576
14	12	3	10	132,84	98,768	13,938	0,18	61	68,193	68,16	NA	7,246	362,28	4,086	0,509
15	13	3	11	140,07	100,32	15,487	0,2	255	75,584	75,434	NA	7,391	369,57	12,095	8,009
16	14	3	12	147,29	101,87	17,036	0,22	122	82,975	82,728	NA	7,391	369,57	12,095	0
17	15	3	13	155,55	100,83	16,003	0,24	255	91,299	90,929	NA	8,324	416,2	-7,125	-19,22
18	16	3	14	164,85	99,801	14,971	0,26	0	100,65	100,18	NA	9,349	467,47	-6,34	0,785
19	17	3	15	171,04	100,83	16,003	0,28	245	106,93	106,41	NA	6,28	314,01	9,462	15,803
20	18	3	16	179,3	100,32	15,487	0,3	255	115,21	114,65	NA	8,276	413,79	-3,576	-13,04
21	19	3	17	187,04	99,801	14,971	0,32	0	122,97	122,38	NA	7,761	388,04	-3,814	-0,238
22	20	3	18	194,27	99,285	14,455	0,34	0	130,21	129,59	NA	7,246	362,28	-4,086	-0,272
23	21	3	19	202,02	99,801	14,971	0,36	0	137,97	137,34	NA	7,761	388,04	3,814	7,9
24	22	3	20	209,76	99,801	14,971	0,38	0	145,72	145,09	NA	7,744	387,18	0	-3,814
25	23	3	21	215,95	99,801	14,971	0,4	8	151,91	151,28	NA	6,195	309,74	0	0
26	24	3	22	225,76	100,32	15,487	0,42	81	161,73	161,1	NA	9,822	491,1	3,013	3,013
27	25	3	23	231,96	99,801	14,971	0,44	0	167,95	167,28	NA	6,216	310,81	-4,764	-7,776
28	26	4	1	89,992	111,67	26,844	0	255	0	0	NA	NA	NA	NA	NA
29	27	4	2	102,9	112,19	27,361	0,02	254	12,916	12,916	NA	12,916	645,81	2,291	NA
30	28	4	3	112,19	112,19	27,361	0,04	255	22,208	22,204	NA	9,292	464,61	0	-2,291
31	29	4	4	127,16	112,19	27,361	0,06	97	37,179	37,172	NA	14,971	748,54	0	0
32	30	4	5	139,55	113,22	28,393	0,08	165	49,612	49,583	NA	12,433	621,63	4,764	4,764
33	31	4	6	150,39	113,22	28,393	0,1	40	60,453	60,419	NA	10,841	542,05	0	-4,764
34	32	4	7	162,78	113,74	28,909	0,12	241	72,853	72,818	NA	12,4	620,02	2,386	2,386
35	33	4	8	177,24	112,71	27,877	0,14	255	87,344	87,25	NA	14,491	724,57	-4,086	-6,472
36	34	4	9	188,08	113,22	28,393	0,16	255	98,198	98,097	NA	10,853	542,66	2,726	6,812

Figura 5.4: Imagem ilustrativa de um ficheiro, no programa *Microsoft Office Excel*, que contém os valores dos deslocamentos radiais dos seguimentos e indicação das colunas seleccionadas - a primeira coluna identifica o seguimento e a segunda coluna refere o valor do deslocamento radial.

## Etapa 2

Seguidamente, de forma a proceder ao cálculo do  $D_{yy}$  de cada seguimento, houve a necessidade de separar os valores do deslocamento radial de cada seguimento. Foi então subdividida a matriz geral em  $m$  vectores de dimensão  $1 \times n$ , em que  $m$  é o número de seguimentos e  $n$  corresponde ao número de pontos do seguimento em questão. Com os valores presentes nos vectores criados foi efectuado o cálculo do  $D_{yy}$ , para cada vector referente a cada seguimento, de acordo com a Equação 4.1 apresentada anteriormente no Capítulo 4.

Os resultados do  $D_{yy}$  obtidos foram extraídos do *software MatLab* para um ficheiro *.xlsx* para posterior análise. Toda a análise desenvolvida após a obtenção dos valores do  $D_{yy}$  foi efectuada com recurso ao programa *Microsoft Office Excel*. Foram feitos alguns ajustes nos valores a utilizar no estudo, nomeadamente nos valores do deslocamento radial obtidos através do uso do *software Image J*. Isto é, alguns seguimentos foram eliminados do estudo devido à sua reduzida dimensão (número de pontos), e por isso não teriam qualquer influência nos resultados. Assim como foi decidido um novo período temporal para o estudo,  $t = [0, 0.26]$  segundos (relembro que o espaçamento é de 0.02 segundos). Os valores de  $D_{yy}$  de cada seguimento efectuado em cada segmento de imagens podem ser consultados no Anexo B - Valores do Coeficiente de Dispersão ( $D_{yy}$ ) e a sua representação gráfica pode ser consultada no Anexo C - Representação gráfica dos valores do Coeficiente de Dispersão ( $D_{yy}$ ).

Após a realização do cálculo do coeficiente de dispersão para cada seguimento em cada instante  $t$ , para cada vídeo, através de ambos os métodos: método manual com recurso ao programa *Microsoft Office Excel* e do método semi-automático com recurso ao *software MatLab*, os valores foram comparados de forma a validar o método desenvolvido. Seguidamente foram efectuadas diversas implementações do método para análise.



## Apresentação e Discussão dos Resultados

*Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos no estudo realizado. Primeiramente é validado o método desenvolvido através do software MatLab comparando-o com o método manual que utiliza o programa Microsoft Office Excel. Seguidamente são apresentados os resultados obtidos no cálculo do coeficiente de dispersão com o método desenvolvido para os quatro casos em estudo: para as partículas fluorescentes em água pura quer para os eritrócitos humanos em solução  $D \times 40$ , em ambos os locais em estudo: antes da bifurcação divergente e depois da bifurcação convergente.*

### 6.1 Comparação *MatLab* Vs *Excel*

O método semi-automático desenvolvido através do *MatLab* para calcular o coeficiente de dispersão foi implementado nos 9 vídeos em análise, com os valores do deslocamento radial dos diversos seguimentos efectuados nos vídeos obtidos através do uso do *Image J*. O primeiro objectivo é a obtenção de valores do coeficiente de dispersão de forma a ser possível efectuar uma comparação desses valores com os valores obtidos através do método manual com recurso ao *Excel*. Seguidamente são apresentados os resultados obtidos para os quatro casos em estudo.

### 6.1.1 Partículas fluorescentes em água pura

Foi efectuada uma comparação dos valores do  $D_{yy}$  obtidos através do método manual e através do método semi-automático desenvolvido no caso das partículas fluorescentes em água pura para ambas as geometrias estudadas, antes da bifurcação divergente e depois da bifurcação convergente.

#### Antes da bifurcação

Para o caso das partículas fluorescentes em água pura na geometria antes da bifurcação divergente foi analisado um vídeo: vídeo 1. O vídeo 1 foi analisado com 20 seguimentos. Seguidamente, na Figura 6.1, encontram-se representados os resultados obtidos das médias dos valores do  $D_{yy}$  obtidos pelo método manual no *Excel* e pelo método semi-automático no *MatLab*.

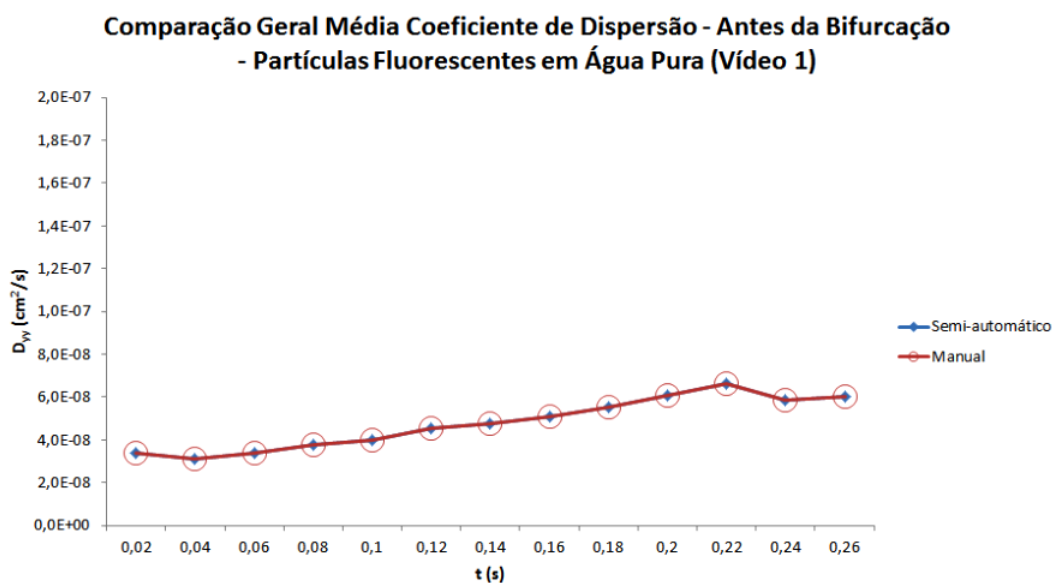


Figura 6.1: Comparação dos resultados obtidos através do método semi-automático e através do método manual para as partículas fluorescentes em água pura, antes da bifurcação divergente.

Como é possível verificar na Figura 6.1, os resultados obtidos por ambos os métodos são idênticos, não apresentando qualquer variação. Em termos gerais, verifica-se a sobreposição dos

valores do  $D_{yy}$  em todos os instantes  $t$  para os métodos estudados.

### Depois da bifurcação

Para o caso das partículas fluorescentes em água pura na geometria depois da bifurcação convergente foi analisado um vídeo: vídeo 2. O vídeo 2 foi analisado com 31 seguimentos. Seguidamente, na Figura 6.2, encontram-se representados os resultados obtidos das médias dos valores do  $D_{yy}$  obtidos pelo método manual no *Excel* e pelo método semi-automático no *MatLab*.

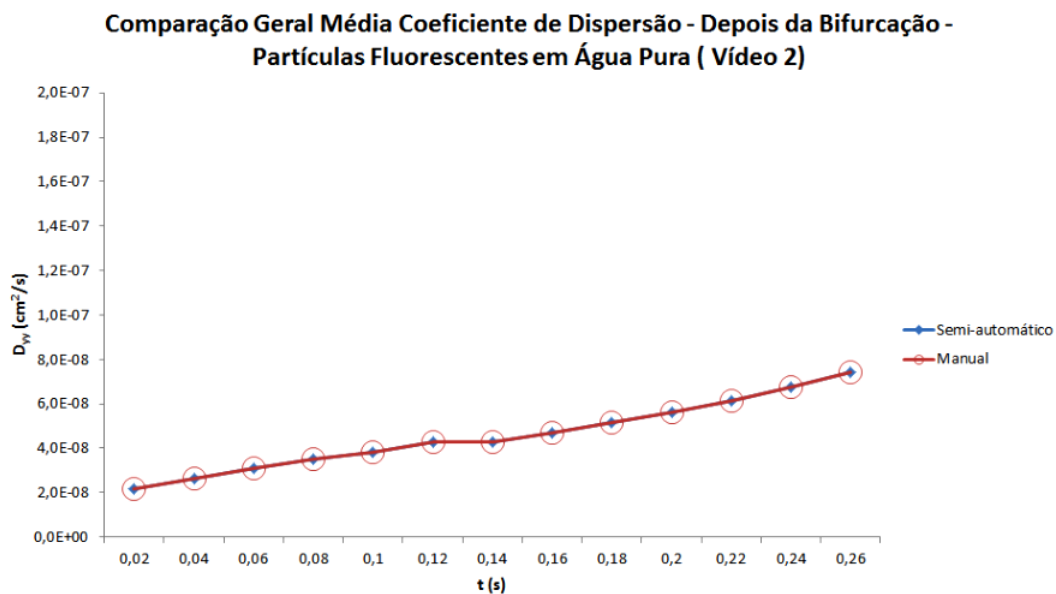


Figura 6.2: Comparação dos resultados obtidos através do método semi-automático e através do método manual para as partículas fluorescentes em água pura, depois da bifurcação convergente.

Na Figura 6.2 é possível também observar que os resultados obtidos por ambos os métodos são idênticos, não apresentando qualquer variação. Em termos gerais, verifica-se a sobreposição dos valores do  $D_{yy}$  em todos os instantes  $t$  para os métodos estudados.

### 6.1.2 Eritrócitos humanos em $D \times 40$

Foi efectuada a comparação dos valores do  $D_{yy}$  obtidos através do método manual pelo *Excel* e através do método semi-automático pelo *MatLab* desenvolvido no caso dos eritrócitos humanos em  $D \times 40$  para ambas as geometrias estudadas, antes da bifurcação divergente e depois da bifurcação convergente.

#### Antes da bifurcação

Para o caso dos eritrócitos humanos em  $D \times 40$  na geometria antes da bifurcação foram analisados no total 3 vídeos: vídeo 3, vídeo 4 e vídeo 5. O vídeo 3 foi analisado com 7 seguimentos, o vídeo 4 com 6 seguimentos e o vídeo 5 com 6 seguimentos. Seguidamente, na Figura 6.3, encontram-se representados os resultados obtidos das médias dos valores do  $D_{yy}$  obtidos pelo método manual no *Excel* e pelo método semi-automático no *MatLab*.

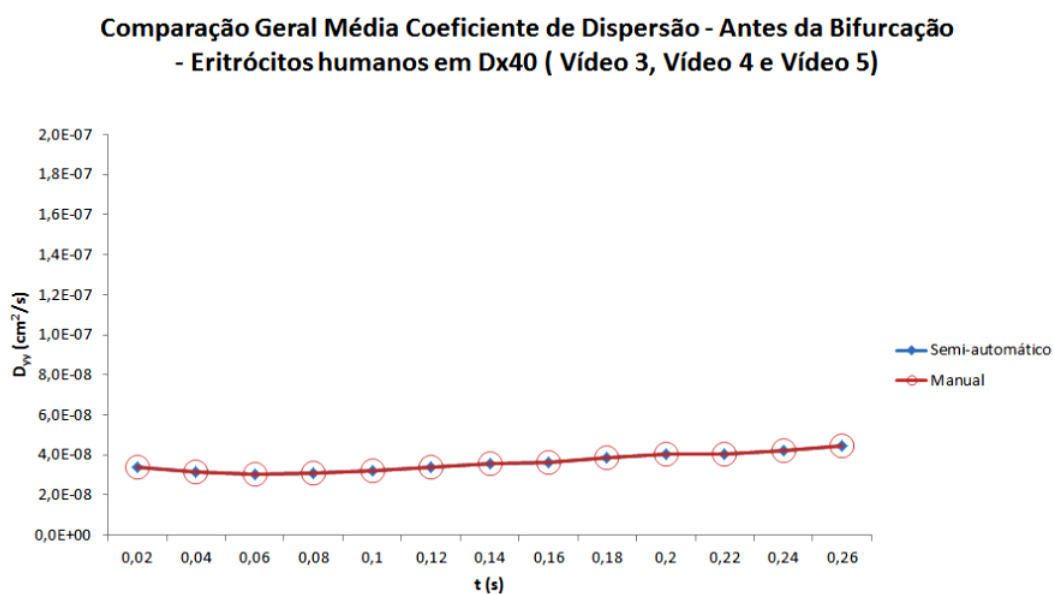


Figura 6.3: Comparação dos resultados obtidos através do método semi-automático e através do método manual para os eritrócitos humanos em solução  $D \times 40$ , antes da bifurcação divergente.

