



Fábio Miguel Rolo Pereira

Licenciado

**Espectroscopia de impedância aplicada à
caracterização de células parasitadas numa
plataforma de microfluídica**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador : Hugo Águas, Doutor, FCT-UNL

Co-orientador : Abel Oliva, Doutor, ITQB-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário Secca, FCT-UNL

Arguentes: Prof. Doutor Rui Igreja, FCT-UNL
Prof. Doutor Hugo Águas, FCT-UNL
Prof. Doutor Abel Oliva, ITQB-UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2012

Espectroscopia de impedância aplicada à caracterização de células parasitadas numa plataforma de microfluídica

Copyright © Fábio Miguel Rolo Pereira, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

À família

Agradecimentos

Esta dissertação não teria sido possível sem a ajuda, atenção e apoio de algumas pessoas, às quais não poderia deixar de expressar o meu sincero agradecimento.

Gostaria de agradecer em primeiro lugar ao meu orientador, Professor Doutor Hugo Águas, o qual me deu oportunidade de integrar este grupo de trabalho neste projecto interessante.

Em segundo lugar gostaria de agradecer ao meu co-orientador, Professor Doutor Abel Oliva, pela disponibilidade, ajuda, conselhos e ensinamentos dados.

Ao meu grupo de trabalho neste projecto, constituído pelas mestres Iwona Bernacka-Wojcik e Iracema Martinho.

À Universidade Nova de Lisboa, nomeadamente à Faculdade de Ciências e Tecnologias e ao Instituto de Tecnologia Química e Biológica, que me disponibilizou todo o material utilizado para a realização do trabalho desenvolvido.

Aos meus colegas e amigos pelo apoio constante.

À minha namorada, Edina Gomes, pelo carinho.

Aos meus tios, Célia Chamiça e Jorge Paulo, e os meus primos, Francisco e João, pela disponibilidade e preocupação mostrada.

E por último, aos meus pais que sem eles nada disto seria possível. Ao meu pai Joaquim Rolo, pela paciência ao ler a tese e pelas dicas dadas. À minha mãe Elisa Pereira, pela motivação e apoio prestado. Ao meu irmão, Paulo Pereira, pela preocupação constante.

Resumo

Os parasitas são organismos que vivem em associação com outros dos quais retiram os meios para a sua subsistência, normalmente prejudicando o hospedeiro. Nos humanos, determinados parasitas afectam significativamente os eritrócitos, denominados também de glóbulos vermelhos, aumentando dramaticamente a permeabilidade da membrana plasmática resultando numa mudança da impedância celular que pode ser medida através da espectroscopia de impedância.

Actualmente, em laboratórios de análises clínicas, os resultados deste tipo de estudos podem demorar dias ou até semanas a chegarem aos médicos e, por conseguinte, aos pacientes. A finalidade deste estudo seria reduzir o número de intermediários e obter uma análise rápida e eficaz das células, para que os médicos possam iniciar prontamente os tratamentos necessários aos seus pacientes.

A técnica de espectroscopia de impedância tem vindo a ganhar importância nos últimos anos, nomeadamente para aplicações biológicas, permitindo a interpretação de mudanças morfológicas e metabólicas em células, associadas à integridade da membrana ou mudanças no conteúdo celular. Esta solução oferece grandes vantagens por ser um método não-invasivo e potencialmente não muito dispendioso. A medição pode ser feita em contínuo com recurso a chips de microfluídica, os quais contêm microcanais e eléctrodos por onde irá passar um pequeno volume de amostra biológica, permitindo caracterizar a mesma sem necessidade de marcação ou de manipulações complexas. A aplicação de sinais de tensão AC aos eléctrodos permite obter resultados a pronto num mais curto espaço de tempo em comparação com os métodos tradicionais de análises.

Este trabalho está focado essencialmente na descrição da implementação da componente electrónica num dispositivo de microfluídica de diagnóstico molecular para caracterização dessas mesmas células parasitadas, tal como na microfabricação dos dispositivos em si. Através da aplicação da soma de duas ondas de tensão AC de 85 kHz e 8,7 MHz aos eléctrodos integrados no chip de microfluídica conseguiu-se otimizar a utilização de espectroscopia de impedância para discriminação analítica de partículas individualizadas, não aderentes, num fluxo contínuo pelo microcanal. Todos os resultados obtidos a partir deste estudo foram posteriormente tratados e apresentados pelo software computacional LabVIEW.

Palavras-chave: Células parasitadas, espectroscopia de impedância, dispositivos de microfluídica, LabVIEW.

Abstract

Parasites are organisms that live in association with others of which derive the means for their subsistence, usually harming the host. In humans, certain parasites significantly affect the erythrocytes, also called red blood cells, dramatically increasing the permeability of the plasma membrane that results in a change of cell impedance that can be measured by impedance spectroscopy.

Currently, in clinical laboratories, the results of such studies can take days or even weeks to reach doctors and therefore to patients. The purpose of this study is to reduce the number of middlemen and get a quick and effective analysis of the cells, so that doctors can readily initiate necessary treatment to their patients.

The technique of impedance spectroscopy has gained importance in the last years, especially for biological applications, allowing the interpretation of metabolic and morphological changes in cells associated with the membrane integrity or changes in cellular content. This solution offers great advantages as it is a non-invasive and potentially cheap method. The measurement can be made continuous using microfluidic chips, which contain micro-channels and electrodes through which will pass a small volume of biological sample, allowing the characterization of the same without marking or other complex manipulations. The application of AC voltage signals to electrodes enables ready results in a shorter time compared to traditional analysis methods.

This work is focused mainly on the description of the implementation of electronic component in a microfluidic device for molecular diagnostic characterization of these parasitized cells, as in the microfabrication of the devices themselves. By applying the sum of two AC voltage waves of 85 kHz and 8,7 MHz to the integrated electrodes in the microfluidic chip the use of impedance spectroscopy could be optimized to the analytical discrimination of single particles, nonadherent, by a continuous microchannel flow. All results from this study were subsequently processed and presented by the computer software LabVIEW.

Keywords: Parasitized cells, impedance spectroscopy, microfluidic devices, LabVIEW.

Conteúdo

1	Introdução	1
1.1	Estado da arte	1
1.2	Microfluídica	2
1.3	Outros projectos existentes no mercado	4
2	Conceitos teóricos, materiais e métodos	7
2.1	Estrutura e construção dos chips de microfluídica - Microfabricação	7
2.1.1	Limpeza das “wafers”	9
2.1.2	Colocação do SU-8 em “wafers” de silício	9
2.1.3	Exposição do SU-8 no alinhador de máscaras	11
2.1.4	Produção de PDMS	13
2.1.5	Molde intermédio em resina epóxi	14
2.1.6	Molde intermédio em PDMS	15
2.1.7	Caracterização dos eléctrodos	16
2.1.8	Alinhamento e selagem do chip através de plasma de oxigénio	20
2.2	Espectroscopia de Impedância	22
2.2.1	Aplicação em amostras sem utilização de chips de microfluídica	25
2.2.1.1	Utilização de circuito eléctrico equivalente para simulação de amostras biológicas	26
2.2.1.2	Testes com amostras biológicas em eléctrodos exteriores	27
2.2.2	Técnicas de aplicação a amostras para utilização em chips de microfluídica	30
2.2.2.1	“AC Discrete Frequency System”	30
2.2.2.2	“AC Discrete Frequency System” alternativo	32
2.2.2.3	“MLS Maximum Length Sequence system”	33
2.2.2.4	“MLS Maximum Length Sequence system” alternativo	34
2.3	Software de controlo e aquisição de dados - LabVIEW	35
2.3.1	Breve história das linguagens de programação	35
2.3.2	Estrutura e características do software	35
3	Resultados e Discussão	39
3.1	Resultados do processo de microfabricação	39
3.2	Espectroscopia de impedância aplicada a uma amostra biológica simulada com um circuito equivalente	47
3.3	Espectroscopia de impedância aplicada a amostras biológicas em eléctrodos exteriores	51
3.3.1	Resultados obtidos nos ensaios com água com sal	51

3.3.2	Resultados obtidos nos ensaios com PBS	52
3.3.3	Resultados obtidos nos ensaios com sangue ovino (eritrócitos des-fibrinados)	53
3.3.4	Resultados obtidos em LabVIEW	56
3.4	Testes prévios e simulação da técnica "AC Discrete Frequency System" em circuitos equivalentes	62
3.5	Espectroscopia de impedância utilizando a técnica "AC Discrete Frequency System" aplicada a amostras biológicas utilizando chips de microfluídica	70
4	Conclusões	79
5	Bibliografia	81
6	Anexos	85
A	Relatório do protocolo de execução do processo de microfabricação	87
B	Dados relativos aos espectros de impedância de amostras biológicas em eléctrodos exteriores	94
C	Painel frontal do teste com eléctrodos exteriores	101
D	Diagrama de blocos e respectivo painel frontal do algoritmo de aquisição dos dados vindos dos amplificadores lock-in	102
E	Diagrama de blocos do algoritmo para guardar todos os dados obtidos a partir da placa de aquisição de dados	103

Lista de Figuras

1.1	Imagem de um dispositivo/chip de microfluídica (adaptado de Nascimento, 2006).	3
1.2	Esquema do sistema Lab-on-a-chip compreendendo as interfaces óptica e eléctrica para preparação, manipulação e análise celular (adaptado de Gawad et al., 2008).	3
1.3	Dispositivos/discos utilizados pela empresa Biosurfit para análise de amostras biológicas (adaptado de Biosurfit, 2012).	5
1.4	Leitor e software dos dispositivos/discos para obtenção dos resultados das análises (adaptado de Biosurfit, 2012).	5
1.5	Sistema MicroFlow™ da Micronics (adaptado de Nascimento, 2006).	5
2.1	Esquema das estruturas do dispositivo de microfluídica (adaptado de Kützel et al., 2007).	7
2.2	Imagem representativa da focagem hidrodinâmica onde a amostra biológica é colocada (adaptado de Kim e Ligler, 2010).	8
2.3	“Wafer” de silício (adaptado de MIT Open Courseware, 2012).	9
2.4	“Datasheet” da espessura do SU-8 em função da velocidade de rotação, para 21 °C (adaptado de MicroChem, 2012).	10
2.5	Alinhador de máscaras.	12
2.6	Exsiccador em vácuo com as amostras presentes no interior.	14
2.7	Câmara de plasma.	15
2.8	Canhão de electrões ou “e-beam”.	17
2.9	Máscara de crómio dos eléctrodos.	18
2.10	Método de obtenção dos eléctrodos pelo processo de “lift-off” (adaptado de Wolf e Tauber, 2005)	19
2.11	Máquina de corte em diamante.	20
2.12	(a) Vista ao microscópio dos eléctrodos. (b) Vista ao microscópio da zona de alinhamento do PDMS para caracterização eléctrica.	21
2.13	Esquema dos “eléctrodos líquidos” (adaptado de Demierre, 2008).	21
2.14	Esquema do método de alinhamento do PDMS à base de vidro com os eléctrodos (adaptado de Loureiro, 2011).	22
2.15	Técnica de espectroscopia de impedância aplicada a um microcanal com um determinado fluxo de amostra biológica (adaptado de Gawad et al., 2008).	23
2.16	Gama limite de frequências (adaptado de Demierre, 2008).	24
2.17	Propriedades das diferentes gamas de frequências aplicadas a uma célula (adaptado de Kim e Ligler, 2010).	24

2.18	(a) Esquema do método teste de cálculo da impedância de uma associação de resistências e condensadores representado por uma caixa. (b) Associação objectivo presente na caixa (adaptado de Chinaglia et al., 2008).	26
2.19	Representação das duas ondas sinusoidais desfasadas (adaptado de Chinaglia et al., 2008).	27
2.20	Eléctrodos com a amostra biológica.	28
2.21	Diagrama do método de obtenção dos resultados de impedância de uma amostra biológica a partir de eléctrodos exteriores sem utilização de chip.	28
2.22	Esquema representativo do diagrama do método de obtenção dos resultados de impedância.	28
2.23	Osciloscópio laboratorial de dois canais de entrada de sinal onde foi possível observar as ondas resultantes.	29
2.24	Esquema do amplificador operacional INA129 (adaptado de Texas Instruments, 2012).	30
2.25	Esquema da técnica “AC Discrete Frequency System” (adaptado de Sun et al., 2008).	31
2.26	Microcanal durante a passagem de uma célula num dos dois pares de eléctrodos (adaptado de Gawad et al., 2008).	31
2.27	Esquema da técnica “AC Discrete Frequency System” alternativa.	32
2.28	Esquema da técnica “Maximum Length Sequence System” (adaptado de Sun et al., 2008).	33
2.29	Esquema da técnica “Maximum Length Sequence System” alternativa.	34
2.30	Exemplo de um diagrama de blocos.	36
2.31	Correspondente painel frontal do diagrama de blocos apresentado.	36
2.32	Exemplo de um diagrama de blocos de uma aquisição de sinal através de uma “DAQ card” e respectivo estudo e medidas no programa, guardando posteriormente os dados (adaptado de National Instruments, 2012).	37
3.1	Imagem microscópica de um microcanal de perfil em PDMS (adaptado de Vaz, 2012).	40
3.2	Resultado final da “Wafer A” revelada.	40
3.3	Vista ao microscópio dos canais (a), da zona de detecção eléctrica (b) e da barra de escala (c) do molde de SU-8 antes da produção de PDMS.	41
3.4	Molde de SU-8 após a produção de PDMS.	41
3.5	Zona de detecção eléctrica de uma estrutura do molde de SU-8 após a produção de PDMS.	42
3.6	Vista ao microscópio dos canais (a), da zona de detecção eléctrica (b) e da barra de escala (c) do molde de SU-8 após a produção de PDMS.	42
3.7	Imagem do PDMS com as respectivas estruturas, ou seja, a parte superior de um dispositivo de microfluídica.	43

3.8	Vista ao microscópio dos canais (a) e da zona de detecção eléctrica (b) do PDMS.	43
3.9	Vista ao microscópio de duas secções transversais do PDMS.	44
3.10	Imagem das quatro amostras de vidro após deposição das camadas de titânio e ouro no canhão de electrões.	45
3.11	Amostra de vidro com os eléctrodos já expostos.	45
3.12	Imagem dos eléctrodos individuais expostos em vidro, que vão servir de base no chip de microfluídica.	46
3.13	Estrutura de alinhamento do dispositivo de microfluídica montado em microscópio com ampliação de 100x.	46
3.14	Imagem ao microscópio do alinhamento entre o vidro com os eléctrodos e o PDMS, na zona de caracterização eléctrica.	47
3.15	Dispositivo de microfluídica completo.	47
3.16	Circuito equivalente de simulação de uma amostra biológica para determinação de impedância.	48
3.17	Espectro teórico da associação anterior.	48
3.18	Ondas obtidas, a partir do osciloscópio interactivo, entre a “caixa” e a resistência em série.	49
3.19	Espectro de impedância relativo à associação em teste.	50
3.20	Espectro de impedância da água com sal em função da frequência.	51
3.21	Espectro da parte imaginária da impedância da água com sal em função da parte real.	52
3.22	Gráfico da fase em função da frequência, relativo à água com sal.	52
3.23	Espectro de impedância do PBS em função da frequência.	52
3.24	Espectro da parte imaginária da impedância do PBS em função da parte real.	53
3.25	Gráfico da fase em função da frequência, relativo ao PBS.	53
3.26	Espectro de impedância do sangue em função da frequência.	53
3.27	Espectro da parte imaginária da impedância do sangue em função da parte real.	54
3.28	Gráfico da fase em função da frequência, relativo ao sangue.	54
3.29	Diagrama de blocos do algoritmo para obtenção dos dados das ondas.	56
3.30	Diagrama de blocos do algoritmo de tratamento dos dados adquiridos.	57
3.31	Diagrama de blocos do algoritmo de construção dos gráficos de impedância.	58
3.32	Diagrama de blocos do algoritmo do processo de guardar os gráficos.	59
3.33	Diagrama de blocos do algoritmo do processo de guardar os “arrays” de dados.	59
3.34	Gráfico da parte real da impedância da água em função da frequência, obtido em labview.	60
3.35	Gráfico da parte imaginária da impedância da água em função da frequência, obtido em labview.	60

3.36 Gráfico da parte imaginária da impedância da água em função da parte real, obtido em labview.	61
3.37 Gráfico da fase em função da frequência, relativo à água, obtido em labview.	61
3.38 Montagem eléctrica da técnica “AC Discrete Frequency System” (adaptado de Nascimento, 2006).	62
3.39 Geradores de funções.	63
3.40 Circuito eléctrico, simulado com o programa MULTISIM, de um simples somador de duas ondas.	63
3.41 Visualização do osciloscópio digital do circuito onde estão presentes as ondas geradas.	63
3.42 Visualização do osciloscópio digital do circuito onde estão presentes as ondas somadas.	64
3.43 Ondas somadas em placa “breadboard” e posteriormente inseridas no osciloscópio laboratorial.	64
3.44 (Em cima) Circuitos eléctricos de simulação de células biológicas na passagem pelos eléctrodos, ou seja, na região de aquisição de resultados, num dispositivo de microfluídica. (Em baixo) Sinal esperado a partir da diferença da impedância entre AC e BC (adaptado de Kim e Ligler, 2010).	65
3.45 Figura representativa dos dois amplificadores lock-in em funcionamento.	66
3.46 Montagem laboratorial de todo o esquema.	66
3.47 Diagrama de blocos do algoritmo para guardar os dados obtidos.	68
3.48 Gráfico da simulação da passagem de células pelos eléctrodos fictícios.	68
3.49 Sistema de pressão utilizado para fazer inserir a amostra no chip de microfluídica (adaptado de Demierre, 2008).	71
3.50 Imagem do chip com os fios condutores soldados aos eléctrodos.	71
3.51 Montagem laboratorial do esquema global do método “AC Discrete Frequency System” aplicado a amostras biológicas utilizando dispositivos de microfluídica.	72
3.52 Painel frontal de obtenção dos dados.	73
3.53 Gráfico da passagem das “beads” de 6 μm pelos eléctrodos.	74
3.54 Gráfico da magnitude do sinal a 8,7 MHz em função da magnitude do sinal a 85 kHz.	75
3.55 Dados sobre espectroscopia de impedância acerca de “beads” e eritrócitos não parasitados (adaptado de Cheung et al., 2005).	76
3.56 Estudo sobre espectroscopia de impedância de “beads” e eritrócitos quimicamente modificados (adaptado de Cheung et al., 2005).	77
3.57 Gráficos de dispersão das medidas de espectroscopia de impedância apresentando mudanças nas características dieléctricas para eritrócitos normais (“uRBC”), parasitados (“pRBC”) e fantasma (“gRBC”) (adaptado de Küttel et al., 2007).	78

6.1	Espectro de impedância da água em função da frequência.	94
6.2	Espectro da parte imaginária da impedância da água em função da parte real.	95
6.3	Gráfico da fase em função da frequência, relativo à água.	95
6.4	Espectro de impedância do vinagre em função da frequência.	97
6.5	Espectro da parte imaginária da impedância do vinagre em função da parte real.	98
6.6	Gráfico da fase em função da frequência, relativo ao vinagre.	98
6.7	Painel frontal do teste com eléctrodos exteriores.	101
6.8	Diagrama de blocos e respectivo painel frontal do algoritmo de aquisição dos dados vindos dos amplificadores lock-in.	102
6.9	Diagrama de blocos do algoritmo para guardar todos os dados obtidos a partir da placa de aquisição de dados.	103

Lista de Tabelas

2.1	“Datasheet” para os tempos de “soft bake” (adaptado de MicroChem, 2012).	10
2.2	“Datasheet” para a dose de exposição do SU-8 (adaptado de MicroChem, 2012).	11
2.3	“Datasheet” para os tempos de “post bake”.	12
2.4	“Datasheet” para os tempos de revelação (adaptado de MicroChem, 2012).	13
3.1	Medidas realizadas da espessura dos canais em PDMS.	44
3.2	Dados relativos às ondas entre a “caixa” e a resistência R em série para várias frequências.	49
3.3	Valores da parte real e da parte imaginária do espectro de impedância da associação em questão.	50
6.2	Dados experimentais de impedância da água.	94
6.3	Dados experimentais de impedância da água com sal.	96
6.4	Dados experimentais de impedância do PBS.	96
6.5	Dados experimentais de impedância do vinagre.	97
6.6	Dados experimentais de impedância do sangue.	99
6.7	Dados relativos aos resultados de impedância da água, obtidos mediante a utilização do software labview, em teste com eléctrodos exteriores.	100

Lista de Acrónimos

μ TAS	"micro Total Analysis Systems", microsistemas de análise total
AC	"alternating current", corrente alterna
DC	"direct current", corrente contínua
DNA	"deoxyribonucleic acid", ácido desoxirribonucleico
BioMEMS	sistemas biomédicos microelectromecânicos
LOC	"lab-on-a-chip"
MEMS	"microelectromechanical systems", sistemas microelectromecânicos
PBS	"phosphate buffer saline", tampão fosfato-salino
PDMS	"Poly-dimethylsiloxane", polidimetilsiloxano
PMMA	"poly-methylmethacrylate", polimetil-metacrilato
RBC	"red blood cells", glóbulos vermelhos
iRBC	"infected red blood cells", glóbulos vermelhos infectados
nRBC	"normal red blood cells", glóbulos vermelhos normais
uRBC	"uninfected red blood cells", glóbulos vermelhos não infectados
pRBC	"parasitised red blood cells", glóbulos vermelhos parasitados
gRBC	"ghost red blood cells", glóbulos vermelhos fantasma



Introdução

1.1 Estado da arte

A espectroscopia de impedância em células tem emergido como uma grande potencialidade de investigação em biologia e medicina a fim de existir uma rápida detecção de doenças e posterior estudo e efeitos que várias substâncias têm nessas mesmas células vivas, além de fornecer percepções detalhadas acerca de funções mecânicas, físicas e bioquímicas. É assim possível realizar um estudo detalhado a partir deste método com a finalidade de criar um modelo que representará uma célula funcional, baseado nas informações fisiológicas e patológicas recolhidas previamente. Além disso, as alterações funcionais de que as células são alvo quando são infectadas geralmente acontecem antes das alterações orgânicas ou outros sintomas clínicos, pelo que a espectroscopia de impedância apresenta ser uma mais-valia não só para a detecção e estudo do desenvolvimento dessa doença desde os seus estágios iniciais de incubação como também para a avaliação da eficácia de qualquer tratamento reabilitativo (Wang et al., 2009).