Como é possível verificar através da Figura 6.3, os valores obtidos por ambos os métodos



também são idênticos, não apresentando qualquer variação. Verifica-se novamente a sobreposição gráfica dos valores do  $D_{yy}$  em todos os instantes  $t$  para os métodos estudados.

### Depois da bifurcação

Para o caso dos eritrócitos humanos em  $D \times 40$  na geometria depois da bifurcação convergente foram analisados no total 4 vídeos; vídeo 6, vídeo 7, vídeo 8 e vídeo 9. O vídeo 6 foi analisado com 7 seguimentos, o vídeo 7 com 6 seguimentos, o vídeo 8 com 6 seguimentos e o vídeo 9 com 6 seguimentos. Seguidamente, na Figura 6.4, encontram-se representados os resultados obtidos das médias dos valores do  $D_{yy}$  obtidos pelo método manual no *Excel* e pelo método semi-automático no *MatLab*.

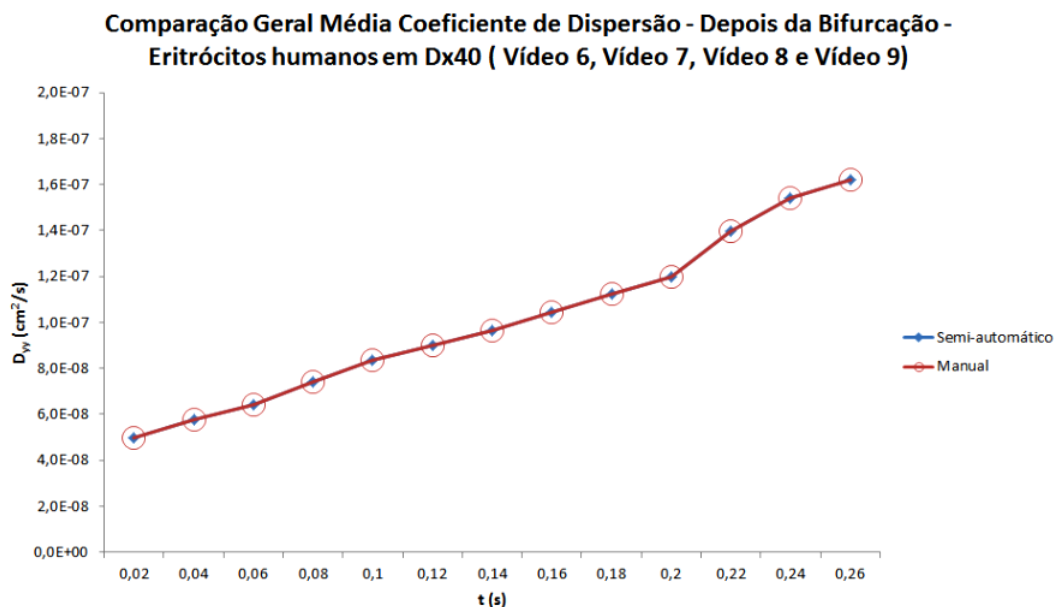


Figura 6.4: Comparação dos resultados obtidos através do método semi-automático e através do método manual para os eritrócitos humanos em solução  $D \times 40$ , depois da bifurcação convergente.

Na Figura 6.4 também é possível também observar que os resultados obtidos por ambos os métodos são idênticos, não apresentando qualquer variação. Em termos gerais, verifica-se a sobreposição dos valores do  $D_{yy}$  em todos os instantes  $t$  para os métodos estudados.

De uma forma geral, os resultados obtidos para as partículas fluorescentes em água pura em ambas as geometrias em estudo, antes da bifurcação divergente e depois da bifurcação convergente, confirmam a igualdade dos valores do  $D_{yy}$  obtidos através de ambos os métodos. Adicionalmente, para o caso dos eritrócitos humanos em  $D \times 40$  em ambas as geometrias em estudo, antes da bifurcação divergente e depois da bifurcação convergente, verifica-se ao longo de todo o intervalo de tempo a sobreposição gráfica dos valores do  $D_{yy}$  obtidos através de ambos os métodos. Atendendo à excelente sobreposição dos resultados em cada caso, é possível validar o método semi-automático desenvolvido com recurso ao *software MatLab* tornando-o um método válido e viável para o cálculo do coeficiente de dispersão.

## 6.2 Determinação do Coeficiente de Dispersão ( $D_{yy}$ )

O segundo objectivo na implementação do método semi-automático desenvolvido através do *software MatLab* para calcular o coeficiente de dispersão dos elementos seleccionados e seguidos nos 9 vídeos é para efectuar uma análise dos resultados obtidos com o intuito de estudar a influência de uma bifurcação no escoamento sanguíneo na microcirculação. Para isso foi realizada uma análise nos momentos anteriores à bifurcação divergente e nos momentos posteriores à bifurcação convergente, assim é possível efectuar uma comparação e concluir qual a influência da presença de uma bifurcação divergente e convergente para a circulação sanguínea particularmente na microcirculação.

### 6.2.1 Partículas fluorescentes em água pura

Foi efectuada a comparação dos valores do  $D_{yy}$  obtidos no caso das partículas fluorescentes em água pura para ambas as geometrias estudadas, antes da bifurcação divergente e depois da bi-

furcação convergente. Primeiramente foi efectuada a comparação dos valores obtidos para cada geometria e só no final se efectuou a comparação entre as duas geometrias distintas estudadas.

### Antes da bifurcação

No caso das partículas fluorescentes em água pura na geometria antes da bifurcação divergente, como foi dito anteriormente, foi analisado um vídeo: vídeo 1. O vídeo 1 foi analisado com 20 seguimentos. Na Figura 6.5 estão representados os valores do  $D_{yy}$  das partículas fluorescentes estudadas, resultando no comportamento das mesmas em água pura num microcanal antes da presença da bifurcação divergente.

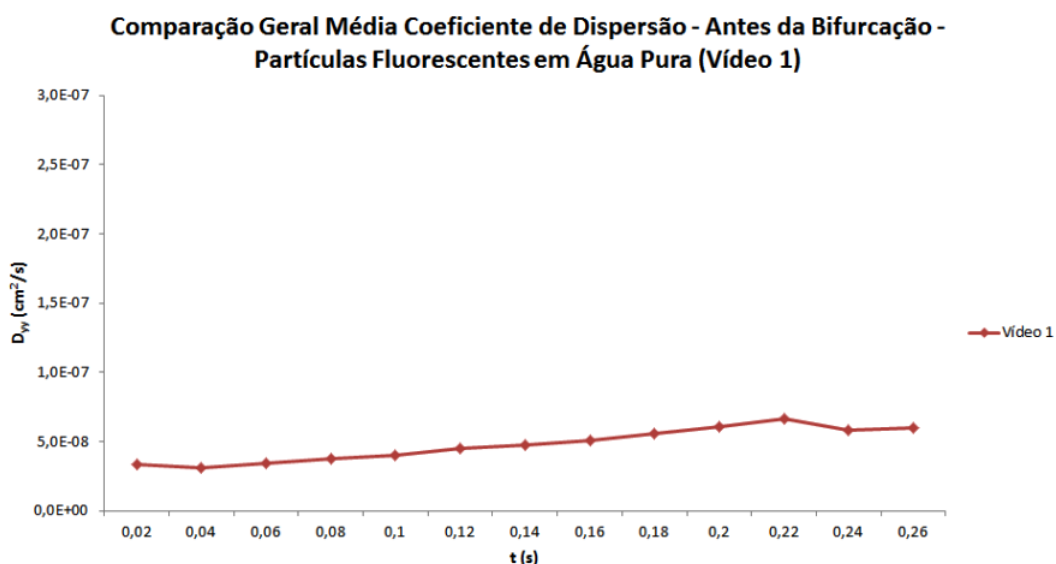


Figura 6.5: Resultados obtidos pelo método semi-automático no cálculo do  $D_{yy}$  para as partículas fluorescentes em água pura, antes da bifurcação divergente.

Através do método semi-automático desenvolvido foi possível efectuar o cálculo dos valores do  $D_{yy}$  para as partículas fluorescentes em água pura, antes da bifurcação divergente, como é possível verificar através da Figura 6.5. É possível verificar que ao longo do tempo os resultados obtidos sofrem uma tendência para um valor constante.

### Depois da bifurcação

No caso das partículas fluorescentes em água pura na geometria depois da bifurcação convergente foi analisado um vídeo: vídeo 2. O vídeo 2 foi analisado com 31 seguimentos. Na Figura 6.6 então representados os valores do  $D_{yy}$  das partículas fluorescentes estudadas, resultando no comportamento das mesmas em água pura num microcanal depois da presença da bifurcação convergente.

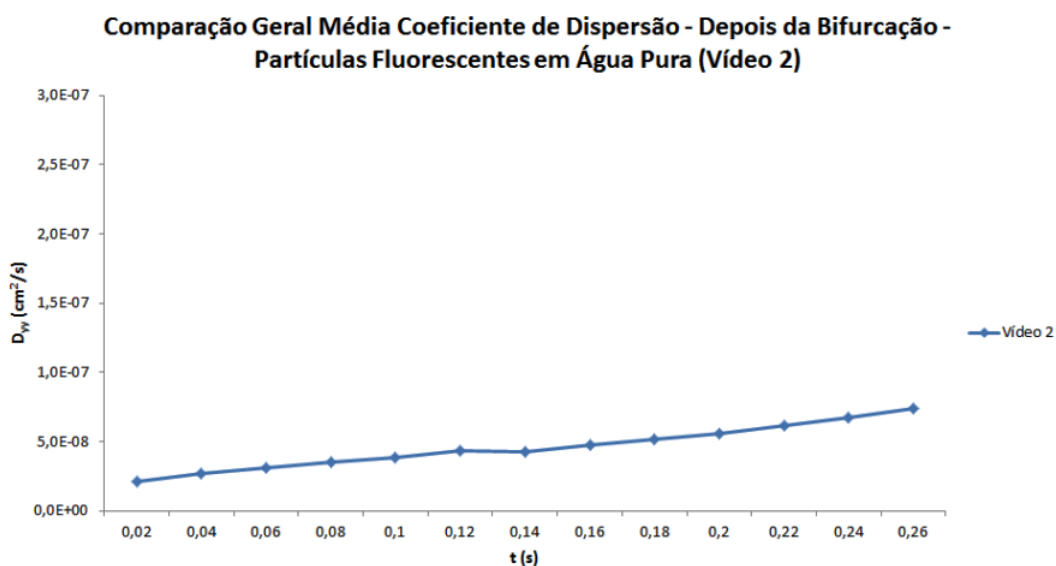


Figura 6.6: Resultados obtidos pelo método semi-automático no cálculo do  $D_{yy}$  para as partículas fluorescentes em água pura, depois da bifurcação convergente.

Através do método semi-automático desenvolvido foi possível efectuar o cálculo dos valores do  $D_{yy}$  para as partículas fluorescentes em água pura, depois da bifurcação convergente, como é possível verificar através da Figura 6.6. É possível verificar que ao longo do tempo os resultados obtidos sofrem uma tendência para um valor constante.

### Antes Vs Depois da bifurcação

De forma a ser possível identificar a influência de uma bifurcação, divergente e convergente, no caso das partículas fluorescentes em água pura, foram reunidos os valores do  $D_{yy}$  dos vídeos estudados nas duas geometrias estudadas, antes da bifurcação divergente e depois da bifurcação convergente, nomeadamente o vídeo 1 e o vídeo 2. Na Figura 6.7 é efectuada a comparação dos resultados obtidos.

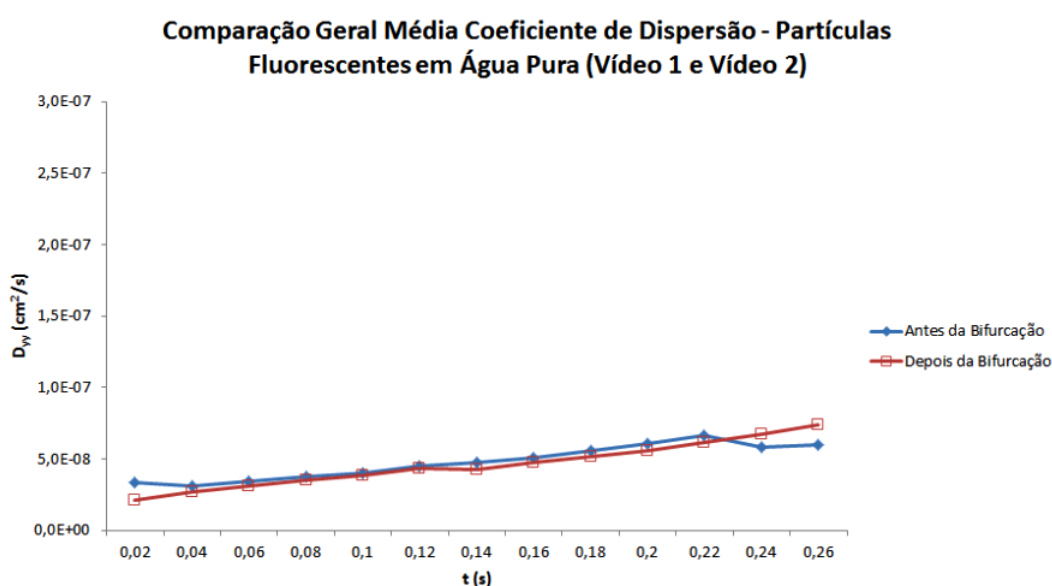


Figura 6.7: Comparação dos resultados obtidos pelo método semi-automático no cálculo do  $D_{yy}$  para as partículas fluorescentes em água pura, antes da bifurcação divergente e depois da bifurcação convergente.

Através do método semi-automático desenvolvido foi possível efectuar o cálculo dos valores do  $D_{yy}$  para as partículas fluorescentes em água pura, em ambas as geometrias em estudo, como é possível verificar através da Figura 6.7. É possível verificar que não há diferença nos valores do  $D_{yy}$ , os valores do  $D_{yy}$  são iguais em ambas as geometrias. Conclui-se então que não existe nenhum efeito significativo da bifurcação convergente e divergente, isto acontece porque a região seleccionada não é afectada pela presença das bifurcações. Em termos futuros aconselha-se efectuar uma análise detalhada de resultados obtidos na região mais próxima da bifurcação, ou

mesmo na zona da bifurcação.

### 6.2.2 Eritrócitos humanos em $D \times 40$

De igual modo, para o caso dos eritrócitos humanos em  $D \times 40$  foi efectuada a comparação dos valores do  $D_{yy}$  obtidos para ambas as geometrias estudadas, antes da bifurcação divergente e depois da bifurcação convergente. Primeiramente foi efectuada a comparação dos valores obtidos para cada geometria e só no final se efectuou a comparação entre as duas geometrias distintas estudadas.

#### Antes da bifurcação

No caso dos eritrócitos humanos em  $D \times 40$  na geometria antes da bifurcação divergente, como foi referido anteriormente, foram analisados no total 3 vídeos: vídeo 3, vídeo 4 e vídeo 5. O vídeo 3 foi analisado com 7 seguimentos, o vídeo 4 com 6 seguimentos e o vídeo 5 com 6 seguimentos. Na Figura 6.8 então representadas as médias dos valores do  $D_{yy}$  dos eritrócitos dos 3 vídeos anteriormente referidos e a média geral dos vídeos que corresponde ao comportamento médio dos eritrócitos humanos em  $D \times 40$  num microcanal antes da presença da bifurcação.

Através do método semi-automático desenvolvido foi possível efectuar o cálculo dos valores do  $D_{yy}$  para os eritrócitos humanos em solução  $D \times 40$ , antes da bifurcação divergente, como é possível verificar através da Figura 6.8. É possível verificar que ao longo do tempo os resultados obtidos sofrem uma tendência para um valor constante.

#### Depois da bifurcação

Para o caso dos eritrócitos humanos em  $D \times 40$  na geometria depois da bifurcação convergente foram analisados no total 4 vídeos; vídeo 6, vídeo 7, vídeo 8 e vídeo 9. O vídeo 6 foi analisado com 7 seguimentos, o vídeo 7 com 6 seguimentos, o vídeo 8 com 6 seguimentos e o vídeo 9 com 6 seguimentos. Na Figura 6.9 então representadas as médias dos valores do  $D_{yy}$  dos eritrócitos dos

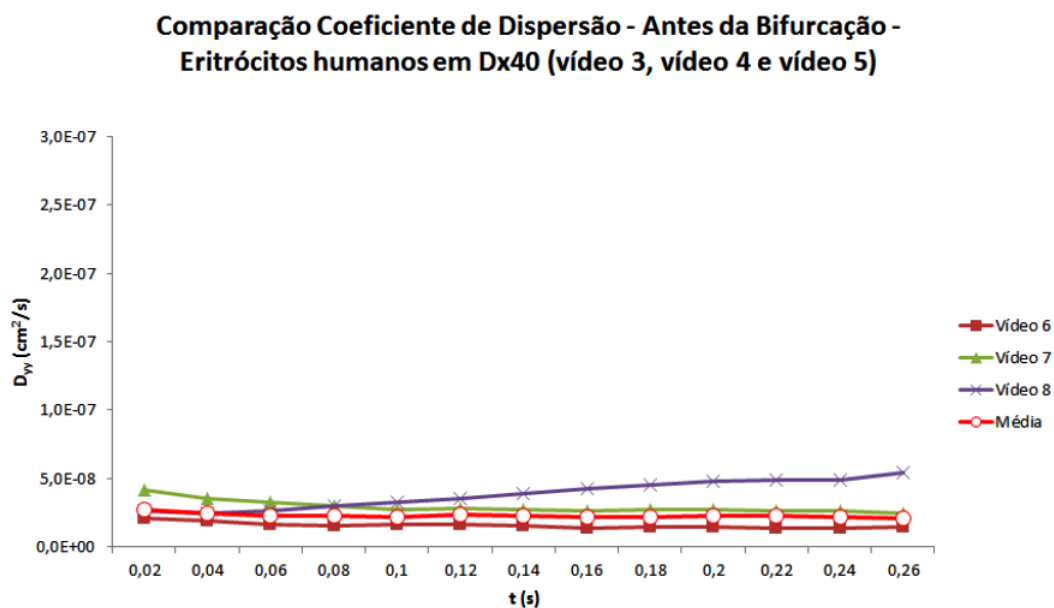


Figura 6.8: Resultados obtidos pelo método semi-automático no cálculo do  $D_{yy}$  para os eritrócitos humanos em solução  $D \times 40$ , antes da bifurcação divergente.

4 vídeos anteriormente referidos e a média geral dos vídeos que corresponde ao comportamento médio dos eritrócitos humanos em  $D \times 40$  num microcanal depois da presença da bifurcação convergente.

Através do método semi-automático desenvolvido foi possível efectuar o cálculo dos valores do  $D_{yy}$  para os eritrócitos humanos em solução  $D \times 40$ , depois da bifurcação convergente, como é possível verificar através da Figura 6.9. É possível verificar que ao longo do tempo os resultados obtidos sofrem uma tendência para um valor constante.

### Antes Vs Depois da bifurcação

Para o caso dos eritrócitos humanos em  $D \times 40$ , de forma a ser possível identificar a influência de uma bifurcação, foram reunidos os valores do coeficiente de dispersão dos vídeos estudados nas duas geometrias estudadas, antes da bifurcação divergente e depois da bifurcação convergente, nomeadamente o vídeo 3, vídeo 4, vídeo 5, vídeo 6, vídeo 7, vídeo8 e vídeo 9. Na Figura 6.10

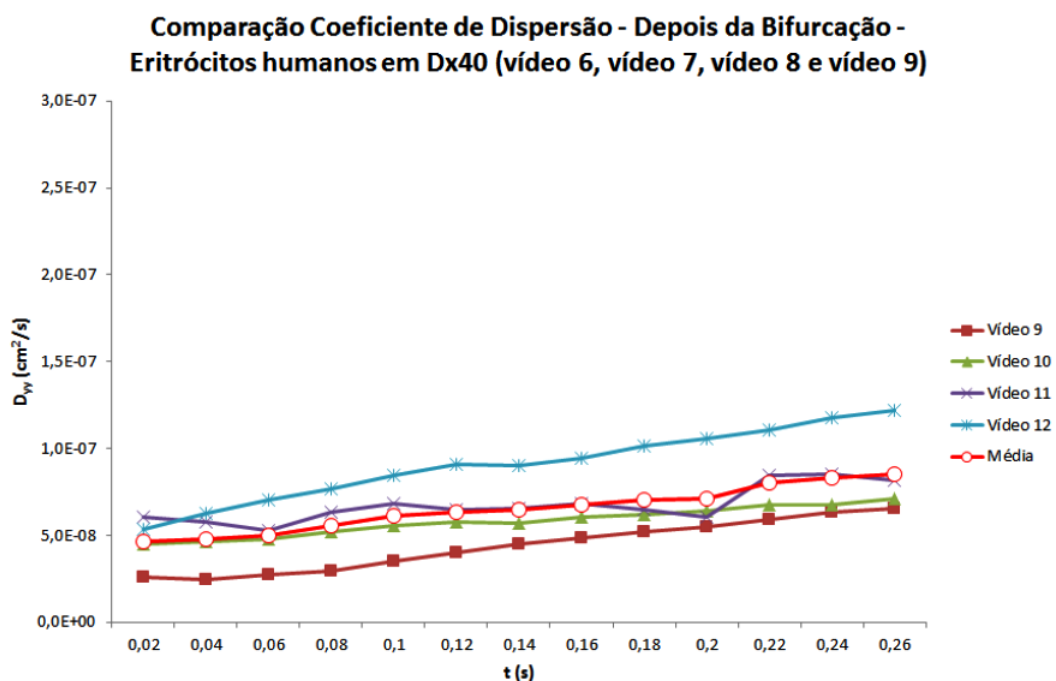


Figura 6.9: Resultados obtidos pelo método semi-automático no cálculo do  $D_{yy}$  para os eritrócitos humanos em solução  $D \times 40$ , depois da bifurcação convergente.

é efectuada a comparação dos resultados obtidos e concluir a influência de uma bifurcação para este caso.

Através do método semi-automático desenvolvido foi possível efectuar o cálculo do  $D_{yy}$  para os eritrócitos humanos em  $D \times 40$ , em ambas as geometrias em estudo, como é possível verificar através da Figura 6.10. Neste caso verifica-se que os resultados obtidos dos valores do  $D_{yy}$  são superiores após a presença de uma bifurcação convergente. Estes resultados sugerem que a confluência, isto é, presença de uma bifurcação convergente, devido à formação de uma camada de plasma no centro do microcanal, poderá influenciar o escoamento dos eritrócitos e assim aumentar os valores do  $D_{yy}$  dos mesmos.



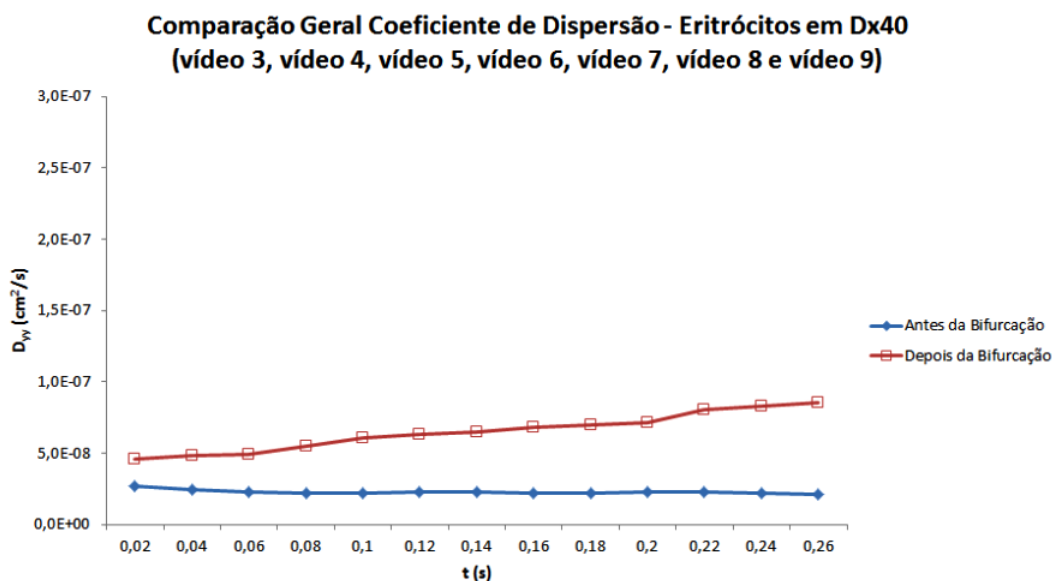


Figura 6.10: Comparação dos resultados obtidos pelo método semi-automático no cálculo do  $D_{yy}$  para os eritrócitos humanos em solução  $D \times 40$ , antes da bifurcação divergente e depois da bifurcação convergente.

### 6.2.3 Partículas fluorescentes em água pura Vs Eritrócitos humanos em $D \times 40$

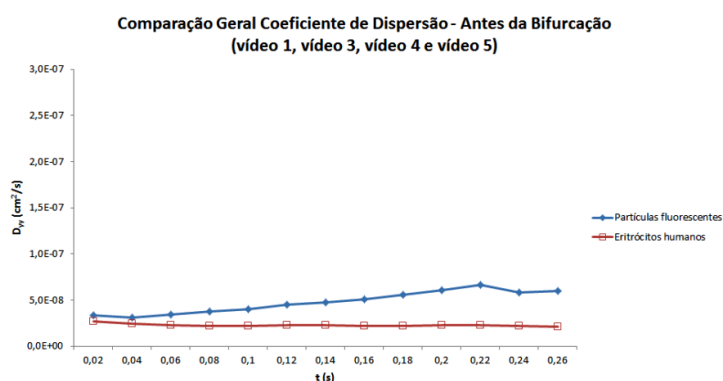
Por último, foi efectuada a comparação dos valores do  $D_{yy}$  obtidos para ambas as geometrias estudadas, antes da bifurcação divergente e depois da bifurcação convergente, para as partículas fluorescentes em água pura e para os eritrócitos humanos em  $D \times 40$ .

#### Antes e Depois da bifurcação

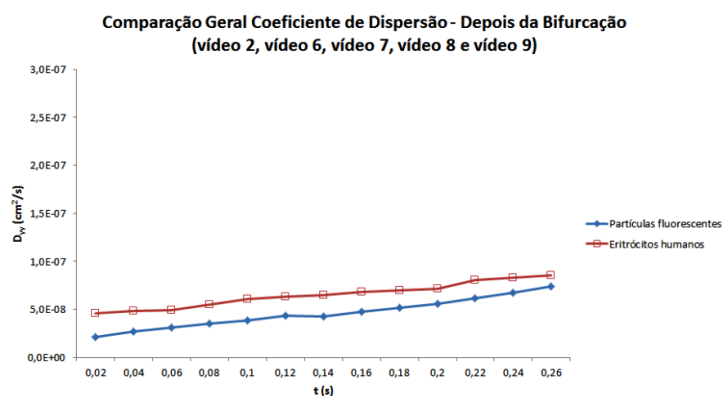
No caso da geometria antes da bifurcação divergente foram analisados no total 4 vídeos: vídeo 1, vídeo 3, vídeo 4 e vídeo 5. No vídeo 1 estão presentes partículas fluorescentes em água pura e nos vídeos 3, 4 e 5 estão presentes eritrócitos humanos em  $D \times 40$ . O vídeo 1 foi analisado com 20 seguimentos, o vídeo 3 com 7 seguimentos, o vídeo 4 com 6 seguimentos e o vídeo 5 com 6 seguimentos. Na Figura 6.11a então representadas as médias dos valores do  $D_{yy}$  para cada caso em estudo: partículas fluorescentes em água pura e eritrócitos humanos em  $D \times 40$ , na geometria

antes da bifurcação.

No caso da geometria depois da bifurcação convergente foram analisados no total 5 vídeos: vídeo 2, vídeo 6, vídeo 7, vídeo 8 e vídeo 9. No vídeo 2 estão presentes partículas fluorescentes em água pura e nos vídeos 6, 7, 8 e 9 estão presentes eritrócitos humanos em  $D \times 40$ . O vídeo 2 foi analisado com 31 seguimentos, vídeo 6 com 7 seguimentos, o vídeo 7 com 6 seguimentos, o vídeo 8 com 6 seguimentos e o vídeo 9 com 6 seguimentos. Na Figura 6.11b então representadas as médias do  $D_{yy}$  para cada caso em estudo: partículas fluorescentes em água pura e eritrócitos humanos em  $D \times 40$ , na geometria antes da bifurcação.



(a) Geometria antes da bifurcação divergente



(b) Geometria depois da bifurcação convergente

Figura 6.11: Comparação dos resultados obtidos pelo método semi-automático no cálculo do  $D_{yy}$ .

Recentemente, investigadores efectuaram pesquisas em que observaram que as partículas fluorescentes apresentam valores do  $D_{yy}$  inferiores aos valores apresentados pelos eritrócitos [Lima et al., 2008a, Saadatmand et al., 2011]. Nos resultados obtidos pela implementação do método semi-automático desenvolvido, representados na Figura 6.11, verifica-se que os valores do  $D_{yy}$  são muito idênticos para ambos os casos. Uma possível explicação são os erros cometidos por parte do utilizador do *software Image J* aquando a realização do seguimento das partículas fluorescentes. Os segmentos de imagens utilizados referentes às partículas fluorescentes têm a característica de conter uma elevada concentração de partículas fluorescentes visíveis que tornam complexo o processo de selecção e seguimento das mesmas. Por vezes, acontece ao utilizador, durante o seguimento de uma partícula, a sobreposição desta com outra, o que provoca uma confusão visual e com a qual pode ocorrer uma permuta entre as partículas em causa sem o utilizador se aperceber. Adicionalmente, ocorre também o desaparecimento de partículas durante duas ou três imagens, o que compromete o seu seguimento nesse espaço temporal, sendo possível retomar o seu seguimento após o seu aparecimento.

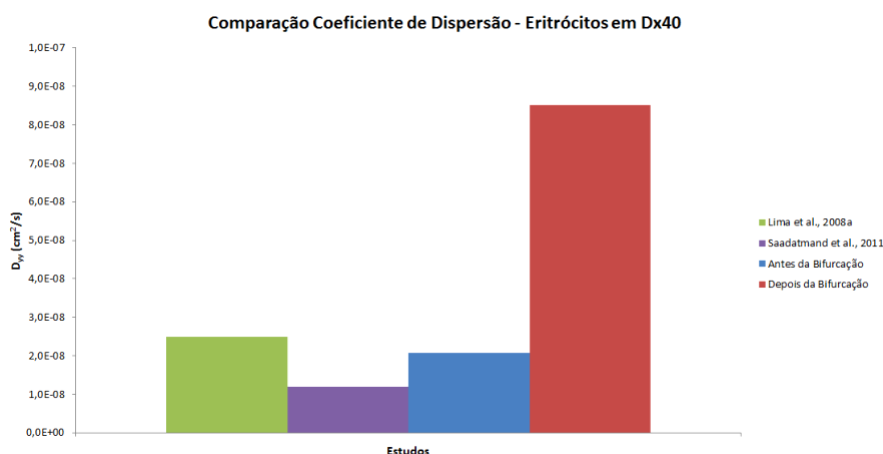


Figura 6.12: Comparação dos valores do  $D_{yy}$  para os eritrócitos humanos em  $D \times 40$  obtidos pela implementação do método semi-automático desenvolvido com valores apresentados por investigadores.