Actualmente a espectroscopia de impedância é muitas vezes associada à sua utilização em plataformas de microfluídica através do desenvolvimento de tecnologia de detecção de agentes patogénicos *in vivo* através de dispositivos lab-on-a-chip que têm como principais características o seu reduzido tamanho, o baixo custo de produção e a sua facilidade de transporte. Através das suas importantes características, nomeadamente a existência de canais de reduzidas dimensões na ordem dos micrómetros por onde existirá um fluxo laminar da substância a avaliar, os dispositivos de microfluídica vão possibilitar a análise singular de células que, juntamente com a técnica de espectroscopia de impedância associada aos microchips em questão, irão tornar possível o estudo das características eléctricas dessas células, tais como a capacitância, resistência celular e resistência citoplasmática, entre outras (Foster et al., 1989; Cheung et al., 2005; Grimnes et al., 2002). Existem numerosas técnicas de avaliação das propriedades eléctricas das células. No entanto, esta última referida, na qual a substância a analisar é inserida num microcanal com um determinado fluxo, tem largas vantagens sobre todas as outras. Além de ser uma técnica simples e não invasiva, esta, para ser viável, contém dois pares de eléctrodos opostos presentes num determinado ponto do microcanal que vai assim permitir monitorizar as propriedades dieléctricas célula a célula. Injectando um estímulo em dois desses eléctrodos adjacentes e com a passagem de uma célula pelo local em questão, iremos obter uma

resposta através dos eléctrodos opostos que nos possibilitará obter os espectros de impedância desejados. De referir também que os eléctrodos em questão necessitam de estar associados a uma determinada instrumentação específica, mediada por um respectivo software o qual permitirá fazer a aquisição e tratamento dos dados.

O trabalho realizado nesta dissertação de mestrado tem como objectivo o uso da técnica de espectroscopia de impedância aplicado às plataformas de microfluídica para detecção e caracterização de células parasitadas. Para isso, irá ser desenvolvido e otimizado um chip de microfluídica através de métodos litográficos. Também mediante a utilização de técnicas de fotolitografia e deposição de filmes finos por canhão de electrões irão ser fabricados e integrados no dispositivo os dois pares de eléctrodos. A partir destes será possível construir um método de obtenção dos resultados pretendidos de discriminação e caracterização de células parasitadas através da aplicação da técnica de espectroscopia de impedância "AC Discrete Frequency System" (Sun et al., 2008; Nascimento, 2006; Cheung et al., 2005). Toda a instrumentação envolvente será construída e otimizada para que o sistema funcione mediante a aplicação simultânea de duas ondas de tensão AC, uma de baixa-frequência na ordem dos 85 kHz e outra de alta-frequência na ordem dos 8,7 MHz (Küttel et al., 2007; Nascimento, 2006), com o objectivo de obtermos dados acerca do volume celular e características dieléctricas, respectivamente. Serão realizados também testes preliminares, não só como primeira abordagem a este conceito de impedância como também para averiguação do correcto funcionamento dos instrumentos laboratoriais. Irá proceder-se à determinação da impedância de pequenos circuitos eléctricos (Chinaglia et al., 2008) tal como de amostras líquidas utilizando eléctrodos exteriores ao chip. Por fim realizar-se-ão os testes com os dispositivos de microfluídica propriamente ditos. Toda a instrumentação a desenvolver também incluirá a programação em software labview o qual irá possibilitar a consequente visualização, tratamento e interpretação dos resultados obtidos que, através de uma placa de aquisição de dados, serão inseridos num computador e consequentemente no programa.

Para compreendermos melhor todos estes objectivos propostos, será necessário dar primeiramente uma breve explicação sobre a construção e desenvolvimento dos dispositivos/chips de microfluídica; uma caracterização dos eléctrodos utilizados ao nível estrutural e dimensional; algumas definições breves acerca da técnica de espectroscopia de impedância, nomeadamente o método realizado propriamente dito tal como toda a instrumentação utilizada neste projecto; e uma descrição acerca do software utilizado que teve como objectivo mediar e tratar a informação obtida experimentalmente, na plataforma de microfluídica, a nível informático.

1.2 Microfluídica

Foi nos anos oitenta que se verificou o maior desenvolvimento em termos de microfabricação de estruturas tecnológicas. Começaram-se a estudar e a produzir novos microssistemas electromecânicos (como é o caso do dispositivo de microfluídica apresentado na

figura 1.1) com o objectivo de auxiliar a medicina e biologia.

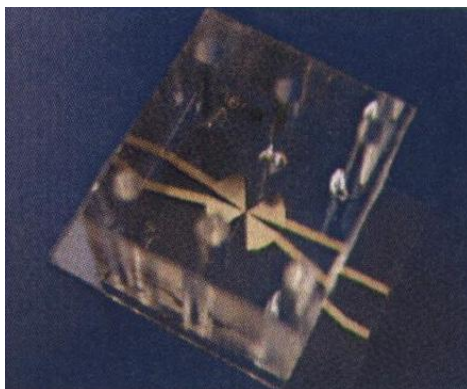


Figura 1.1: Imagem de um dispositivo/chip de microfluídica (adaptado de Nascimento, 2006).

Durante os últimos anos e com a evolução dos tempos, sentiu-se a necessidade de procurar obter resultados de análises ou diagnósticos sanguíneos de uma forma mais rápida e economicamente viável. Com estes chips de microfluídica podemos obter bons resultados de análises celulares contribuindo para o desenvolvimento do controlo e determinação dos parâmetros mecânicos, eléctricos e bioquímicos das células em estudo, de uma forma eficaz, rápida e pouco dispendiosa. Além disto, nestes dispositivos podem ainda ser integradas fibras ópticas que nos vão fornecer dados acerca das características ópticas das células, paralelamente aos eléctrodos, possibilitando a obtenção de um largo conjunto de características eléctricas. Podemos observar o esquema deste dispositivo, e suas possibilidades de estudo, na figura 1.2.

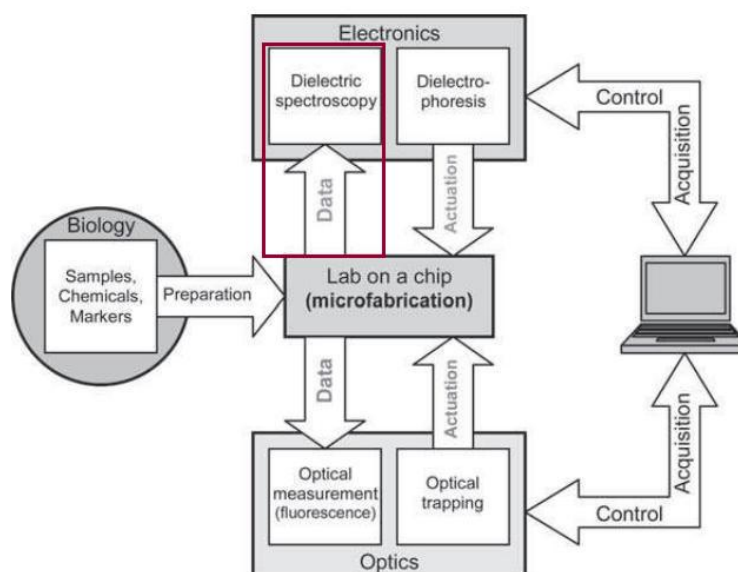


Figura 1.2: Esquema do sistema Lab-on-a-chip compreendendo as interfaces óptica e eléctrica para preparação, manipulação e análise celular (adaptado de Gawad et al., 2008).

Este esquema mais amplo resume claramente todo o processo de análise em estudo. Como podemos observar, é possível realizar várias análises através do dispositivo lab-on-a-chip, que também pode ser denominado μ TAS ("micro Total Analysis Systems") (Gascoyne et al., 2004). Esta dissertação será focada essencialmente nos eléctrodos e na parte electrónica, nomeadamente a espectroscopia de impedância que é caracterizada pela parte superior do esquema devidamente assinalada, tal como na microfabricação dos dispositivos e no sistema de controlo e aquisição de dados, pois são partes essenciais ao desenvolvimento deste projecto. No entanto, é importante referir muitas das outras vantagens que advêm da utilização deste microdispositivo. Tal como já mencionado, uma dessas vantagens é a possibilidade de integração de fibras ópticas no chip que permitem realizar variadíssimos outros estudos, ou a capacidade de electronicamente separar células contaminadas das células sãs, entre outras.

Comparando a parte óptica com a parte electrónica pode-se verificar que a primeira tem mais sensibilidade no reconhecimento e discriminação celular, usando em muitos casos marcadores que muitas vezes têm um custo um pouco mais elevado. Já na parte electrónica o mesmo não sucede, o que facilita a preparação das amostras. Ambas as técnicas têm as suas vantagens e desvantagens, mas nos dois casos a sua grande vantagem é a possibilidade de trabalhar em células singulares considerando cada célula como uma única amostra.

1.3 Outros projectos existentes no mercado

Actualmente já existem, comercialmente disponíveis, vários projectos com dispositivos de microfluídica desenvolvidos para análise sanguínea. Os testes comuns de laboratório podem demorar várias horas ou até dias até obterem os resultados desejados e podem demorar outros tantos dias a entregar os resultados de volta ao médico. O objectivo será então reduzir esse número de intermediários e de tempo perdido de forma a obterem-se esses mesmos resultados de uma forma mais rápida que permitirá, por parte do médico, um tratamento mais eficaz ao paciente.

Uma empresa que desenvolve este tipo de projecto é a BioSurfit. Sediada em Portugal, esta empresa analisa as suas amostras biológicas a partir da tecnologia spinit®. Esta tecnologia consiste num sistema integrado modular (semelhante a um pequeno disco de material descartável e renovável - figura 1.3) que, inserido num respectivo leitor (figura 1.4), vai utilizar a força contrífuga para que a amostra atravesse os canais de microfluídica no sentido de ser analisada através da técnica de espectroscopia. Ao paciente apenas lhe é retirada uma gota de sangue e os resultados são obtidos em 15 minutos, apresentando custos pouco elevados (Biosurfit, 2012).



Figura 1.3: Dispositivos/discos utilizados pela empresa Biosurfit para análise de amostras biológicas (adaptado de Biosurfit, 2012).



Figura 1.4: Leitor e software dos dispositivos/discos para obtenção dos resultados das análises (adaptado de Biosurfit, 2012).

Muitas outras empresas estrangeiras também já comercializam este tipo de produtos, como é o caso da Micronics. A Micronics apresenta dois sistemas de análise sanguíneos: o MicroFlow™ (figura 1.5) que permite, a partir de pequenos cartões onde se inserem as amostras, separar as partículas pelo tamanho das mesmas, e o Microcytometer® que é um citómetro de fluxo portátil que, em apenas 5 minutos, realiza um exame de contagem, classificação e análise das células com o objectivo de obter resultados da exposição patogénica das mesmas.



Figura 1.5: Sistema MicroFlow™ da Micronics (adaptado de Nascimento, 2006).