Na Figura 6.12 é possível efectuar a comparação dos valores do  $D_{yy}$  para os eritrócitos humanos em  $D \times 40$  obtidos pelo método semi-automático desenvolvido com os valores obtidos pelos investigadores Lima et al. e Saadatmand et al., [Lima et al., 2008a, Saadatmand et al., 2011]. Como é possível verificar, o valor referente ao momento depois da bifurcação, obtido pelo método semi-automático é superior comparativamente com os restantes. Tal facto pode dever-se à formação de uma camada de plasma no centro do microcanal a jusante da bifurcação convergente.

## Conclusões e Trabalho Futuro

*Neste capítulo são expostas de uma forma resumida todas as conclusões retiradas do trabalho efectuado. Posteriormente, de forma a dar continuidade a este trabalho, são efectuadas algumas sugestões possíveis de realizar tendo por base este trabalho.*

### 7.1 Conclusões

Este trabalho foi desenvolvido devido à existência da necessidade de estudar o comportamento dos eritrócitos quando escoam através dos microcanais. O cálculo do coeficiente de dispersão dos eritrócitos no microcanal permite estudar o comportamento destes quando fluem ao longo do mesmo. Diversos métodos manuais são utilizados para efectuar o cálculo desejado, nomeadamente através do programa *Microsoft Office Excel*, no entanto estes métodos são bastante morosos, cansativos e propícios à ocorrência de erros.

O objectivo deste trabalho foi desenvolver um método semi-automático para o cálculo do coeficiente de dispersão dos eritrócitos em microcanais, um método mais simples, mais fácil de utilizar, mais rápido de implementar e mais eficaz.

Para isso foi necessário analisar diversos segmentos de imagens, previamente fornecidos, e obter os valores dos deslocamentos radiais dos elementos neles presentes (partículas fluorescentes ou eritrócitos humanos). Para isso foi necessário recorrer ao *software Image J* e efectuar a

selecção e seguimento dos elementos, obtendo no final os valores dos deslocamentos radiais. Por fim, foi desenvolvido e implementado o método semi-automático, importando o ficheiro obtido pelo *software Image J* com os valores necessários, e calculado correctamente o coeficiente de dispersão.

O método semi-automático desenvolvido foi implementado e os valores obtidos foram comparados com o método manual utilizado. Os resultados obtidos para as partículas fluorescentes em água pura e para os eritrócitos humanos em  $D \times 40$  em ambas as geometrias em estudo, antes da bifurcação divergente e depois da bifurcação convergente, confirmam a igualdade dos valores do  $D_{yy}$  obtidos através de ambos os métodos. Atendendo à excelente sobreposição dos resultados em cada caso, foi possível validar o método semi-automático desenvolvido com recurso ao *software MatLab* tornando-o um método válido e viável para o cálculo do coeficiente de dispersão.

No caso das partículas fluorescentes em água pura verificou-se que não existe nenhuma diferença significativa nos valores do  $D_{yy}$  obtidos através do método semi-automático desenvolvido em ambas as geometrias estudadas, antes da bifurcação divergente e depois da bifurcação convergente. Contrariamente, no caso dos eritrócitos humanos em  $D \times 40$ , verificou-se que após a presença da bifurcação convergente existiu um aumento dos valores do  $D_{yy}$  que pode ter resultado devido à formação de uma camada de plasma no centro do microcanal após a confluência.

Não foi detectada nenhuma diferença significativa entre os valores do  $D_{yy}$  das partículas fluorescentes e dos eritrócitos humanos, obtidos através do método semi-automático, o que não corrobora os resultados anteriormente obtidos por outros investigadores. Uma possível explicação para este acontecimento foram os erros cometidos por parte do utilizador do *software Image J* aquando a realização do seguimento das partículas fluorescentes devido à elevada concentração de partículas visíveis nos segmentos de imagens e devido ao aparecimento e desaparecimento das partículas ao longo dos segmentos de imagens.

Os resultados obtidos através do método semi-automático dos valores do  $D_{yy}$  dos eritrócitos

humanos, comparando com os valores obtidos por outros investigadores, são superiores. Tal facto ocorre devido à diferença da geometria da bifurcação analisada no estudo.

## 7.2 Trabalho futuro

Este trabalho contribuiu positivamente para a análise e compreensão do comportamento dos componentes sanguíneos em fluxo nos microcanais. No entanto, é possível dar continuidade a este trabalho de forma a conseguir avaliar mais detalhadamente a influência de uma bifurcação no escoamento dos componentes sanguíneos. Então são efectuadas algumas sugestões:

- I Utilizar um número superior de segmentos de imagens na análise, assim como seleccionar e seguir um maior número de elementos nos segmentos de imagens. Desta forma, consegue-se aumentar o número de amostras analisadas o que torna o estudo mais significativo. Consequentemente, as conclusões efectuadas do estudo são consideradas mais viáveis e próximas da realidade.
- II Analisar os segmentos de imagens por áreas, isto é, efectuar uma divisão horizontal no microcanal visível nos segmentos de imagem em estudo em três áreas distintas: parede superior, centro e parede inferior. Desta forma é possível efectuar o estudo do comportamento dos componentes celulares mais detalhadamente, tendo em conta que o comportamento dos mesmos é distinto nas três áreas anteriormente referidas. Portanto seria possível determinar, por área, o tipo de comportamento que os componentes celulares adquirem ao longo do seu escoamento.
- III Realizar este estudo na região exactamente antes e depois da bifurcação. Desta forma seria possível analisar o comportamento dos componentes celulares no momento exactamente antes da bifurcação e compreender melhor de que modo a bifurcação afecta o escoamento dos componentes sanguíneos.





# Bibliografia

- [Baskurt and Meiselman, 2003] Baskurt, O. and Meiselman, H. (2003). Blood rheology and hemodynamics. *Hyperviscosity Syndromes*, 29(5):435–450.
- [Caiado, 2009] Caiado, D. (2009). Modelação matemática do sistema cardiovascular. Master's thesis, Universidade do Algarve.
- [Chandran et al., 2007] Chandran, K., Yoganathan, A., and Rittgers, S. (2007). *Biofluid Mechanics - The human circulation*. Taylor & Francis Group.
- [Ferreira and Rasband, 2012] Ferreira, T. and Rasband, W. (2012). *Image J User Guide*. Image J / Fiji 1.46, revision edition edition.
- [Fujiwara et al., 2009] Fujiwara, H., Ishikawa, T., Lima, R., Matsuki, N., Imai, Y., Kaji, H., Nishizawa, M., and Yamaguchi, T. (2009). Red blood cell motions in high-hematocrit blood flowing through a stenosed microchannel. *Journal of Biomechanics*, 42:838–834.
- [Fung, 1996] Fung, Y. (1996). *Biomechanics: Circulation*. Springer, 2 edition.
- [Garcia et al., 2012] Garcia, V., Dias, R., and Lima, R. (2012). *Applied biological engineering - principles and practice*, chapter In Vitro Blood Flow Behaviour in Microchannels with Simple and Complex Geometries. Ganesh R. Naik.
- [Karsheva et al., 2009] Karsheva, M., Dinkova, P., PEntchev, I., and Ivanova, T. (2009). Blood rheology - a key for blood circulation in human body. *Journal of the University of Chemical Tchnology and Metallurgy*, 44(1):50–54.

- [Leble et al., 2011a] Leble, V., Lima, R., Dias, R., Fernandes, C., Ishikawa, T., Imai, Y., and Yamaguchi, T. (2011a). Asymmetry of red blood cell motions in a microchannel with a diverging and converging bifurcation. *Biomicrofluidics*, (5).
- [Leble et al., 2011b] Leble, V., Lima, R., Fernandes, C., and Dias, R. (2011b). Flow of red blood cells through a microchannel with a confluence. *Proceedings of Congress on Numerical Methods in Engineering, Coimbra, Portugal*.
- [Lima et al., 2013] Lima, R., Garcia, V., and Tavares, J. (2013). *Introdução à Engenharia Mecânica*, chapter Microfluidica e química física da vida. Em revisão por António Barbedo de Magalhães.
- [Lima, 2007] Lima, R. (2007). Analysis of the blood flow behaviour through microchannels by a confocal micro-piv/ptv system. Master's thesis, Tohoku University.
- [Lima et al., 2006] Lima, R., Higey Wada, Ichi Tsubota, K., and Yamaguchi, T. (2006). Confocal micro-piv measurements of three dimensional profiles of cell suspension flow in a square microchannel. *Measurement Science and Technology*, 17:797–808.
- [Lima et al., 2008a] Lima, R., Ishikawa, T., Imai, Y., Takeda, M., Wada, S., and Yamaguchi, T. (2008a). Radial dispersion of red blood cells in blood flowing through glass capillaries: the role of hematocrit and geometry. *Journal of Biomechanics*, 41:2188–2197.
- [Lima et al., 2009a] Lima, R., Ishikawa, T., Imai, Y., Takeda, M., Wada, S., and Yamaguchi, T. (2009a). Measurement of individual red blood cell motions under high hematocrit conditions using a confocal micro-ptv system. *Annals of Biomedical Engineering*, 37:1546–1559.
- [Lima et al., 2012] Lima, R., Ishikawa, T., Imai, Y., and Yamaguchi, T. (2012). Blood flow behaviour in microchannels: past, current and future trends. *Single and two-Phase Flows on Chemical and Biomedical Engineering*, pages 513–547.
- [Lima et al., 2009b] Lima, R., Nakamura, M., Omori, T., Ishikawa, T., Wada, S., and Yamaguchi, T. (2009b). Microscale flow dynamics of red blood cells in microchannels: an experimental and numerical analysis. In Tavares, J. M. R. S. and Jorge, R. M. N., editors, *Advances in*

*Computational Vision and Medical Image Processing - Methods and Applications*, volume 13, pages 203–220. Springer Science + Business Media.

[Lima et al., 2009c] Lima, R., Oliveira, M., Ishikawa, T., Kaji, H., Tanaka, S., Nishizawa, M., and Yamaguchi, T. (2009c). Axisymmetric polydimethylsiloxane microchannels for *in vivo* hemodynamic studies. *Biofabrication*, 1(3):035005.

[Lima et al., 2008b] Lima, R., Wada, S., Tanaka, S., Takeda, M., Ishikawa, T., Tsubota, K., Imai, Y., and Yamaguchi, T. (2008b). In vitro blood flow in a rectangular pdms microchannel: experimental observations using a confocal micro-piv system. *Biomedical Microdevices*, 10(2):153–167.

[Nakano et al., 2005] Nakano, A., Sugii, Y., Minamiyama, M., Seki, J., and Niimi, H. (2005). Velocity profiles of pulsatile blood flow in arterioles with bifurcation and confluence in rat mesentery measured by particle image velocimetry. *JSME International Journal*, 48(4):444–452.

[Novais, 2012] Novais, S. (2012). Desenvolvimento de um microdispositivo biomédico para a separação e deformação de eritrócitos. Master's thesis, Instituto Politécnico de Bragança.

[Pereira, 1999] Pereira, C. (1999). *CIRURGIA - Patologia Clínica*. Lusociência.

[Pinho, 2011] Pinho, D. (2011). Determinação e caracterização das trajectórias dos glóbulos vermelhos: Um método semi-automático. Master's thesis, Instituto Politécnico de Bragança.

[Pinho et al., 2010] Pinho, D., Pereira, A., Lima, R., Ishikawa, T., Imai, Y., and Yamaguchi, T. (2010). Red blood cell dispersion in 100  $\mu\text{m}$  glass capillaries: the temperature effect. *IFMBE Proceedings*, 31:1067–1070.

[Pires, 2012] Pires, B. (2012). Conceção de um dispositivo de micro-cromatografia hemodinâmica para separação de células sanguíneas e visualização do mecanismo de separação. Master's thesis, Instituto Politécnico de Bragança.

[Popel and Johnson, 2005] Popel, A. and Johnson, P. (2005). Microcirculation and hemorheology. *Annu. Rev. Fluid Mech*, 37:43–69.

- [Pries et al., 1994] Pries, A., Secomb, T., Gessner, T., Sperandio, M., Gross, J., and Gaetgens, P. (1994). Resistance to blood flow in microvessels in vivo. *Circulation Research*, 75:904–915.
- [Saadatmand et al., 2011] Saadatmand, M., Ishikawa, T., Matsuki, N., Abdekhodaie, M., Imai, Y., Ueno, H., and Yamaguchi, T. (2011). Fluid particle diffusion through high-hematocrit blood flow within a capillary tube. *Annals of Biomedical Engineering*, 35(5):755–765.
- [Secomb and Pries, 2011] Secomb, T. and Pries, A. (2011). The microcirculation: physiology at the mesoscale. *The Journal of Physiology*, 589.5:1047–1052.
- [Secomb et al., 2007] Secomb, T., Styp-Rekowska, B., and Pries, A. (2007). Two-dimensional simulation of red blood cell deformation and lateral migration in microvessels. *Annals of Biomedical Engineering*, 35(5):755–765.
- [Seeley et al., 2007] Seeley, R., Stephens, T., and Tate, P. (2007). *Anatomia e Fisiologia*. Luso-ciência, 6 edition.
- [Shevkoplyas et al., 2006] Shevkoplyas, S., Yoshida, T., Gifford, S., and Bitensky, M. (2006). Direct measurement of the impact of impaired erythrocyte deformability on microvascular network perfusion in a microfluidic device. *Lab Chip*, 6:914–920.
- [Silva, 1974] Silva, J. (1974). O glóbulo vermelho - estrutura, metabolismo e funções. *Revista das ciências médicas*, 19:111–191.
- [Silva, 1982] Silva, J. (1982). Reologia do sangue - importância da deformabilidade eritrocitária. *O Médico*, (105):131–153.
- [Silva, 1984] Silva, J. (1984). Aspectos hemorreológicos da circulação humana. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, (3):285–307.
- [Sousa, 2005] Sousa, A. (2005). Localização automática de objectos em sequência de imagens. Master's thesis, Universidade do Minho.
- [Stuart and Kenny, 1980] Stuart, J. and Kenny, M. (1980). Blood rheology. *J Clin Pathol*, 33:417–429.

[Sugihara-Seki and Fu, 2005] Sugihara-Seki, M. and Fu, B. (2005). Blood flow and permeability in microvessels. *Fluid Dynamics Research*, 37:82–132.