Conceitos teóricos, materiais e métodos

2.1 Estrutura e construção dos chips de microfluídica - Microfabricação

Os chips de microfluídica têm uma forma própria de construção com uma estrutura previamente definida (figura 2.1) com o objectivo de obtermos os melhores resultados possíveis. A estrutura utilizada para este dispositivo neste projecto centra-se na utilização de um canal principal, de comprimento entre 0,5 cm e 1 cm e valores de largura e altura com dimensões de $20\ \mu\text{m}$, por onde irá passar a amostra biológica em estudo, ou seja, os eritrócitos. À entrada do canal principal temos três orifícios/reservatórios, também denominados de “inlets”, e à saída outros três orifícios, estes denominados de “outlets”. Estas denominações têm a ver com as suas funções no chip, pois os “inlets” têm como função fazer entrar a amostra e os “outlets” deixar sair a amostra do dispositivo.

O local ou a região do chip onde serão realizadas as medidas será, obviamente, no canal principal onde estão localizados também os eléctrodos necessários ao estudo.

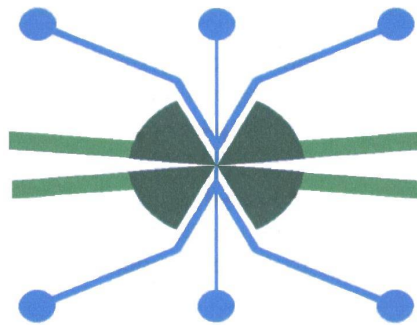


Figura 2.1: Esquema das estruturas do dispositivo de microfluídica (adaptado de Küttel et al., 2007).

É também adjacente ao local de inserção dos eléctrodos que se localiza o local de colocação das fibras ópticas para realização do estudo óptico das células, aquando da passagem destas pelo canal principal.

Para realizar uma análise concreta da amostra em aplicações de microfluídica, o líquido inserido no chip necessita de se mover pelos microcanais, especialmente pelo canal

central. Existem várias técnicas de manipulação dos líquidos no chip. A técnica utilizada para este projecto denomina-se de “pressure driven flow” e tem como base a utilização da pressão para fazer o líquido percorrer os canais. A amostra é colocada nos reservatórios de entrada e a diferença de pressão inserida entre os “inlets” e os “outlets” vai possibilitar o transporte das células pelo canal central (Braschler et al., 2007). Os aspectos como o fluxo e a velocidade vão ser definidos tanto por essa diferença de pressão existente entre os canais de entrada e os canais de saída como também pela resistência do fluido no canal. Posteriormente os parâmetros de fluxo e velocidade irão ser medidos a partir de pequenos medidores colocados logo à saída do aparelho de pressão. Esta técnica pneumática de controlo de pressão também pode ser realizada no sentido inverso e assim modificar o sentido do fluxo dentro do canal para possibilitar realizar uma maior aferição nas medidas das células com várias passagens pelo local dos eléctrodos ou pelo local das fibras ópticas.

Outra questão acerca do chip é o facto de este conter três entradas “inlets” e três saídas “outlets” em vez de conter apenas duas, que seria uma de entrada do líquido e uma de saída. Ora a razão para este facto centra-se na necessidade de reduzir o caudal da amostra para esta passar exactamente pelo meio do canal e assim aferir os resultados ao pormenor (focagem hidrodinâmica - figura 2.2). Logo, a amostra em estudo irá ser inserida apenas no “inlet” central, enquanto que nas duas entradas laterais irá ser inserida uma substância apenas de redução do caudal da primeira, servindo apenas como diluição pois não poderá afectar o estudo e os resultados.

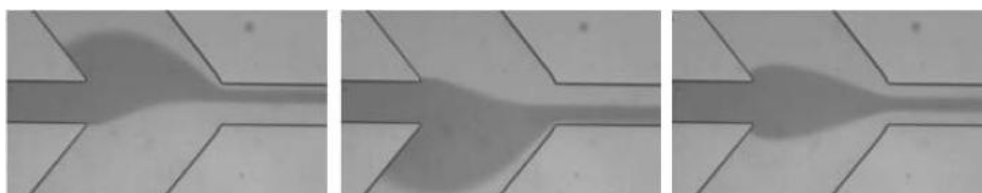


Figura 2.2: Imagem representativa da focagem hidrodinâmica onde a amostra biológica é colocada (adaptado de Kim e Ligler, 2010).

Toda esta estrutura é construída em polidimetilsiloxano, também denominado de PDMS, que é uma mistura de polímeros lineares siloxano totalmente metilados. Este material pertence a um grupo de organo-silicones poliméricos, compostos que são usualmente referidos como silicones. As suas capacidades são particularmente conhecidas como sendo um material inerte, maleável, não tóxico e não inflamável, sendo que é muito utilizado especialmente em medicina, nomeadamente em lentes de contacto por ser um material que não oferece resistência à passagem de líquidos.

No entanto, para construirmos esta estrutura anteriormente referida, é necessário existir um molde construído em SU-8 para servir de base à formação dos respectivos canais.

O SU-8 é uma resina epóxi fotossensível que é utilizada como fotorresiste de tipo negativo, ou seja, a parte que é exposta à luz torna-se insolúvel ao revelador e a parte que não foi exposta é dissolvida. A pós-exposição inicia um processo de “crosslinking” que torna as cadeias poliméricas nas regiões expostas mais resistentes. Assim, durante a revelação, é removido o fotorresiste que não foi exposto, sendo esta a razão do padrão obtido ser negativo em relação ao padrão da máscara fotolitográfica. Este material permite a obtenção por “spin-coating” de películas de espessuras na ordem dos micrómetros sendo que é possível realizar múltiplas deposições. De referir também que o processamento do SU-8 é feito pelos métodos fotolitográficos convencionais (UV, 350-400 nm), mas a exposição também pode ser realizada por feixe de electrões ou raios-X.

A microfabricação destes dispositivos é um processo um pouco complexo que requer alguma técnica laboratorial e de manuseamento dos instrumentos. A sua produção é realizada numa sala limpa com temperatura regularizada e luz própria que possibilite o manuseamento do SU-8, o qual já vimos que é sensível a determinados comprimentos de onda.

2.1.1 Limpeza das “wafers”

O processo é iniciado com a limpeza de bases de silício circulares (figura 2.3), ou “wafers”, que vão servir de suporte à colocação do SU-8. Estas “wafers” de silício de 10 cm de diâmetro são limpas primeiramente com acetona em ultrasons durante 10 minutos e depois com isopropanol novamente em ultrasons durante mais 10 minutos. Após uma devida secagem com a pistola de azoto, as “wafers” são colocadas sobre uma placa de aquecimento a 180 °C durante 10 minutos e deixadas repousar até atingirem novamente a temperatura ambiente.

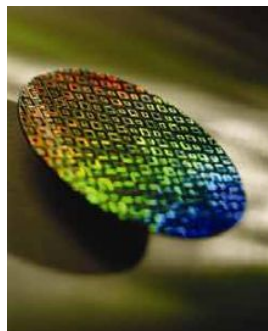


Figura 2.3: “Wafer” de silício (adaptado de MIT Open Courseware, 2012).

2.1.2 Colocação do SU-8 em “wafers” de silício

Com a “wafer” correctamente limpa e seca, esta vai ser colocada em “spin coat” numa plataforma rotativa (“Karl Suss CT62, Suss MicroTec, Germany”) com uma pequena cobertura de fotorresiste negativo SU-8 2025. Primeiramente a “wafer” rodará durante 7 segundos a uma velocidade de 500 rotações por minuto (rpm) com uma aceleração de

100 rpm/segundo e posteriormente rodará durante 30 segundos a uma velocidade de 4000 rpm com uma aceleração de 300 rpm/segundo. De referir que esta última velocidade de 4000 rpm apresentada pode ser variável pois este valor pode ser menor ou maior consoante a temperatura no momento de execução do programa.

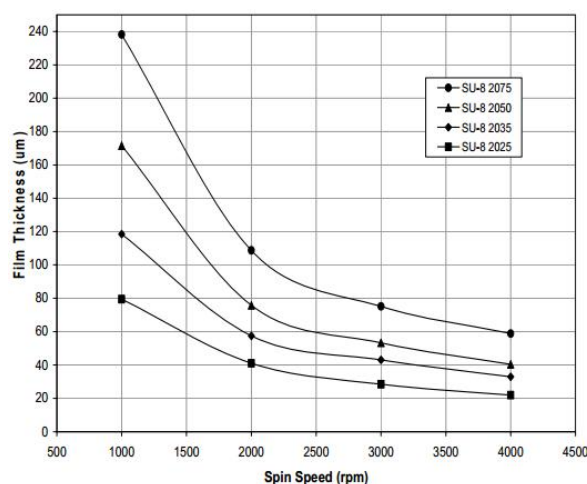


Figura 2.4: “Datasheet” da espessura do SU-8 em função da velocidade de rotação, para 21 °C (adaptado de MicroChem, 2012).

Como podemos observar no gráfico anterior, para uma espessura de 20 μm , a qual é a desejada para os microcanais, corresponde uma velocidade de 4000 rpm para o SU-8 2025 que usamos para este procedimento. No entanto, os dados deste gráfico correspondem a uma temperatura de 21 °C. Por cada grau a mais o SU-8 tornar-se-á mais viscoso e teremos que diminuir a velocidade de rotação em 25 rpm. Caso se verifique o contrário, ou seja, uma temperatura mais baixa, por cada grau a menos teremos que aumentar a velocidade de rotação em 25 rpm para contrariar a diminuição da viscosidade do SU-8 (Vaz, 2012).

No final da colocação do SU-8 na “wafer”, esta é aquecida numa placa de aquecimento (“HS40A-2, Torrey Pines Scientific, Inc., USA”) a 95 °C durante 5 minutos, num processo chamado “soft bake” (tabela 2.1). Por fim, deixa-se repousar durante 10 minutos.

Tabela 2.1: “Datasheet” para os tempos de “soft bake” (adaptado de MicroChem, 2012).

Espessura Micrómetros	Tempos de "Soft bake"	
	(65°C) Minutos	(95°C) Minutos
25 - 40	0 - 3	5 - 6
45 - 80	0 - 3	6 - 9
85 - 110	5	10 - 20
115 - 150	5	20 - 30
160 - 225	7	30 - 45

Por vezes, e com o objectivo de otimizar o “soft bake”, é necessário colocar novamente a “wafer” na placa quente, no fim de ela já ter resfriado até à temperatura ambiente. Se por sua vez esta apresentar alguns “enrugamentos” quando colocada de volta aos 95 °C, é necessário deixar então mais alguns minutos a essa temperatura e consequentemente voltar a deixar arrefecer à temperatura ambiente. Esta rotina deve-se repetir até que não exista a formação desses “enrugamentos” por parte da “wafer”.

2.1.3 Exposição do SU-8 no alinhador de máscaras

Com a “wafer” já preparada, nomeadamente com a devida deposição do SU-8, procedemos agora à sua exposição no alinhador de máscaras (“MA6, Suss MicroTec, Germany”). Esta exposição é realizada com radiação ultra-violeta de comprimentos de onda entre os 350 nm e os 400 nm. Neste procedimento utilizaremos também um filtro “i-line”(“G180336, Suss MicroTec, Germany”), com o objectivo de criar uma banda estreita com o comprimento de onda de 365,5 nm. Este último é colocado no local próprio do alinhador de máscaras em modo CP (“content power”) com a devida protecção dos olhos, utilizando para esse efeito óculos protectores.

A exposição consiste em fazer passar radiação UV por uma máscara em crómio (“JD Photo-tools, UK”) previamente construída com todas as estruturas desejadas para a construção do chip (canais, “inlets”, “outlets”, etc.), incidindo sobre a “wafer” que, juntamente com o SU-8, vão receber toda essa energia. Ora, essa energia, num determinado tempo de exposição, vai possibilitar a marcação da máscara e, consequentemente, das estruturas do dispositivo de microfluídica, no SU-8 presente na “wafer”.

O tempo de exposição é calculado a partir da tabela 2.2 presente na “datasheet” do SU-8 consoante a espessura que desejamos para os canais no chip.

Tabela 2.2: “Datasheet” para a dose de exposição do SU-8 (adaptado de MicroChem, 2012).

Espessura Micrómetros	Energia de Exposição (dose) mJ/cm²
25 - 40	150 - 160
45 - 80	150 - 215
85 - 110	215 - 240
115 - 150	240 - 260
160 - 225	260 - 350

Como os canais têm uma dimensão de 20 μm de espessura, a dose de exposição utilizada vai ser de aproximadamente 145 mJ/cm². O tempo de exposição pode então ser calculado a partir deste valor de dose e da potência de exposição do alinhador de máscaras na altura da execução do processo (normalmente o valor ronda os 18,4 mW/cm²) a

partir da seguinte fórmula:

$$t = \frac{Dose}{Potência} \quad (2.1)$$

Neste caso concreto e considerando que a potência do alinhador de máscaras estaria no valor $18,4 \text{ mW/cm}^2$, o tempo de exposição seria de:

$$t = \frac{145 \text{ mJ/cm}^2}{18,4 \text{ mW/cm}^2} = 7,88 \text{ s} \quad (2.2)$$

Este valor de exposição é então arredondado para a unidade, ficando com um valor final de 8 segundos. Colocando, por fim, a máscara de crómio juntamente com a “wafer” no alinhador de máscaras (figura 2.5), vamos expor então o SU-8 à radiação UV durante os 8 segundos calculados.



Figura 2.5: Alinhador de máscaras.

Após a exposição ser concluída com sucesso, iremos realizar o “post bake” da “wafer” juntamente com o SU-8 já exposto.

Tabela 2.3: “Datasheet” para os tempos de “post bake”.

Espessura Micrómetros	Tempos de "Post bake"	
	(65°C) Minutos	(95°C) Minutos
25 - 40	1	5 - 6
45 - 80	1 - 2	6 - 7
85 - 110	2 - 5	8 - 10
115 - 150	5	10 - 12
160 - 225	5	12 - 15

A partir da tabela anterior verificamos que para as dimensões pretendidas o aquecimento da “wafer” na placa será de 1 minuto a 65 °C e posteriormente 5 minutos a 95 °C.

Após todos estes procedimentos teremos que inserir completamente a “wafer”, com o SU-8 já exposto e arrefecido à temperatura ambiente, no revelador para que a parte que não foi exposta se dissolva e para que obtenhamos apenas as estruturas gravadas pretendidas. Após totalmente coberta pelo revelador, o líquido estará em rotação constante a 500 rpm, com a utilização de um magneto próprio para o efeito, durante cerca de 4 minutos à temperatura ambiente, tal como indica a tabela 2.4.

Tabela 2.4: “Datasheet” para os tempos de revelação (adaptado de MicroChem, 2012).

Espessura	Tempos de revelação
Micrómetros	minutos
25 - 40	4 - 5
45 - 75	5 - 7
80 - 110	7 - 10
115 - 150	10 - 15
160 - 225	15 - 17

De referir que a meio do processo deve-se girar a “wafer”, que está totalmente coberta pelo revelador, aproximadamente 180°.

Após este primeiro processo de revelação do SU-8, vamos cobrir novamente a “wafer” num segundo revelador durante cerca de 1 minuto. No fim deste processo vamos limpar a “wafer” com isopropanol e secar com a pistola de azoto para verificar se esta contém traços/riscos brancos. Se esta apresentar esses traços brancos, voltamos a coloca-la no líquido revelador durante mais 1 minuto, limpando-a posteriormente com isopropanol e secando-a mais uma vez com a pistola de azoto. Este processo deve ser repetido até que os traços brancos não apareçam e que o SU-8 tenha apenas gravado as estruturas desejadas para a fabricação do dispositivo de microfluídica.

2.1.4 Produção de PDMS

O objectivo será então passar as estruturas gravadas no SU-8 presente na “wafer” de silício para o PDMS. No entanto, com a simples colocação do PDMS por cima da superfície de SU-8, será muito difícil remover no fim esse mesmo PDMS com os canais desenhados. É com o objectivo de existir uma boa separação dos dois materiais que é feita, primeiramente, uma silanização da superfície do SU-8. Silanização é a cobertura de uma superfície por meio de uma auto-relação com moléculas alcóxisilano organofuncionais. Alguns materiais podem ser silanizados porque contêm grupos hidroxilo que atacam e separam as ligações covalentes das moléculas alcóxisilano. O objectivo é formar ligações ao nível da interface entre os componentes minerais e componentes orgânicos.

Colocando uma pequena gota do composto químico silano junto com a “wafer” num exsicador em vácuo (figura 2.6) durante cerca de 1 hora, vamos possibilitar silanizar o SU-8.



Figura 2.6: Exsicador em vácuo com as amostras presentes no interior.

Enquanto o processo de silanização do SU-8 está em decurso, procedemos paralelamente à produção propriamente dita do PDMS. Este processo é simples e rápido e consiste na junção de polimerizador ao silicone PDMS numa proporção de 1:10, ou seja, se juntarmos 50 g de silicone PDMS devemos juntar 5 g de polimerizador. Esta solução é depois bem misturada e colocada no exsicador em vácuo durante 1 hora para remover as bolhas de ar.

Quando estes dois processos estiverem concluídos, ou seja, a silanização do SU-8 e a remoção das bolhas de ar do PDMS, juntamos o PDMS ao SU-8 numa caixa de petri, razoavelmente do mesmo tamanho da “wafer”, para obtermos uma camada de PDMS com cerca de 5 mm de altura. A caixa de petri é colocada depois também no exsicador em vácuo durante mais 1 hora, na posição mais horizontal possível.

Por fim, a amostra é colocada no forno a 110 °C durante 30 minutos para obtermos um PDMS firme (polimerização). Extraíndo o mesmo da “wafer” verificamos que este contém toda a estrutura gravada na base que estava em contacto com o SU-8, sendo possível efectuar uma respectiva medição da dimensão dos canais pela observação em microscópio.

2.1.5 Molde intermédio em resina epóxi

Com o objectivo de produzir grandes quantidades de dispositivos de microfluídica, nomeadamente PDMS com os respectivos canais, foi introduzida uma técnica de processamento de uma resina epóxi como molde intermédio. Após a realização de todos os protocolos anteriormente referidos, iremos obter no fim apenas uma produção de PDMS e uma “wafer” com o molde de SU-8 ainda utilizável, se possível, para conseqüentes produções. No entanto, o molde de SU-8 é frágil e, para grandes produções, é realizado este procedimento de substituição de molde para um material mais resistente.

Esta resina, de padrão idêntico ao SU-8, é colocada sobre o molde de PDMS anteriormente produzido, numa camada uniforme de aproximadamente 2 mm de espessura. A extracção das bolhas de ar é posteriormente realizada mais uma vez no exsiccador em vácuo durante uma semana, seguindo-se a cura num forno a 120 °C durante cerca de 40 minutos. Por fim, quando a resina se encontrar no estado sólido, é extraída do PDMS e passa assim a ser utilizada como molde principal para a produção de novo PDMS, através do mesmo protocolo descrito anteriormente aquando da produção a partir do SU-8 só que desta vez utilizamos esta epóxi mais resistente.

Este processo facilita claramente a produção em grande escala de chips operacionais. No entanto o processo de remoção de bolhas de ar desta resina leva demasiado tempo, pelo que existem outros processos de produção de moldes mais facilmente executáveis, como é o caso da utilização de PDMS como próprio molde para a sua auto-produção.

2.1.6 Molde intermédio em PDMS

A utilização de moldes em PDMS para produção em grande escala de chips de microfluídica é um método simples e rápido comparado com os tempos de execução da produção de resina epóxi.

Depois de produzirmos o PDMS original contendo todas as estruturas desejadas, ou seja, elaborado a partir da "wafer" de SU-8 (processo acima descrito), vamos proceder à criação de um molde de PDMS a partir desse mesmo original. Este processo é simples, no entanto tem algumas particularidades especiais a ter conta, nomeadamente a utilização de tratamento da superfície em plasma de oxigénio.

O tratamento em câmara de plasma ("Plasma treatment, BuckTechnologien, Germany", presente na figura 2.7) tem como objectivo principal preparar determinadas superfícies.



Figura 2.7: Câmara de plasma.

Esta preparação pode ter várias finalidades, nomeadamente limpeza com plasma, decapagem ou activação de superfícies. A finalidade deste tratamento, neste contexto, é poder facilmente separar, no final de todo este processo, os dois PDMS (original e molde ou molde e outras réplicas). Assim, o tratamento em plasma irá substituir os grupos CH_3 da superfície do PDMS por grupos hidroxil OH , possibilitando a formação de pontes de hidrogénio ou ligações covalentes para posterior silanização.

A câmara do instrumento de tratamento com plasma tem de dimensões $40 \times 35 \times 50 \text{ cm}^3$ onde será inserido o PDMS original com a superfície onde estão presentes os canais, virada para cima. O protocolo utilizado para este tratamento baseia-se na utilização de plasma de oxigénio durante 300 segundos com uma potência de 104 W a uma pressão inicial de 13 Pa e com um tempo de exposição de 150 segundos. De referir que se deve limpar previamente, com acetona e isopropanol, a amostra de PDMS a inserir na câmara para o respectivo tratamento.

Após tratarmos em câmara de plasma a superfície do PDMS onde estão presentes os microcanais, segue-se novamente o tratamento de silanização da amostra. O PDMS é colocado no exsiccador em vácuo juntamente com uma gota de silano (composto: tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrooctyl-1-trichlorosilane) e deixado durante uma noite a realizar o tratamento, para que se formem as ligações covalentes $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ à superfície com o objectivo de impossibilitar outras ligações com outros materiais, nomeadamente com o PDMS que seja colocado posteriormente.

No final dos dois tratamentos (plasma de oxigénio e silanização) estamos aptos a produzir novo PDMS utilizando o primeiro como molde. Como já referido anteriormente, a produção deste composto é feita mediante a junção de polimerizador ao silicone PDMS numa proporção de 1:10. Segue-se novamente o mesmo protocolo para remoção de bolhas de ar que tenham surgido e, por fim, cobre-se o PDMS original com a nova amostra. O conjunto é colocado a aquecer no forno a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ durante cerca de 1 hora até ficar curado.

Verificamos que no fim de todo este processo, as duas camadas de PDMS juntas vão-se descolar facilmente, obtendo a mesma camada original com os canais gravados e a camada de molde com os canais salientes que servirá posteriormente, utilizando novamente todo o protocolo de tratamento da superfície em plasma de oxigénio e todo o protocolo de silanização, para a produção em grande escala de chips de microfluídica com este formato específico.