# Anexo A - Imagens dos *Tracks* dos elementos efectuados nos vídeos

*Este Anexo contém as imagens obtidas através do software Image J após a realização do seguimento dos elementos em todos os vídeos utilizados neste trabalho.*

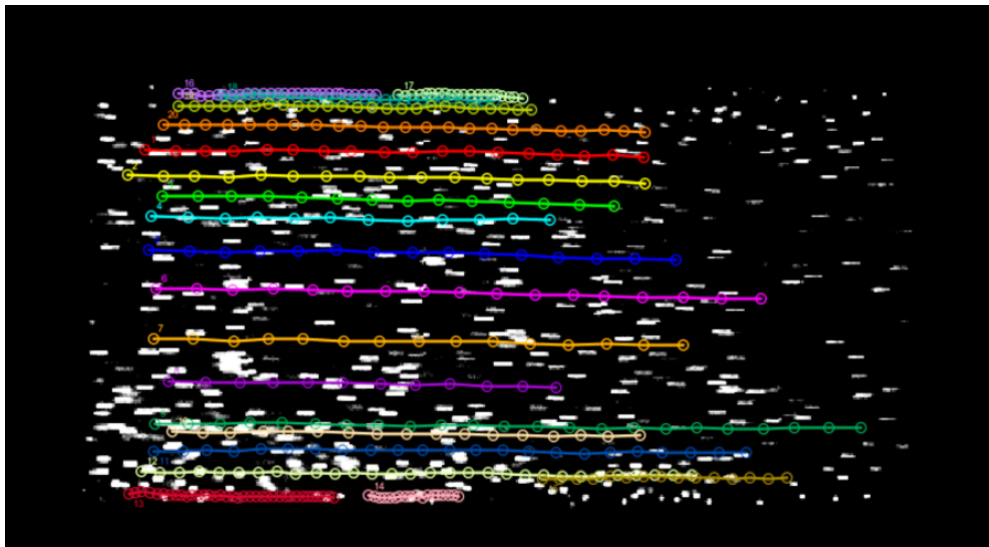


Figura 7.1: Imagem dos seguimentos efectuados ao Vídeo 1.

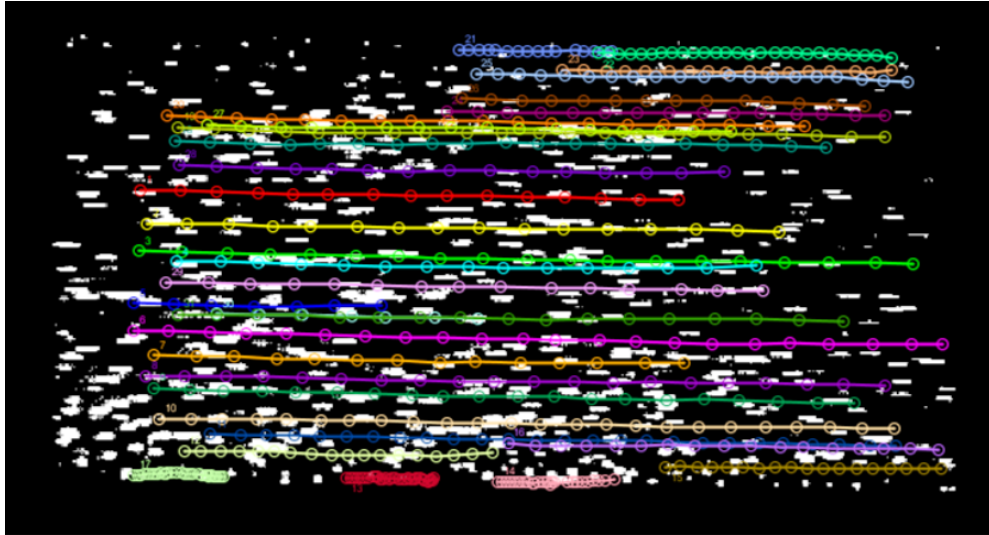


Figura 7.2: Imagem dos seguimentos efectuados ao Vídeo 2.

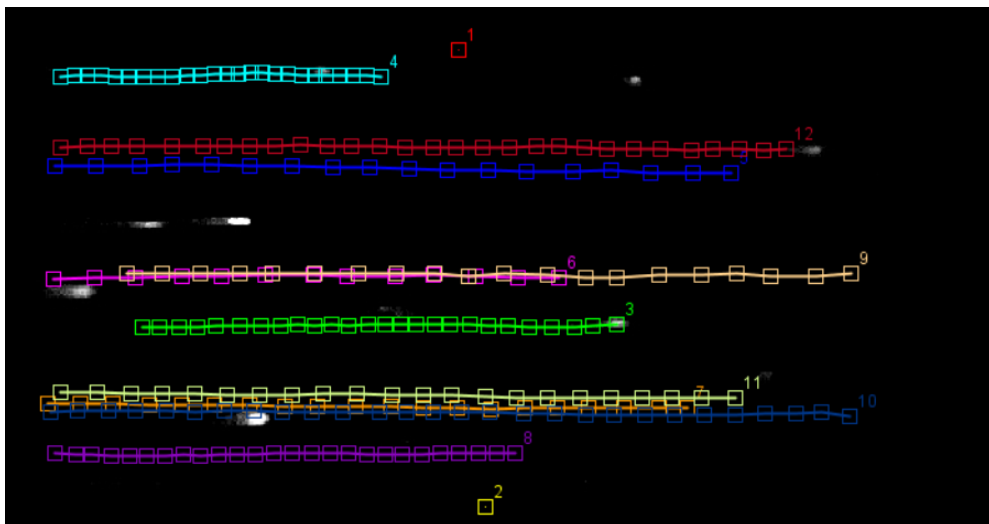


Figura 7.3: Imagem dos seguimentos efectuados ao Vídeo 3.



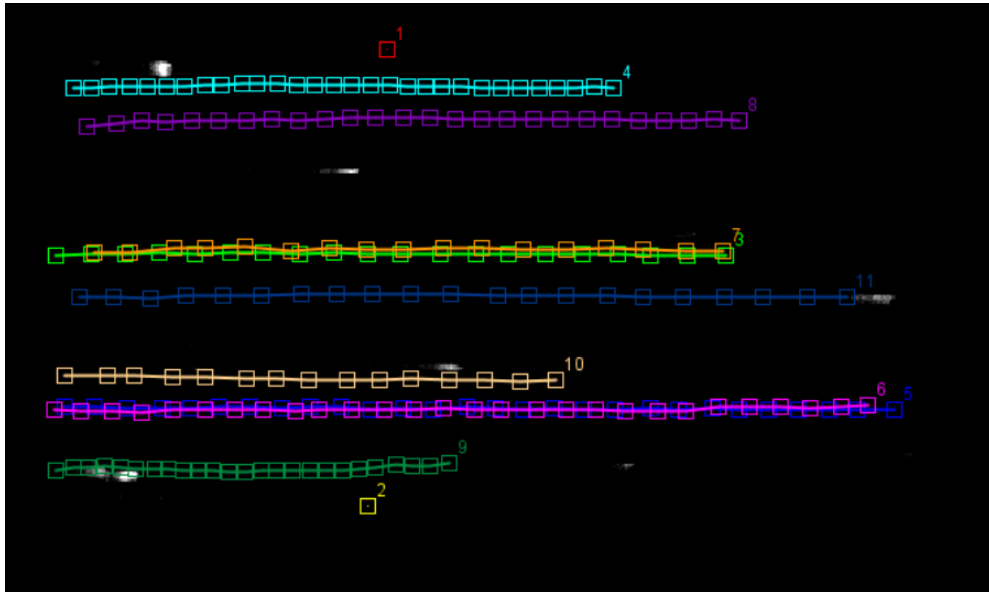


Figura 7.4: Imagem dos seguimentos efectuados ao Vídeo 4.

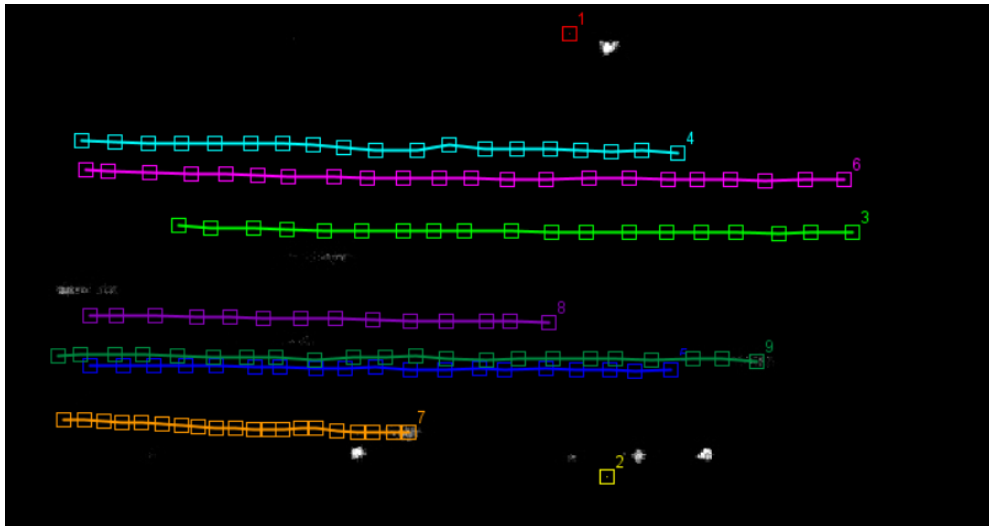


Figura 7.5: Imagem dos seguimentos efectuados ao Vídeo 5.

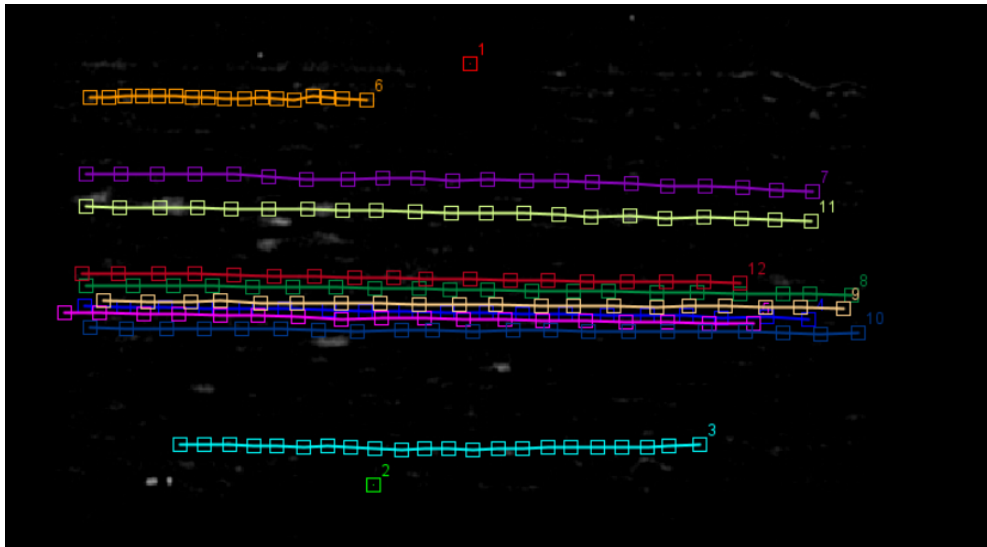


Figura 7.6: Imagem dos seguimentos efectuados ao Vídeo 6.

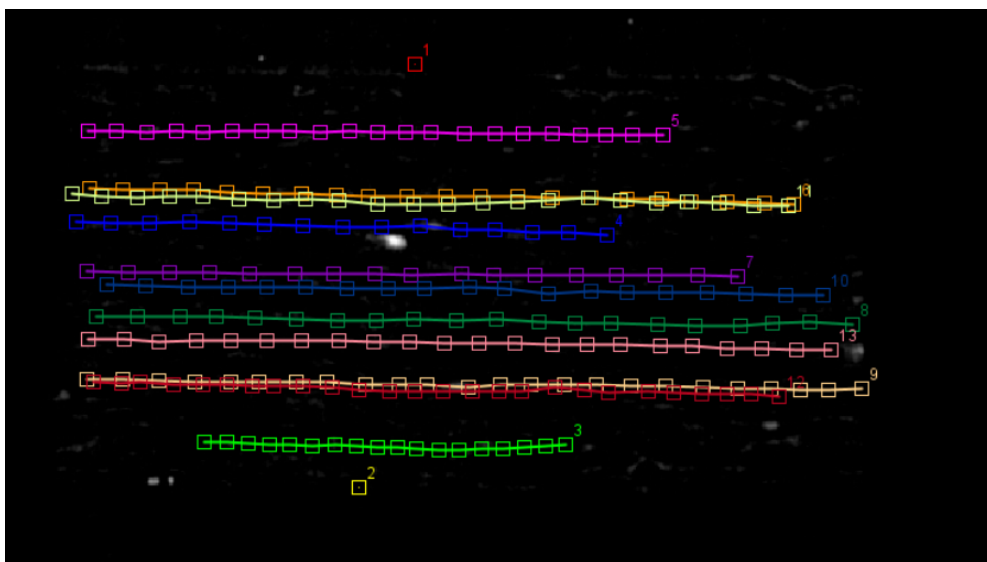


Figura 7.7: Imagem dos seguimentos efectuados ao Vídeo 7.

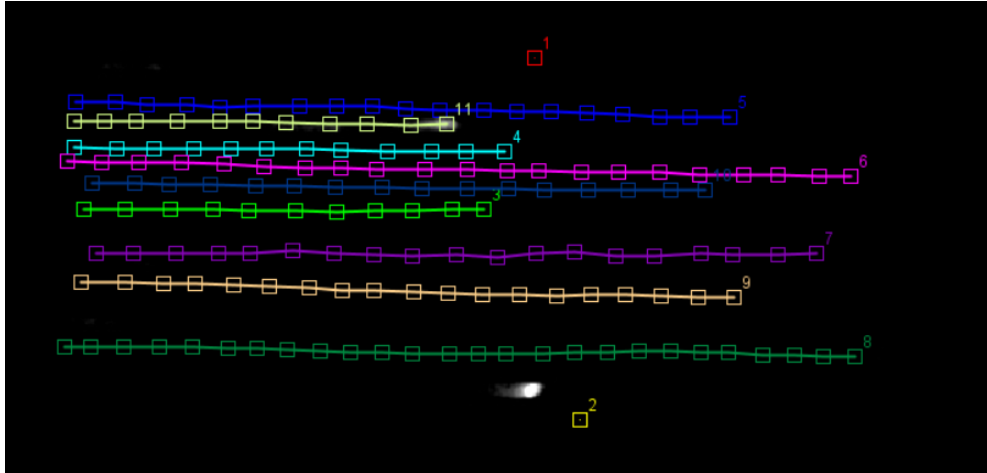


Figura 7.8: Imagem dos seguimentos efectuados ao Vídeo 8.

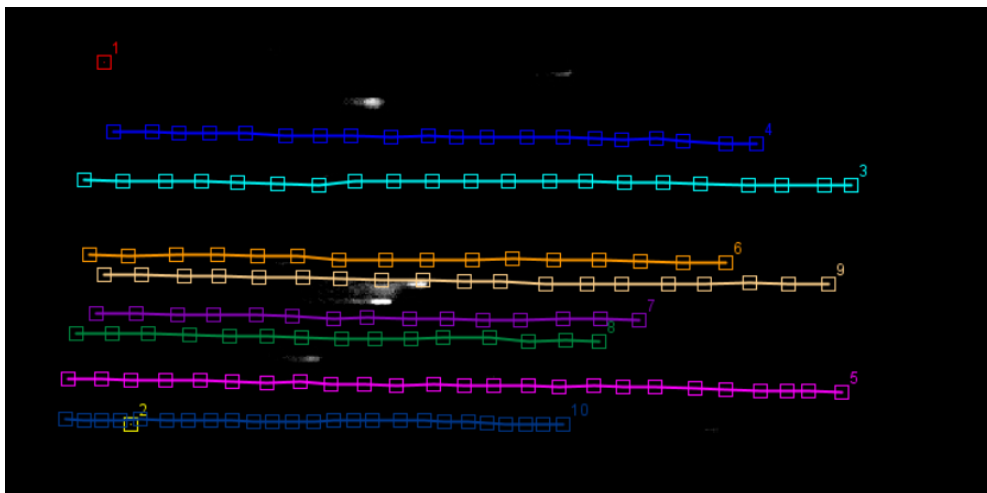


Figura 7.9: Imagem dos seguimentos efectuados ao Vídeo 9.