2.1.7 Caracterização dos eléctrodos

Juntamente com os microcanais de $20 \text{ }\mu\text{m}$ inseridos no PDMS, os eléctrodos são uma parte essencial para a detecção e caracterização das células parasitadas. A sua função é fundamental pois é a partir deles que as ondas de tensão AC serão injectadas no fluxo laminar da amostra em estudo e com base neles recebemos a informação resultante. Mais

uma vez este processo requer o manuseamento de sensíveis instrumentos de laboratório, nomeadamente o alinhador de máscaras, já referido anteriormente, e o “e-beam” ou canhão de electrões (figura 2.8).

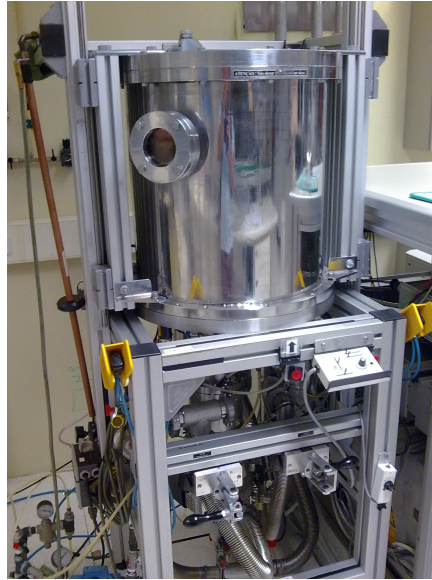


Figura 2.8: Canhão de electrões ou “e-beam”.

É a partir deste último que os eléctrodos vão ser produzidos e expostos. A sua função consiste essencialmente na prática de evaporação assistida por canhão de electrões. A evaporação assistida em vácuo por canhão de electrões tem por base de funcionamento, a focagem ou emissão de um feixe de electrões no evaporador onde contém uma substância predefinida (substância utilizada na fabricação dos eléctrodos). Como o feixe está apontado na direcção do alvo, havendo transformação de energia cinética em energia térmica, sendo deste modo aquecido até ao seu ponto de fusão. Por sua vez será evaporado e depositado numa base (“wafer”), previamente preparada no alinhador de máscaras, com as estruturas dos eléctrodos. Este processo beneficia por ter elevada velocidade de crescimento da camada a depositar e baixa contaminação, já que o feixe de electrões é praticamente o único interveniente em contacto com a substância a evaporar (Richard, 1988; Yang, 1988; Sze, 1988).

O processo começa essencialmente pela limpeza de amostras de vidro, as quais vão ser utilizadas tanto como base do nosso chip (sendo que superiormente estará selado ao PDMS) como também para serem depositados os eléctrodos. A limpeza é realizada primeiramente com a passagem do vidro em detergente próprio, seguindo-se um processo de 10 minutos em ultra-sons com uma cobertura total em acetona, depois mais 10 minutos de ultra-sons em isopropanol e, por fim, uma limpeza em água ultra pura e secagem com jacto de azoto. A remoção da humidade adsorvida na superfície do vidro é realizada sobre uma placa de aquecimento a 180 °C durante 10 minutos, seguindo-se um arrefecimento de outros tantos.

Com as placas de vidro já preparadas procedeu-se à colocação de um fotorresiste positivo. Ao contrário do fotorresiste negativo já utilizado anteriormente, este tem uma característica totalmente oposta, ou seja, a parte que é exposta à luz torna-se solúvel ao revelador e a parte que não foi exposta é dissolvida. O fotorresiste positivo AZ6612 foi então colocado na amostra de vidro e procedeu-se ao “spin coat” da mesma, num programa com uma primeira rotação de 10 segundos a 3000 rpm e uma segunda rotação de 20 segundos a 4000 rpm. Tal como nos outros protocolos anteriores seguiu-se o “soft bake” do fotorresiste numa placa de aquecimento a 110 °C durante 1 minuto e 15 segundos. Após novo repouso de 10 minutos por parte das amostras, estas foram colocadas em exposição no alinhador de máscaras. A máscara de crómio com as estruturas dos eléctrodos (figura 2.9) foi previamente construída e colocada no alinhador.

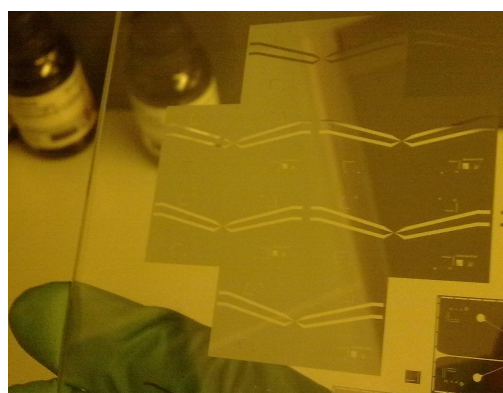


Figura 2.9: Máscara de crómio dos eléctrodos.

Cada amostra de vidro foi exposta, através da máscara, a uma luz ultra-violeta com uma potência de 275 mW/cm² durante 3 segundos e meio. A posterior revelação é realizada em líquido revelador AZ726 durante aproximadamente 30 segundos, até que o fotorresiste positivo exposto seja removido completamente. Passando as amostras de vidro por água durante cerca de 20 segundos obtêm-se as estruturas dos contornos dos eléctrodos. Estes contornos vão ser utilizados no próximo procedimento, correspondente à deposição dos eléctrodos, a partir da evaporação assistida por canhão de electrões.

Os vidros já com os contornos dos eléctrodos definidos foram colocados no canhão de electrões “e-beam” onde vão servir de base, ou seja, no local onde vão ser depositados os materiais evaporados pelo feixe de electrões. Os materiais utilizados na deposição dos eléctrodos foram primeiramente o titânio (²²Ti), que vai ter uma função de melhoramento da aderência dos eléctrodos ao vidro e, sobre este, foi utilizada uma camada de ouro (⁷⁹Au). A primeira camada de titânio evaporada e depositada nas placas de vidro tem uma espessura de 20 nm enquanto que a camada de ouro depositada tem uma espessura de 200 nm, sendo esta última o principal constituinte dos eléctrodos em si.

Após a exposição ao “e-beam”, as placas de vidro, apresentar-se-ão todas cobertas por uma camada dourada, ou seja, o ouro depositado. No entanto, após o canhão de electrões vemos que a camada cobriu todos os espaços dos vidros, sendo que só pretendemos obter

a forma dos eléctrodos da máscara inicial. Para isso, procedemos à técnica de “lift-off”.

A técnica de “lift-off” é um método para criar estruturas ou padrões, como por exemplo os eléctrodos, utilizando para isso um material que servirá de base (neste exemplo é utilizado o vidro) a partir de um material intermédio com os respectivos moldes impressos, que será sacrificado (fotorresiste) durante o processo. A figura seguinte apresenta o esquema completo de todo o método:

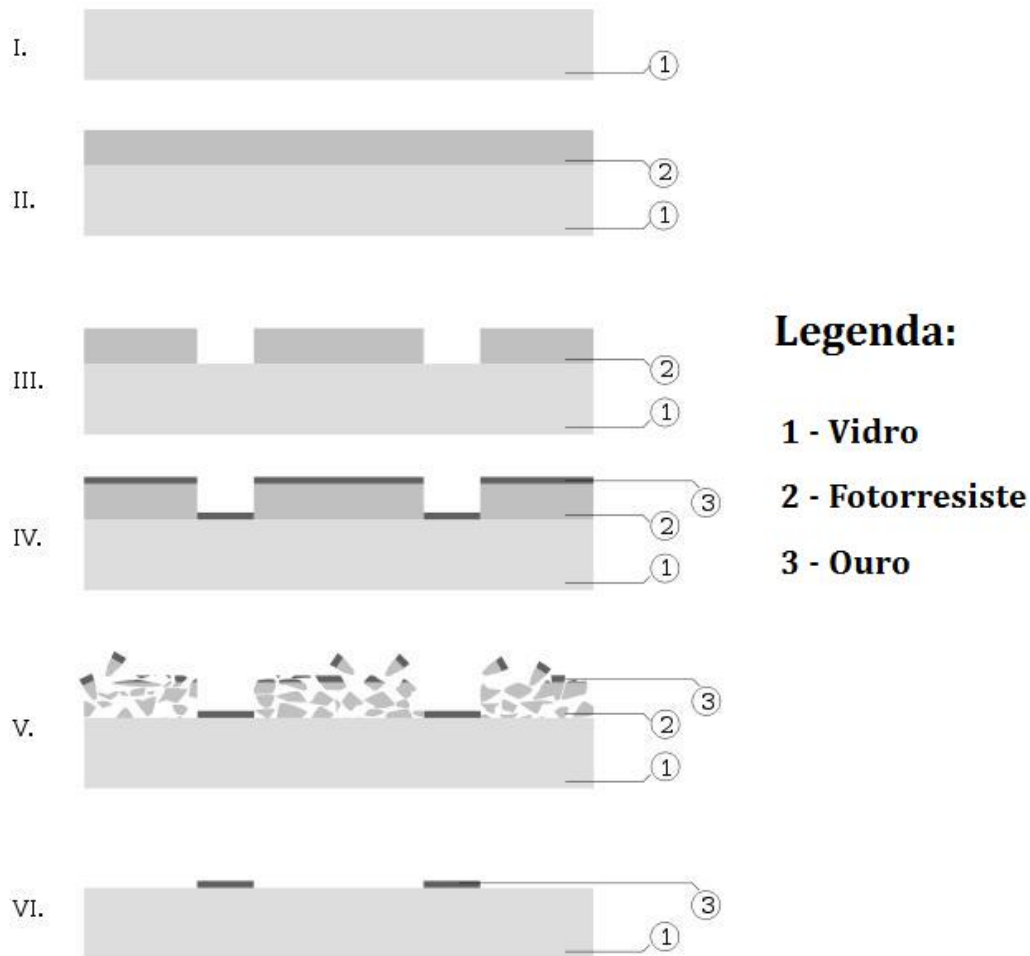


Figura 2.10: Método de obtenção dos eléctrodos pelo processo de “lift-off” (adaptado de Wolf e Tauber, 2005)

Este último esquema apresentado representa um resumo de todos os passos necessários à produção dos eléctrodos. Os primeiros 4 caracterizam essencialmente os métodos anteriormente referidos de limpeza das amostras de vidro (I), deposição do fotorresista positivo (II), exposição no alinhador de máscaras e consequente revelação (III) e, por fim, deposição do titânio e do ouro no canhão de electrões (IV).

No ponto V verificamos que apenas nas zonas onde o fotorresista não se encontra depositado é onde o ouro irá permanecer, devido pois à destruição desse molde intermédio.

A aderência da camada de titânio e ouro será mais forte na ligação com o vidro sem o fotorresista. O processo de remoção do mesmo é feito a partir da colocação do respectivo vidro em acetona e conseqüentemente em ultra-sons até que apenas os eléctrodos estejam presentes. Quando estes forem os únicos visíveis, retiram-se as amostras da acetona e colocam-se em álcool isopropílico para limpar a acetona em excesso. Por fim passam-se as amostras por água e secam-se com a pistola de azoto.

Por cada amostra de vidro realizada, iremos obter 6 eléctrodos feitos em ouro (a condutividade destes pode ser medida a partir de um multímetro). As 6 bases para os nossos chips podem ser conseqüentemente cortadas a partir de uma máquina de corte em diamante ("Karl Suss HR100"—figura 2.11).