# Anexo B - Valores do Coeficiente de Dispersão ( $D_{yy}$ )

*Este Anexo contém os valores dos coeficientes de dispersão ( $D_{yy}$ ), obtidos no software MatLab, de cada seguimento efectuado nos segmentos de imagens de todos os vídeos utilizados neste trabalho prático.*

Tabela 7.1: Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 1 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração).

t	Track 3	Track 4	Track 5	Track 6	Track 7	Track 8	Track 9	Track 10	Track 11	Track 12
0.02	5.13E-8	4.21E-8	4.92E-8	9.28E-8	4.61E-8	2.94E-8	4.70E-8	5.21E-8	4.34E-8	2.40E-8
0.04	4.41E-8	3.79E-8	7.37E-8	5.35E-8	6.32E-8	4.07E-8	4.52E-8	3.58E-8	2.73E-8	2.35E-8
0.06	4.71E-8	4.16E-8	9.50E-8	5.77E-8	8.38E-8	5.27E-8	3.98E-8	4.26E-8	2.69E-8	2.75E-8
0.08	4.69E-8	4.66E-8	1.16E-7	4.91E-8	1.05E-7	7.24E-8	4.68E-8	4.27E-8	2.99E-8	2.60E-8
0.10	4.58E-8	5.32E-8	1.23E-7	4.00E-8	1.21E-7	9.12E-8	5.63E-8	5.52E-8	2.49E-8	2.53E-8
0.12	4.56E-8	5.84E-8	1.36E-7	6.05E-8	1.38E-7	1.12E-7	6.31E-8	7.32E-8	2.73E-8	2.98E-8
0.14	4.95E-8	5.91E-8	1.64E-7	4.56E-8	1.46E-7	1.32E-7	6.61E-8	7.77E-8	3.11E-8	3.42E-8
0.16	5.00E-8	6.54E-8	1.89E-7	4.48E-8	1.54E-7	1.47E-7	7.23E-8	7.57E-8	3.29E-8	3.93E-8
0.18	5.77E-8	7.11E-8	2.16E-7	2.58E-8	1.70E-7	1.63E-7	8.43E-8	9.23E-8	3.58E-8	4.21E-8
0.20	6.45E-8	7.39E-8	2.54E-7	3.19E-8	1.64E-7	1.80E-7	1.02E-7	1.03E-7	3.99E-8	4.71E-8
0.22	7.03E-8	8.24E-8	2.63E-7	5.89E-8	1.72E-7	1.90E-7	1.00E-7	1.32E-7	4.20E-8	4.97E-8
0.24	7.73E-8	8.72E-8	2.72E-7		1.74E-7	2.02E-7	8.94E-8		4.56E-8	4.97E-8
0.26	7.84E-8	8.19E-8	2.62E-7		1.89E-7	2.04E-7	1.17E-7		4.69E-8	4.37E-8

Tabela 7.2: Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 1 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração).

<i>t</i>	<i>Track 13</i>	<i>Track 14</i>	<i>Track 15</i>	<i>Track 16</i>	<i>Track 17</i>	<i>Track 18</i>	<i>Track 19</i>	<i>Track 20</i>	<i>Track 21</i>	<i>Track 22</i>	<i>MÉDIA</i>
0.02	2.06E-8	2.37E-8	1.50E-8	2.50E-8	1.77E-8	2.53E-8	1.63E-8	1.53E-8	1.89E-8	2.17E-8	3.38E-8
0.04	1.96E-8	1.72E-8	1.42E-8	1.42E-8	1.16E-8	2.12E-8	1.72E-8	1.70E-8	2.30E-8	2.10E-8	3.11E-8
0.06	1.94E-8	1.45E-8	1.22E-8	8.32E-9	1.41E-8	1.81E-8	2.32E-8	1.73E-8	2.04E-8	1.97E-8	3.41E-8
0.08	1.74E-8	1.47E-8	1.26E-8	1.10E-8	1.71E-8	1.37E-8	2.38E-8	1.70E-8	1.94E-8	2.64E-8	3.77E-8
0.10	1.43E-8	1.68E-8	1.21E-8	7.50E-9	1.36E-8	1.32E-8	2.07E-8	1.55E-8	2.04E-8	3.08E-8	4.00E-8
0.12	1.34E-8	1.58E-8	1.16E-8	6.43E-9	1.36E-8	1.43E-8	1.74E-8	1.45E-8	1.91E-8	3.54E-8	4.53E-8
0.14	1.38E-8	1.44E-8	1.06E-8	6.17E-9	1.14E-8	1.25E-8	1.49E-8	1.46E-8	1.39E-8	3.97E-8	4.79E-8
0.16	1.60E-8	1.41E-8	9.42E-9	6.16E-9	6.63E-9	1.20E-8	1.28E-8	1.48E-8	1.07E-8	4.41E-8	5.09E-8
0.18	1.82E-8	1.30E-8	8.58E-9	6.32E-9	5.66E-9	1.08E-8	1.42E-8	1.51E-8	1.09E-8	4.95E-8	5.55E-8
0.20	1.90E-8	1.26E-8	7.97E-9	7.00E-9	2.19E-9	1.07E-8	1.56E-8	1.68E-8	1.06E-8	5.27E-8	6.08E-8
0.22	1.82E-8	1.22E-8	8.09E-9	7.16E-9	1.74E-9	1.02E-8	1.85E-8	1.78E-8	1.02E-8	5.73E-8	6.61E-8
0.24	1.72E-8	1.19E-8	8.43E-9	6.36E-9	1.57E-9	9.79E-9	2.11E-8	1.93E-8	1.23E-8	6.33E-8	6.49E-8
0.26	1.64E-8	1.16E-8	8.97E-9	5.31E-9	1.94E-9	9.33E-9	2.17E-8	2.10E-8	1.51E-8	6.77E-8	6.67E-8

Tabela 7.3: Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 2 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração).

<i>t</i>	<i>Track 3</i>	<i>Track 4</i>	<i>Track 5</i>	<i>Track 6</i>	<i>Track 7</i>	<i>Track 8</i>	<i>Track 9</i>	<i>Track 10</i>	<i>Track 11</i>	<i>Track 12</i>
0.02	2.12E-8	1.65E-8	2.43E-8	2.51E-8	2.11E-8	2.30E-8	3.61E-8	1.60E-8	3.25E-8	1.14E-8
0.04	3.87E-8	2.07E-8	3.90E-8	3.04E-8	3.60E-8	3.85E-8	3.78E-8	2.27E-8	4.32E-8	1.76E-8
0.06	5.08E-8	2.61E-8	5.17E-8	4.15E-8	3.61E-8	5.32E-8	5.33E-8	2.93E-8	5.62E-8	2.36E-8
0.08	5.95E-8	3.10E-8	6.63E-8	4.67E-8	2.77E-8	6.93E-8	6.49E-8	3.77E-8	6.92E-8	3.11E-8
0.10	6.71E-8	3.59E-8	8.32E-8	5.23E-8	1.81E-8	8.61E-8	7.89E-8	4.56E-8	8.08E-8	3.91E-8
0.12	6.97E-8	4.35E-8	1.00E-7	5.61E-8	1.40E-8	1.03E-7	9.27E-8	5.09E-8	9.91E-8	4.67E-8
0.14	7.46E-8	5.19E-8	1.18E-7	5.94E-8		1.19E-7	1.10E-7	5.34E-8	1.14E-7	5.45E-8
0.16	8.39E-8	6.13E-8	1.32E-7	6.18E-8		1.36E-7	1.11E-7	5.76E-8	1.31E-7	6.40E-8
0.18	9.95E-8	6.58E-8	1.46E-7	6.26E-8		1.55E-7	1.19E-7	6.03E-8	1.40E-7	7.25E-8
0.20	1.21E-7	7.21E-8	1.61E-7	6.54E-8		1.72E-7	1.24E-7	6.50E-8	1.50E-7	7.93E-8
0.22	1.41E-7	7.61E-8	1.77E-7	6.86E-8		1.88E-7	1.25E-7	6.95E-8	1.69E-7	8.76E-8
0.24	1.69E-7	8.67E-8	1.88E-7	6.23E-8		2.05E-7	1.31E-7	7.79E-8	1.92E-7	9.62E-8
0.26	1.99E-7	9.97E-8	1.97E-7	5.44E-8		2.22E-7	1.33E-7	8.55E-8	2.07E-7	1.03E-7

Tabela 7.4: Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 2 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração).

t	Track 13	Track 14	Track 15	Track 16	Track 17	Track 18	Track 19	Track 20	Track 21	Track 22	Track 23
0.02	1.32E-8	1.49E-8	2.84E-8	3.12E-8	1.13E-8	2.12E-8	5.26E-9	1.68E-8	1.87E-8	2.23E-8	2.38E-8
0.04	1.89E-8	2.33E-8	2.36E-8	1.70E-8	4.85E-9	1.71E-8	6.09E-9	2.22E-8	2.72E-8	3.64E-8	1.52E-8
0.06	2.24E-8	2.70E-8	1.80E-8	1.24E-8	4.02E-9	1.88E-8	6.89E-9	2.12E-8	3.13E-8	4.68E-8	7.45E-9
0.08	2.72E-8	2.74E-8	1.37E-8	1.09E-8	3.67E-9	1.86E-8	7.67E-9	1.85E-8	3.29E-8	5.23E-8	7.81E-9
0.10	3.10E-8	3.04E-8	9.04E-9	1.06E-8	4.34E-9	1.96E-8	8.30E-9	1.73E-8	2.94E-8	5.70E-8	7.40E-9
0.12	3.58E-8	3.54E-8	8.14E-9	8.56E-9	4.10E-9	2.18E-8	9.09E-9	1.73E-8	2.87E-8	6.00E-8	7.01E-9
0.14	4.21E-8	4.01E-8	6.87E-9	7.60E-9	3.73E-9	2.46E-8	9.56E-9	1.42E-8	2.84E-8	6.64E-8	4.21E-9
0.16	4.76E-8	4.25E-8	6.96E-9	8.24E-9	5.63E-9	2.52E-8	1.07E-8	1.40E-8	3.08E-8	7.46E-8	5.04E-9
0.18	5.14E-8	4.06E-8	7.16E-9	1.07E-8	6.16E-9	2.63E-8	1.15E-8	1.28E-8	3.23E-8	8.59E-8	5.87E-9
0.20	5.50E-8	3.69E-8	5.77E-9	5.31E-9	5.47E-9	2.90E-8	1.26E-8	1.19E-8	3.29E-8	9.70E-8	4.02E-9
0.22	5.99E-8	3.54E-8	6.98E-9	5.58E-9	5.51E-9	2.99E-8	1.31E-8	1.22E-8	3.55E-8	1.05E-7	3.73E-9
0.24	6.53E-8	3.41E-8	7.33E-9	5.81E-9	5.90E-9	2.97E-8	1.33E-8	1.14E-8	3.96E-8	1.15E-7	5.08E-9
0.26	7.00E-8	3.29E-8	7.39E-9	6.34E-9	5.54E-9	3.22E-8	1.31E-8	1.41E-8	4.34E-8	1.23E-7	3.93E-9



Tabela 7.5: Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 2 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração).

t	Track 24	Track 25	Track 26	Track 27	Track 28	Track 29	Track 30	Track 31	Track 32	Track 33	MÉDIA
0.02	1.17E-8	3.16E-8	1.63E-8	2.60E-8	2.91E-8	1.74E-8	3.02E-8	1.63E-8	2.27E-8	2.94E-8	2.15E-8
0.04	1.25E-8	2.08E-8	2.07E-8	3.47E-8	4.24E-8	2.14E-8	3.88E-8	2.85E-8	3.22E-8	3.33E-8	2.65E-8
0.06	1.34E-8	1.20E-8	2.06E-8	3.88E-8	4.93E-8	2.88E-8	4.45E-8	3.58E-8	5.26E-8	2.88E-8	3.11E-8
0.08	1.33E-8	8.80E-9	2.10E-8	3.54E-8	5.40E-8	3.47E-8	4.68E-8	4.51E-8	7.03E-8	2.92E-8	3.49E-8
0.10	1.24E-8	9.52E-9	2.08E-8	3.25E-8	4.32E-8	4.14E-8	4.97E-8	5.78E-8	7.56E-8	3.37E-8	3.84E-8
0.12	1.22E-8	7.63E-9	1.92E-8	3.15E-8	4.00E-8	4.51E-8	5.52E-8	6.70E-8	1.05E-7	3.64E-8	4.30E-8
0.14	1.11E-8	5.04E-9	1.75E-8	3.01E-8	3.95E-8	5.04E-8	5.28E-8	7.52E-8		3.94E-8	4.56E-8
0.16	1.11E-8	7.65E-9	1.71E-8	2.84E-8	3.77E-8	5.33E-8	6.20E-8	8.58E-8		4.94E-8	5.04E-8
0.18	1.06E-8	6.76E-9	1.85E-8	2.11E-8	4.52E-8	5.69E-8	7.24E-8	1.00E-7		5.58E-8	5.51E-8
0.20	1.02E-8	7.90E-9	2.19E-8	2.03E-8	6.16E-8	5.87E-8	8.69E-8	1.14E-7		5.29E-8	6.00E-8
0.22	9.36E-9	5.24E-9	2.77E-8	1.98E-8	8.18E-8	6.57E-8	1.02E-7	1.20E-7		5.36E-8	6.55E-8
0.24	9.31E-9	1.93E-9	3.97E-8	2.28E-8	1.13E-7	6.74E-8	1.08E-8	1.35E-7		5.99E-8	7.23E-8
0.26	1.01E-8	3.32E-9	5.96E-8	2.61E-8	1.29E-7	7.38E-8	1.12E-7	1.58E-7		7.11E-8	7.92E-8

Tabela 7.6: Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 3 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração).

<i>t</i>	<i>Track 3</i>	<i>Track 4</i>	<i>Track 6</i>	<i>Track 7</i>	<i>Track 8</i>	<i>Track 9</i>	<i>Track 10</i>	<i>Track 11</i>	<i>Track 12</i>	<i>MÉDIA</i>
0.02	1.05E-8	9.64E-9	2.81E-8	7.98E-9	1.22E-8	7.72E-8	2.13E-8	7.00E-9	1.09E-8	2.05E-8
0.04	1.18E-8	1.49E-8	3.57E-8	1.09E-8	1.28E-8	4.65E-8	1.47E-8	9.78E-8	1.05E-8	1.86E-8
0.06	1.19E-8	1.76E-8	2.98E-8	1.33E-8	1.33E-8	2.85E-8	1.32E-8	1.23E-8	1.10E-8	1.67E-8
0.08	1.01E-8	1.93E-8	2.50E-8	1.44E-8	1.38E-8	2.20E-8	1.06E-8	1.43E-8	1.22E-8	1.57E-8
0.10	8.70E-9	2.13E-8	2.88E-8	1.54E-8	1.28E-8	1.97E-8	1.03E-8	1.63E-8	1.20E-8	1.61E-8
0.12	7.79E-9	2.22E-8	2.38E-8	1.72E-8	1.06E-8	2.20E-8	1.11E-8	1.81E-8	1.17E-8	1.61E-8
0.14	7.14E-9	2.16E-8	1.54E-8	1.90E-8	8.79E-9	2.20E-8	1.17E-8	1.98E-8	1.16E-8	1.52E-8
0.16	6.37E-9	2.04E-8	1.08E-8	2.09E-8	9.08E-9	1.26E-8	1.20E-8	2.16E-8	1.17E-8	1.40E-8
0.18	5.84E-9	1.84E-8	1.37E-8	2.33E-8	7.23E-9	1.40E-8	1.23E-8	2.37E-8	1.13E-8	1.44E-8
0.20	5.67E-9	1.56E-8	9.60E-9	2.50E-8	6.42E-9	1.56E-8	1.28E-8	2.61E-8	1.05E-8	1.41E-8
0.22	5.44E-9	1.24E-8	3.72E-8	2.75E-8	5.73E-9	1.33E-8	1.34E-8	2.86E-8	1.04E-8	1.34E-8
0.24	5.44E-9	1.00E-8	3.15E-9	2.83E-8	5.14E-9	1.41E-8	1.46E-8	3.04E-8	1.12E-8	1.36E-8
0.26	5.39E-9	8.23E-9		2.90E-8	4.91E-9	9.24E-9	1.55E-8	3.16E-8	1.17E-8	1.44E-8

Tabela 7.7: Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 4 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração).

$t$	<i>Track 3</i>	<i>Track 4</i>	<i>Track 5</i>	<i>Track 6</i>	<i>Track 8</i>	<i>Track 10</i>	<i>Track 11</i>	<i>MÉDIA</i>
0.02	1.69E-8	8.50E-9	3.33E-8	4.01E-8	4.89E-8	1.69E-8	2.39E-8	2.69E-8
0.04	1.04E-8	1.04E-8	1.98E-8	3.44E-8	4.60E-8	2.31E-8	2.66E-8	2.44E-8
0.06	1.12E-8	1.20E-8	1.67E-8	3.27E-8	2.81E-8	3.07E-8	2.67E-8	2.26E-8
0.08	8.02E-9	1.39E-8	1.33E-8	2.53E-8	2.89E-8	3.54E-8	3.13E-8	2.23E-8
0.10	8.27E-9	1.59E-8	9.04E-9	2.38E-8	2.79E-8	3.80E-8	3.24E-8	2.22E-8
0.12	9.06E-9	1.78E-8	7.93E-9	2.52E-8	2.90E-8	3.84E-8	3.47E-8	2.31E-8
0.14	7.43E-9	2.80E-8	6.78E-9	2.21E-8	3.22E-8	3.97E-8	3.30E-8	2.30E-8
0.16	7.85E-9	2.16E-8	5.84E-9	1.90E-8	2.85E-8	3.97E-8	2.99E-8	2.18E-8
0.18	7.52E-9	2.24E-8	7.81E-9	1.30E-8	3.23E-8	4.28E-8	2.74E-8	2.19E-8
0.20	7.77E-9	2.16E-8	9.09E-9	1.24E-8	3.54E-8	4.85E-8	2.46E-8	2.28E-8
0.22	8.32E-9	2.06E-8	8.78E-9	1.14E-8	3.21E-8	5.31E-8	2.23E-8	2.24E-8
0.24	8.20E-9	1.98E-8	8.72E-9	1.13E-8	2.96E-8	5.77E-8	1.84E-8	2.20E-8
0.26	8.02E-9	1.92E-8	7.88E-9	1.10E-8	2.66E-8	5.91E-8	1.31E-8	2.07E-8

Tabela 7.8: Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 5 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração).

<i>t</i>	<i>Track 3</i>	<i>Track 5</i>	<i>Track 6</i>	<i>Track 8</i>	<i>Track 9</i>	<i>MÉDIA</i>
0.02	2.25E-8	1.21E-8	2.51E-8	2.30E-8	4.83E-8	2.62E-8
0.04	2.53E-8	1.24E-8	2.76E-8	1.85E-8	4.01E-8	2.48E-8
0.06	2.72E-8	2.25E-8	3.45E-8	2.84E-8	3.01E-8	2.65E-8
0.08	2.79E-8	1.55E-8	4.08E-8	3.83E-8	2.57E-8	2.96E-8
0.10	2.44E-8	1.77E-8	4.83E-8	4.86E-8	2.45E-8	3.27E-8
0.12	1.99E-8	2.03E-8	5.29E-8	5.97E-8	2.41E-8	3.54E-8
0.14	2.40E-8	2.40E-8	5.42E-8	6.66E-8	2.49E-8	3.87E-8
0.16	2.81E-8	2.72E-8	5.72E-8	7.69E-8	2.21E-8	4.23E-8
0.18	3.13E-8	2.99E-8	5.83E-8	8.36E-8	2.20E-8	4.50E-8
0.20	3.62E-8	3.30E-8	6.04E-8	8.46E-8	2.55E-8	4.80E-8
0.22	3.41E-8	3.39E-8	6.10E-8	8.73E-8	2.88E-8	4.90E-8
0.24	3.39E-8	3.62E-8	6.57E-8	7.81E-8	2.86E-8	4.85E-8
0.26	3.71E-8	3.96E-8	6.75E-8	1.01E-7	2.65E-8	5.44E-8

Tabela 7.9: Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 6 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração).

<i>t</i>	<i>Track 3</i>	<i>Track 6</i>	<i>Track 8</i>	<i>Track 9</i>	<i>Track 10</i>	<i>Track 12</i>	<i>MÉDIA</i>
0.02	1.83E-8	6.12E-8	1.14E-8	3.10E-8	1.73E-8	1.47E-8	2.57E-8
0.04	2.36E-8	3.72E-8	1.98E-8	2.49E-8	1.73E-8	2.48E-8	2.46E-8
0.06	2.66E-8	2.99E-8	2.97E-8	2.41E-8	1.79E-8	3.69E-8	2.75E-8
0.08	2.82E-8	1.63E-8	3.95E-8	2.37E-8	1.88E-8	5.00E-8	2.94E-8
0.10	2.99E-8	2.14E-8	4.85E-8	2.47E-8	2.06E-8	6.43E-8	3.49E-8
0.12	3.46E-8	1.88E-8	5.78E-8	3.05E-8	2.18E-8	7.79E-8	4.02E-8
0.14	3.94E-8	1.47E-8	6.59E-8	3.54E-8	2.20E-8	9.20E-8	4.49E-8
0.16	4.03E-8	1.27E-8	7.48E-8	4.02E-8	1.99E-8	1.04E-7	4.86E-8
0.18	3.73E-8	1.25E-8	8.38E-8	4.25E-8	1.92E-8	1.17E-7	5.21E-8
0.20	3.28E-8	1.28E-8	9.28E-8	4.65E-8	1.86E-8	1.27E-7	5.51E-8
0.22	3.04E-8	1.29E-8	1.02E-7	5.20E-8	1.93E-8	1.39E-7	5.93E-8
0.24	2.78E-8	1.49E-8	1.12E-7	5.77E-8	2.11E-8	1.47E-7	6.35E-8
0.26	2.15E-8	1.07E-8	1.22E-7	5.91E-8	2.54E-8	1.54E-7	6.55E-8

Tabela 7.10: Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 7 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração).

<i>t</i>	<i>Track 3</i>	<i>Track 5</i>	<i>Track 7</i>	<i>Track 8</i>	<i>Track 9</i>	<i>Track 10</i>	<i>Track 11</i>	<i>Track 12</i>	<i>Track 13</i>	<i>MÉDIA</i>
0.02	3.96E-8	1.08E-8	6.74E-9	7.09E-8	3.88E-8	8.13E-8	8.98E-8	5.18E-8	1.75E-8	4.52E-8
0.04	4.32E-8	9.27E-9	8.35E-9	7.30E-8	3.33E-8	6.71E-8	1.06E-7	5.61E-8	2.37E-8	4.66E-8
0.06	5.36E-8	9.66E-9	8.43E-9	7.53E-8	3.82E-8	5.65E-8	9.55E-8	5.89E-8	3.04E-8	4.74E-8
0.08	5.55E-8	1.15E-8	9.29E-9	7.61E-8	4.69E-8	5.95E-8	1.05E-7	6.66E-8	3.73E-8	5.20E-8
0.10	5.99E-8	1.26E-8	1.01E-8	7.30E-8	4.72E-8	6.01E-8	1.19E-7	7.74E-8	4.20E-8	5.57E-8
0.12	5.39E-8	1.45E-8	1.16E-8	7.66E-8	5.09E-8	6.75E-8	1.13E-7	8.28E-8	4.58E-8	5.74E-8
0.14	5.36E-8	1.68E-8	1.40E-8	7.13E-8	5.27E-8	7.91E-8	9.75E-8	8.79E-8	5.17E-8	5.72E-8
0.16	5.60E-8	1.98E-8	1.48E-8	7.16E-8	5.59E-8	9.37E-8	8.15E-8	9.11E-8	5.71E-8	6.02E-8
0.18	5.98E-8	1.90E-8	1.65E-8	8.22E-8	5.58E-8	9.19E-8	9.11E-8	8.75E-8	6.23E-8	6.17E-8
0.20	6.40E-8	2.00E-8	1.93E-8	8.84E-8	5.59E-8	9.54E-8	6.84E-8	9.34E-8	6.78E-8	6.36E-8
0.22	6.12E-8	2.03E-8	1.99E-8	1.09E-7	5.87E-8	1.11E-7	5.55E-8	9.55E-8	7.37E-8	6.72E-8
0.24	5.53E-8	2.04E-8	2.15E-8	1.18E-7	5.49E-8	1.04E-7	5.42E-8	9.74E-8	8.11E-8	6.75E-8
0.26	4.23E-8	2.22E-8	2.54E-8	1.26E-7	6.50E-8	1.13E-7	5.99E-8	9.95E-8	8.79E-8	7.12E-8

Tabela 7.11: Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 8 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração).

<i>t</i>	<i>Track 3</i>	<i>Track 4</i>	<i>Track 7</i>	<i>Track 8</i>	<i>Track 10</i>	<i>Track 11</i>	<i>MÉDIA</i>
0.02	1.95E-8	2.60E-8	2.19E-7	3.44E-8	1.67E-8	4.51E-8	6.01E-8
0.04	2.75E-8	2.86E-8	1.67E-7	5.87E-8	2.88E-8	3.60E-8	5.78E-8
0.06	3.20E-8	3.79E-8	7.24E-8	8.18E-8	4.09E-8	5.11E-8	5.27E-8
0.08	3.23E-8	4.53E-8	8.28E-8	9.91E-8	5.52E-8	6.48E-8	6.33E-8
0.10	2.67E-8	5.14E-8	7.93E-8	1.09E-7	7.03E-8	7.42E-8	6.84E-8
0.12	1.99E-8	5.86E-8	3.23E-8	1.13E-7	8.45E-8	7.93E-8	6.45E-8
0.14	1.20E-8	5.98E-8	3.39E-8	1.11E-7	9.74E-8	7.57E-8	6.50E-8
0.16	3.59E-9	6.61E-8	5.19E-8	1.10E-7	1.12E-7	6.65E-8	6.84E-8
0.18	2.13E-9	5.70E-8	3.49E-8	1.09E-7	1.22E-7	6.24E-8	6.45E-8
0.20	5.66E-9	6.46E-8	2.83E-8	1.04E-7	1.34E-7	2.66E-8	6.05E-8
0.22		7.33E-8	2.37E-8	9.78E-8	1.42E-7		8.43E-8
0.24			1.91E-8	9.28E-8	1.43E-7		8.48E-8
0.26			1.45E-8	8.89E-8	1.41E-7		8.14E-8

Tabela 7.12: Valores do deslocamento radial dos pontos de cada seguimento efectuado no segmento de imagens do Vídeo 9 (Track 1 e Track 2 foram utilizados para calibração).

<i>t</i>	<i>Track 3</i>	<i>Track 4</i>	<i>Track 5</i>	<i>Track 6</i>	<i>Track 7</i>	<i>Track 8</i>	<i>Track 9</i>	<i>Track 10</i>	<i>MÉDIA</i>
0.02	6.05E-8	8.32E-8	3.06E-8	7.79E-8	4.77E-8	6.93E-8	4.63E-8	1.75E-8	5.41E-8
0.04	6.67E-8	1.02E-7	4.39E-8	1.06E-7	4.50E-8	7.62E-8	6.10E-8	2.61E-8	6.59E-8
0.06	7.11E-8	9.28E-8	6.00E-8	1.21E-7	4.94E-8	8.59E-8	7.28E-8	3.03E-8	7.29E-8
0.08	6.96E-8	9.07E-8	7.55E-8	1.25E-7	5.76E-8	7.98E-8	9.13E-8	3.48E-8	7.80E-8
0.10	6.97E-8	1.07E-7	8.91E-8	1.18E-7	7.65E-8	7.33E-8	1.13E-7	3.85E-8	8.56E-8
0.12	6.06E-8	1.09E-7	1.01E-7	1.15E-7	9.21E-8	8.25E-8	1.37E-7	3.70E-8	9.19E-8
0.14	4.61E-8	1.03E-7	1.08E-7	1.01E-7	9.60E-8	9.10E-8	1.60E-7	3.30E-8	9.23E-8
0.16	4.40E-8	1.12E-7	1.16E-7	1.00E-7	1.04E-7	9.72E-8	1.80E-7	2.87E-8	9.77E-8
0.18	3.76E-8	1.16E-7	1.21E-7	1.28E-7	1.17E-7	1.10E-7	1.98E-7	2.52E-8	1.07E-7
0.20	2.98E-8	1.28E-7	1.27E-7	1.63E-7	1.21E-7	1.26E-7	2.12E-7	2.03E-8	1.16E-7
0.22	2.19E-8	1.29E-7	1.33E-7	1.83E-7	1.13E-7	1.60E-7	2.28E-7	1.70E-8	1.25E-7
0.24	1.73E-8	1.48E-7	1.46E-7	1.98E-7	1.02E-7	1.96E-7	2.34E-7	1.59E-8	1.32E-7
0.26	1.33E-8	1.61E-7	1.58E-7	2.07E-7	1.13E-7	1.90E-7	2.40E-7	1.78E-8	1.37E-7



## Anexo C - Representação gráfica dos valores do Coeficiente de Dispersão ( $D_{yy}$ )

Este Anexo contém a representação gráfica dos valores dos coeficientes de dispersão ( $D_{yy}$ ), obtidos no software MatLab, de cada seguimento efectuado nos segmentos de imagens de todos os vídeos utilizados neste trabalho prático.

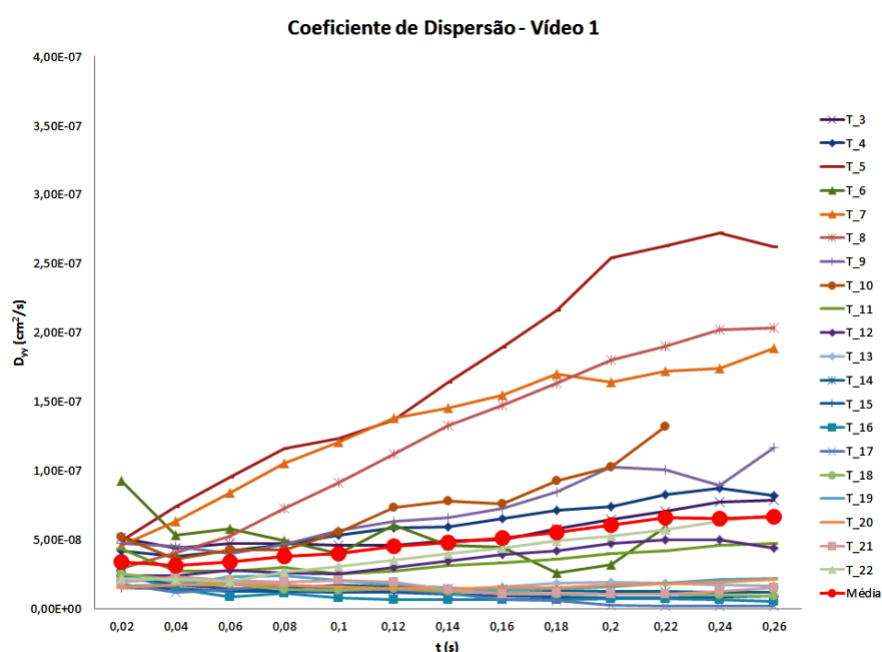


Figura 7.10: Representação gráfica dos coeficientes de dispersão calculados através do *software MatLab* dos seguimentos analisados do Vídeo 1.