Figura 2.11: Máquina de corte em diamante.

2.1.8 Alinhamento e selagem do chip através de plasma de oxigénio

Após termos realizado todos os procedimentos de microfabricação da parte superior (PDMS com as estruturas) e da parte inferior (eléctrodos em titânio e ouro) do chip, procedeu-se à selagem das duas partes. A selagem é um processo um pouco complexo na medida em que se tem de alinhar estruturas de dimensões muito pequenas, na ordem dos 20 μm .

As estruturas dos moldes de PDMS foram previamente pensadas para colocação dos eléctrodos no respectivo canal central por onde vão passar as células. Assim, as estruturas já apresentam uma zona de detecção eléctrica (figura 2.12) constituída por dois pares de pequenos canais de 100 μm de comprimento por 20 μm de largura, perpendiculares ao canal central, onde vão ser inseridos os respectivos eléctrodos.

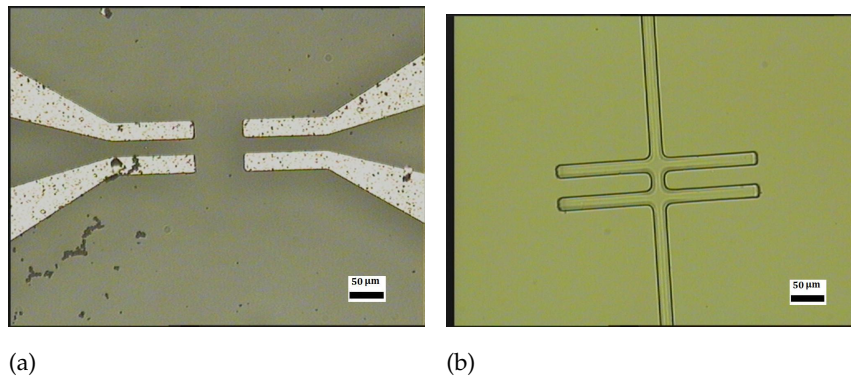


Figura 2.12: (a) Vista ao microscópio dos eléctrodos. (b) Vista ao microscópio da zona de alinhamento do PDMS para caracterização eléctrica.

Este método de “eléctrodos líquidos”, ou seja, estarem directamente colocados em contacto com o meio líquido que se encontra no canal central por onde as células passarão, apresenta vantagens em relação à colocação destes a uma certa distância do canal. Quando uma diferença de potencial é aplicada ao par de eléctrodos, um campo eléctrico é produzido e a corrente flui a partir do primeiro eléctrodo metálico, passando através dos pequenos canais de alinhamento e do canal central, até ao segundo eléctrodo metálico (figura 2.13). O caminho da corrente é definido pela própria geometria desenhada. O facto de disporem desta geometria específica possibilita a entrada de um campo eléctrico no canal central de uma forma aproximadamente equipotencial (Damierre, 2008; Wang et al., 2007; Renaud et al., 2006). Esta distribuição homogénea dos potenciais dos “eléctrodos líquidos” é uma consequência da geometria e forma dos pequenos canais de entrada ou de alinhamento. A inexistência desses pequenos canais faria com que o campo tivesse que atravessar as paredes do canal principal existindo uma queda no potencial aplicado.

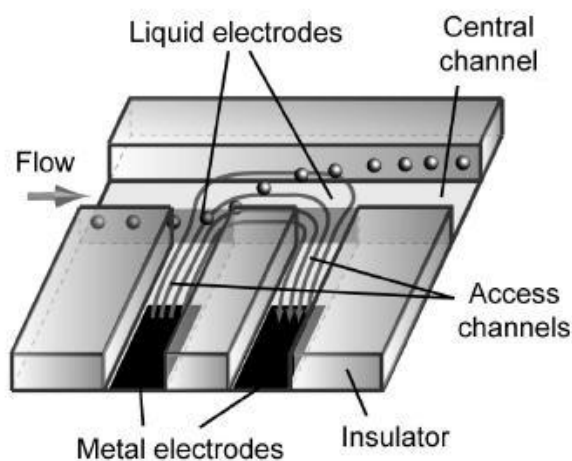


Figura 2.13: Esquema dos “eléctrodos líquidos” (adaptado de Demierre, 2008).

Com o objectivo de obter um alinhamento correcto entre o PDMS e o vidro com os eléctrodos, foi utilizado um microalinhador com 3 graus de liberdade (Kima et al., 2005),

possibilitando movimentos no eixo do X, Y e θ . Este alinhamento vai ser subsequente a mais um tratamento em câmara de plasma que vai activar as duas superfícies que vão ser ligadas. Uma contrariedade deste procedimento é o facto da activação ser muito rápida e as ligações comecem-se a formar num curto espaço de tempo. De forma a evitarmos esta contrariedade é colocada água entre as duas superfícies no sentido de permitir por um lado o aumento do tempo de execução do alinhamento mantendo a activação das mesmas por mais tempo (Duffy et al., 1998) e por outro permitir uma diminuição do atrito entre as superfícies para facilitar o posicionamento desejado.

O microalinhador é então fixo na platina de um microscópio, utilizando uma lente com uma ampliação de 100x, e o vidro é fixado na parte superior móvel do microalinhador. Por último é colocado o PDMS sobre o vidro que, por sua vez, também é fixo a partir de uma pinça presa à base do microscópio, tal como se pode observar no esquema da figura seguinte.

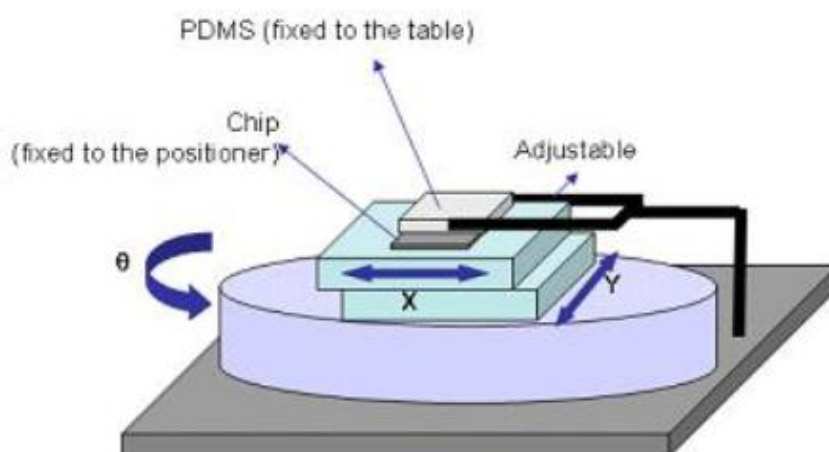


Figura 2.14: Esquema do método de alinhamento do PDMS à base de vidro com os eléctrodos (adaptado de Loureiro, 2011).

Através deste método o alinhamento é realizado entre os eléctrodos e o PDMS a partir dos locais de detecção eléctrica e a partir também de certos pontos específicos de alinhamento em vários locais do chip. Este processo demora entre 5 a 6 horas até que a água evapore e que as ligações entre as duas superfícies se formem completamente. Concluído este processo iremos obter um dispositivo de microfluídica operacional para realizarmos os nossos testes experimentais.

2.2 Espectroscopia de Impedância

Também conhecida por espectroscopia dieléctrica, a espectroscopia de impedância é uma técnica não invasiva de caracterização das propriedades eléctricas de materiais.

Cada célula tem um potencial eléctrico ou tensão eléctrica associada à configuração das membranas, sendo que o interior celular representa a resistência desta, muito devido

à baixa condutividade do citoplasma. Quando um ião atravessa a célula, o potencial da membrana é modificado, gerando correntes eléctricas de diferentes magnitudes e diferentes padrões. Este fenómeno pode ser explorado para obter resultados acerca da actividade eléctrica de uma célula viva. Como o balanço iónico e o balanço das cargas eléctricas entre o meio extra-celular e o citoplasma é realizado através da membrana plasmática, em caso de variação ou distúrbios nesse balanço, este poderá ser determinado a partir das cargas eléctricas dos componentes da célula (proteínas, moléculas, etc.). Estas vão ser indicativas de qualquer diferença bio-electroquímica que pode estar relacionada com a viabilidade da célula.

De uma maneira geral, as medidas eléctricas de avaliação do comportamento electroquímico de materiais são normalmente obtidas com a aplicação de um estímulo (uma tensão ou corrente conhecida) a dois eléctrodos paralelos que, com a passagem das células biológicas em estudo entre esses eléctrodos (figura 2.15), iremos obter uma resposta (uma corrente ou tensão resultante). É importante assumir que as condições do sistema compreendido pelo eléctrodo e o material em observação devem ser constantes no tempo pois este é um condicionamento básico da espectroscopia de impedância para a determinação das características da amostra biológica.

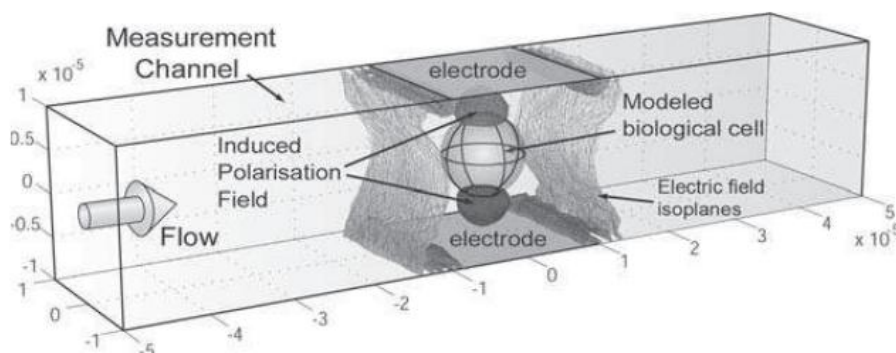


Figura 2.15: Técnica de espectroscopia de impedância aplicada a um microcanal com um determinado fluxo de amostra biológica (adaptado de Gawad et al., 2008).

Estudos realizados previamente demonstraram que uma célula normal possui uma alta impedância devido à presença dos seus organelos e DNA no citoplasma e integridade da membrana. O aumento da superfície e do conteúdo celular devido ao crescimento induz um aumento da resistência e capacitância. Já uma célula com problemas devido a infecção ou senescência, apresenta uma impedância mais baixa devido ao excesso de sódio e de cargas negativas no seu interior que causará uma diminuição do potencial da membrana (Fricke et al., 1926).

Existem vários tipos de estímulos eléctricos que podem ser utilizados em espectroscopia de impedância. O mais comum, ou o procedimento padrão, baseia-se na aplicação entre eléctrodos de um sinal sinusoidal de tensão alternada e medir, em função da

frequência, as partes real e imaginária da impedância complexa (do espaço entre eléctrodos, onde se encontra a célula alvo) a partir da determinação da fase e amplitude do sinal resultante. Os gráficos da parte real e da parte imaginária da impedância em função da frequência compõem o espectro de impedância para aquele dispositivo formado com a amostra do material biológico e os dois eléctrodos. Com os equipamentos comerciais disponíveis, as medidas podem ser realizadas numa faixa de frequências entre os 10 μHz e 32 MHz que, consoante a gama aplicada, possibilita-nos obter diferentes propriedades celulares, como é possível verificar nas próximas figuras.