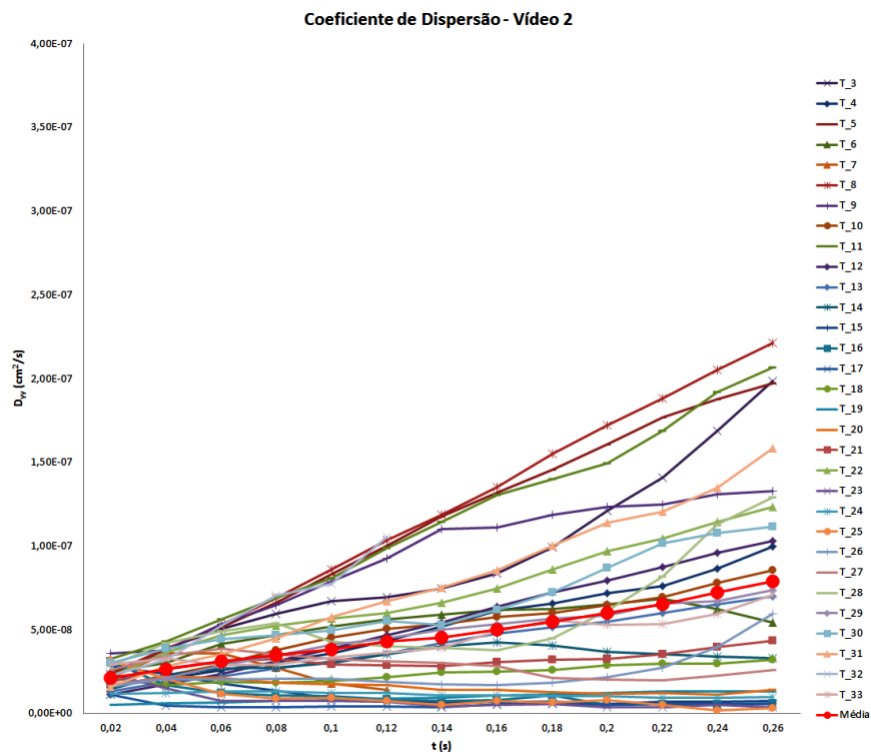


Figura 7.11: Representação gráfica dos coeficientes de dispersão calculados através do *software MatLab* dos seguimentos analisados do Vídeo 2.

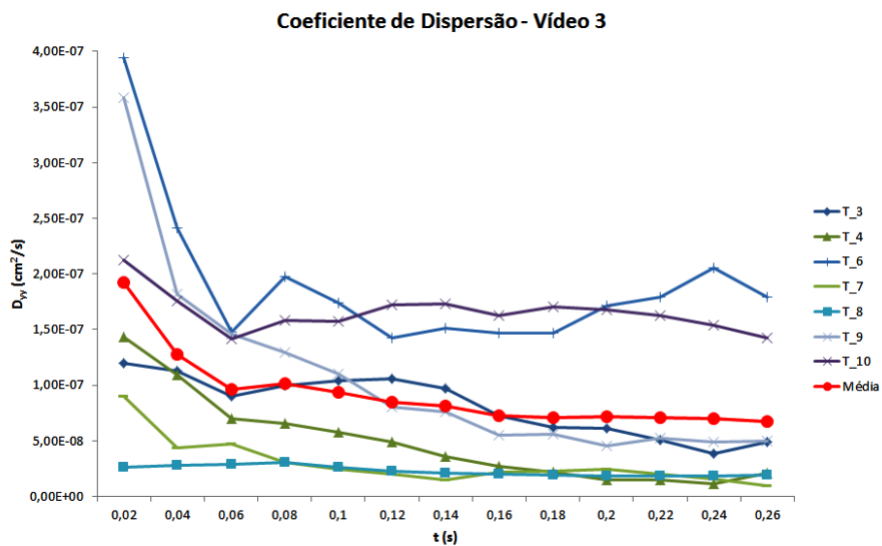


Figura 7.12: Representação gráfica dos coeficientes de dispersão calculados através do *software MatLab* dos seguimentos analisados do Vídeo 3.

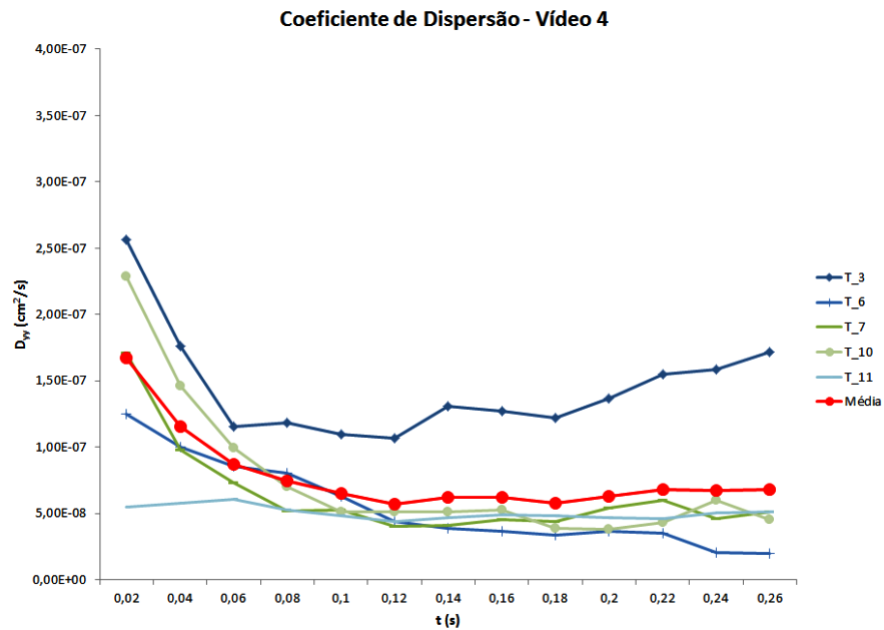


Figura 7.13: Representação gráfica dos coeficientes de dispersão calculados através do *software MatLab* dos seguimentos analisados do Vídeo 4.

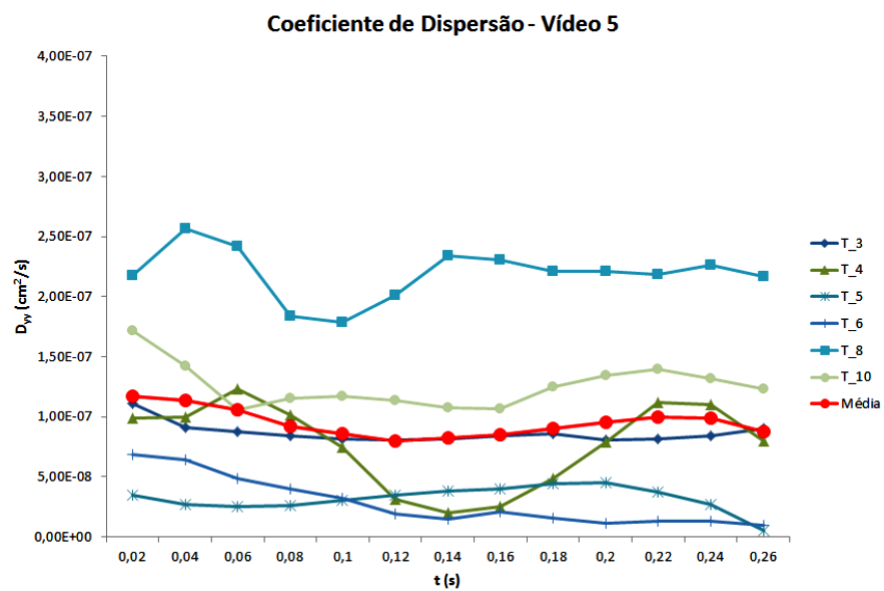


Figura 7.14: Representação gráfica dos coeficientes de dispersão calculados através do *software MatLab* dos seguimentos analisados do Vídeo 5.

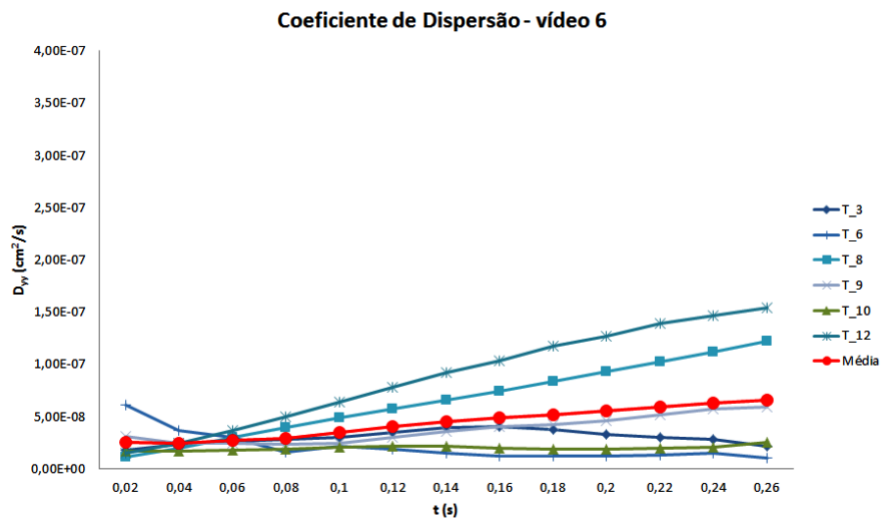


Figura 7.15: Representação gráfica dos coeficientes de dispersão calculados através do *software MatLab* dos seguimentos analisados do Vídeo 6.

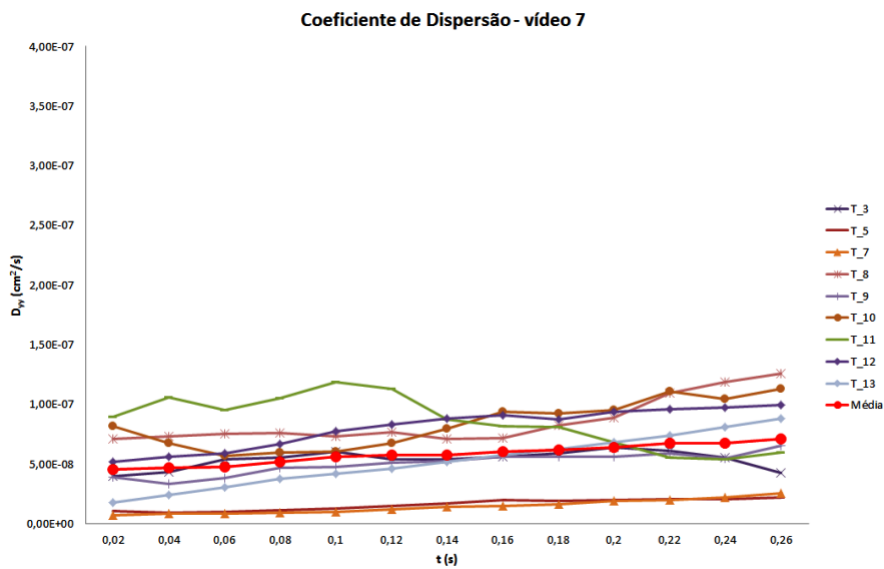


Figura 7.16: Representação gráfica dos coeficientes de dispersão calculados através do *software MatLab* dos seguimentos analisados do Vídeo 7.

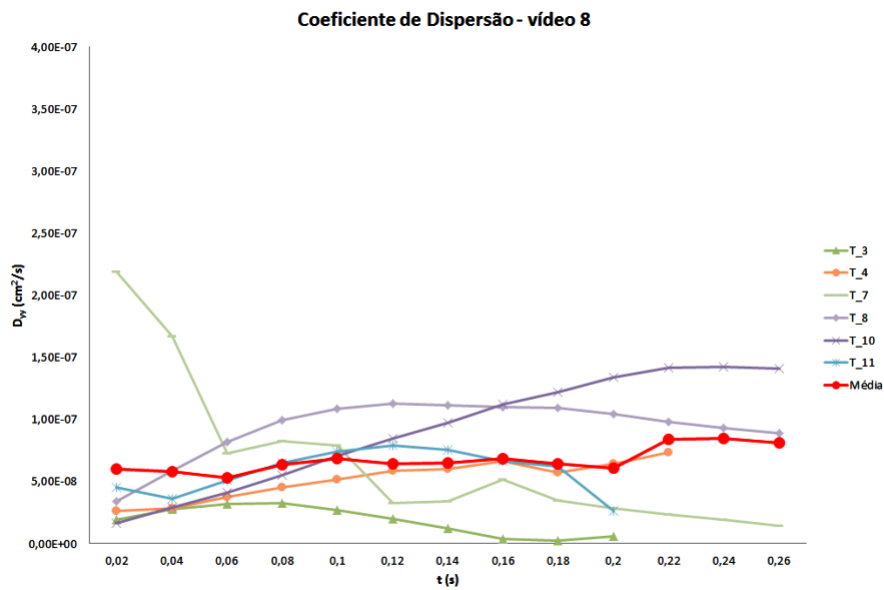


Figura 7.17: Representação gráfica dos coeficientes de dispersão calculados através do *software MatLab* dos seguimentos analisados do Vídeo 8.

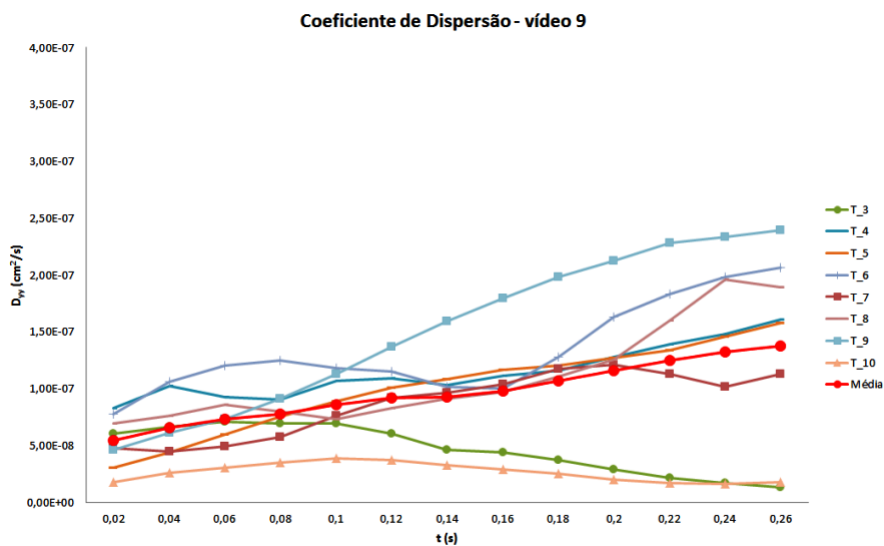


Figura 7.18: Representação gráfica dos coeficientes de dispersão calculados através do *software MatLab* dos seguimentos analisados do Vídeo 9.