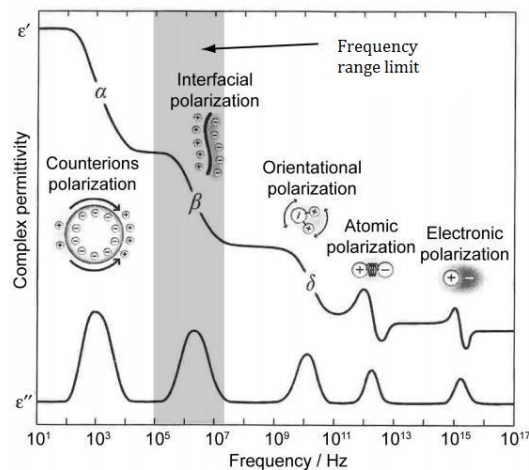


Figura 2.16: Gama limite de frequências (adaptado de Demierre, 2008).

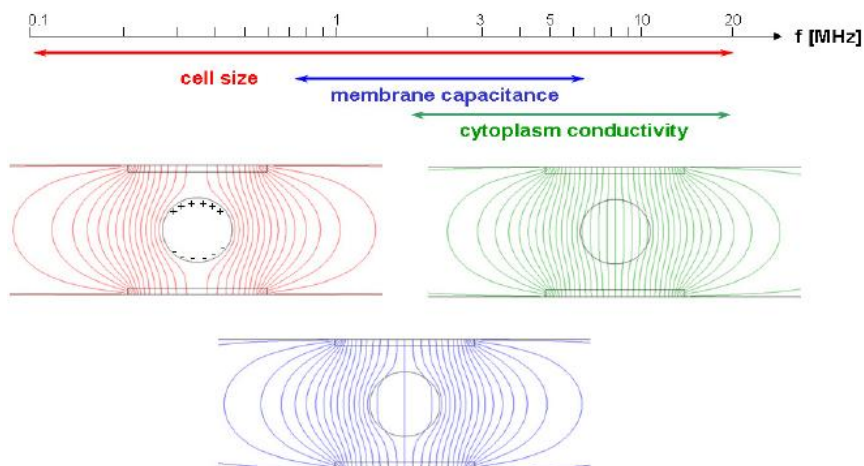


Figura 2.17: Propriedades das diferentes gamas de frequências aplicadas a uma célula (adaptado de Kim e Ligler, 2010).

A baixas-frequências, a membrana celular oferece uma elevada barreira ao fluxo de corrente. A célula é essencialmente não-condutora e a resposta ao estímulo, vindo dos eléctrodos, indica-nos apenas o volume ou tamanho celular. As partículas com o mesmo

volume mas com propriedades dieléctricas diferentes não vão ser discriminadas.

A frequências intermédias, a capacitância vai diminuir na mesma grandeza de decréscimo da polarização da membrana. Este decréscimo da capacitância devido ao decréscimo da polarização da membrana é conhecido pela dispersão- β ou relaxamento dieléctrico, que pode ser facilmente medido. A frequência onde o decréscimo está meio completo, é a frequência crítica. Medidas nesta gama de frequências dão-nos informação acerca das propriedades da membrana plasmática.

A altas-frequências, as membranas são minimamente polarizadas. Estas, deixam de ser uma barreira para o fluxo de corrente acima da frequência crítica (gama limite de frequências) e, medidas realizadas nesta gama, dão-nos informação acerca das estruturas heterogéneas e propriedades dieléctricas do interior celular.

Para o nosso estudo iremos utilizar então uma gama de frequências entre os 100 Hz e os 10 MHz pois a partir das observações anteriores e de estudos já realizados em eritrócitos bovinos (Küttel et al., 2007) concluímos que é nesta gama onde é possível realizar o estudo celular proposto e onde é possível chegar às propriedades celulares intrínsecas desejadas.

2.2.1 Aplicação em amostras sem utilização de chips de microfluídica

De forma a realizar alguns ensaios preliminares de caracterização do complexo sistema instrumental de espectroscopia de impedância a testar, foram realizadas algumas simulações fora do chip de microfluídica com o objectivo de estabelecer valores de impedância possíveis a ser aplicados em alguns circuitos eléctricos e consequentemente a posteriori aplicados para a medição das amostras biológicas.

Impedância eléctrica é a medida da oposição que um circuito apresenta a passagem de uma corrente eléctrica quando uma determinada tensão é aplicada. De uma maneira geral, a impedância é a relação entre o valor eficaz da diferença de potencial entre dois pontos de um circuito e o valor eficaz da corrente eléctrica resultante, ou seja, é a carga resistiva total de um circuito AC (corrente alternada). Esta, é expressa como um número complexo, possuindo uma parte real e uma parte imaginária.

A impedância estende o conceito de resistência a circuitos AC, possuindo os parâmetros magnitude e fase, ao contrário do conceito da resistência em DC (corrente contínua) que apenas possui magnitude. Foi necessária a introdução deste conceito no âmbito de circuitos AC pois existem outros mecanismos que impedem a circulação de corrente além da normal resistência dos circuitos DC. A impedância causada pela indução de tensões nos condutores auto-induzidos pelos campos magnéticos das correntes (indutância) e pelo armazenamento de carga electrostática induzida por tensões entre os condutores (capacitância) é referida como reactância e forma a parte imaginária da estrutura complexa. A parte real da mesma corresponde então à simples resistência (Alexander e Sadiqu, 2006; Lewis e Olbricht, 2008).

2.2.1.1 Utilização de circuito eléctrico equivalente para simulação de amostras biológicas

Primeiramente, e no sentido de podermos simular a impedância de líquidos, a nossa amostra foi substituída por um circuito equivalente constituído unicamente por uma associação de resistências e condensadores (figura 2.18). A partir deste ponto, um potencial eléctrico AC foi injectado no início do circuito e registou-se uma resposta por parte do mesmo. Este procedimento foi realizado para várias frequências que possibilitou a construção de uma tabela com as diferentes fases e as diferentes amplitudes das ondas. Consequentemente construiu-se um gráfico de impedância contendo a parte real e a parte imaginária. Este gráfico é apresentado em função da frequência injectada, para assim obtermos a impedância correspondente a este circuito (Chinaglia et al., 2008).

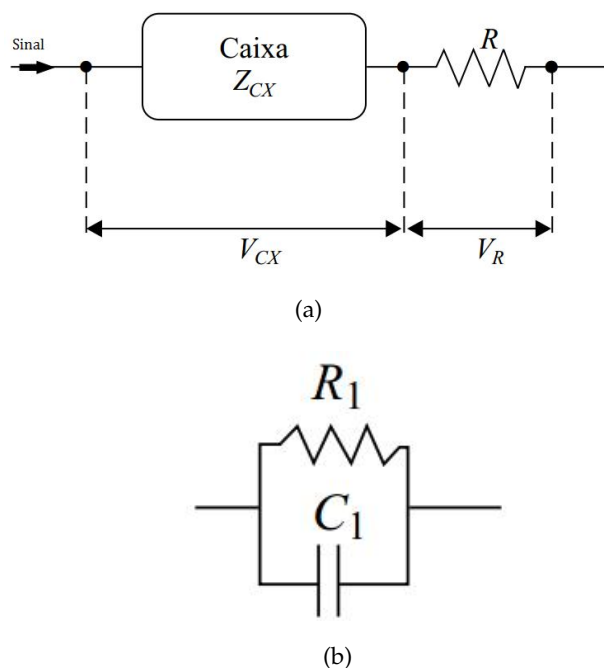


Figura 2.18: (a) Esquema do método teste de cálculo da impedância de uma associação de resistências e condensadores representado por uma caixa. (b) Associação objectivo presente na caixa (adaptado de Chinaglia et al., 2008).

O objectivo seria então calcular a impedância Z_{cx} de uma associação em paralelo de uma resistência com um condensador numa “caixa” que simula, por exemplo, uma amostra biológica. Para isso, injecta-se um sinal à entrada do circuito e examina-se a tensão $V_{cx}(t)$ entre os terminais da caixa e a tensão $V_r(t)$ entre os terminais da resistência. Como a tensão V_r está em fase com a corrente que atravessa tanto a resistência R como a impedância Z_{cx} em série, a diferença de fase entre a tensão V_{cx} na caixa e a corrente que a atravessa pode ser obtida a partir dos gráficos associados a $V_r(t)$ e $V_{cx}(t)$, esboçados na figura 2.19.

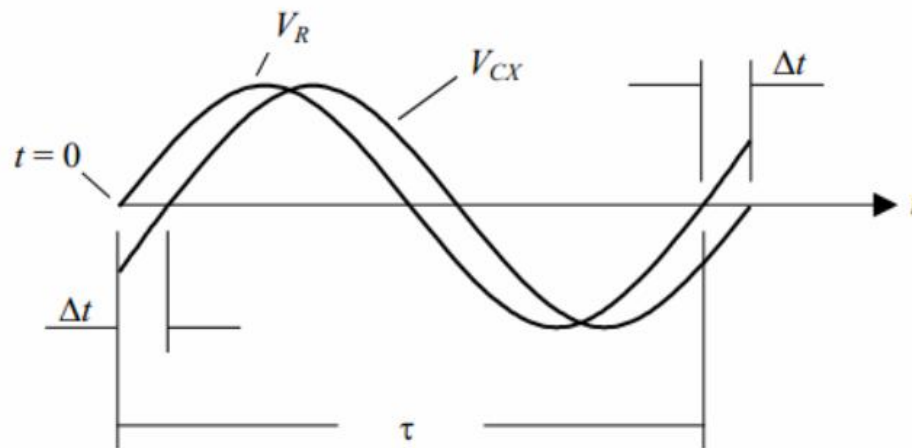


Figura 2.19: Representação das duas ondas sinusoidais desfasadas (adaptado de China-
glia et al., 2008).

Por fim, para determinação do espectro de impedância da caixa, é necessário determinar a impedância complexa da associação no interior da mesma. A partir da equação dessa impedância (equação 2.3) e da lei de Ohm (equação 2.4), iremos obter a equação desejada (equação 2.5) que nos possibilitará elaborar todos os cálculos necessários à obtenção do gráfico complexo da impedância da correspondente associação:

$$Z^* = R + j\omega L + \frac{1}{j\omega C} = R + j(\omega L - \frac{1}{\omega C}) = R + j(X_L - X_C) = Z \exp j\phi \quad (2.3)$$

$$V = ZI \quad (2.4)$$

$$Z_{cx}^* = Z_{cx} \exp j\phi = \frac{V_{cx}}{I} (\cos \phi + j \sin \phi) = R \frac{V_{cx}}{V_R} (\cos \phi + j \sin \phi) \quad (2.5)$$

Estes testes foram primeiramente realizados no software MULTISIM de simulação de circuitos eléctricos e consequentemente realizados em laboratório mediante a utilização de placas de montagem electrónica (“breadboard”), geradores de funções e osciloscópio digital.

2.2.1.2 Testes com amostras biológicas em eléctrodos exteriores

Com o objectivo de realizar testes preliminares de impedância em líquidos, ainda sem a utilização dos dispositivos de microfluídica, procedeu-se à obtenção dos resultados de espectroscopia de impedância a partir dos eléctrodos presentes no canal aberto do chip (sem fechar o canal com a peça superior de PDMS - figura 2.20). Esses eléctrodos, inseridos na camada fina de vidro, serão a base para a medição da impedância de uma amostra biológica.

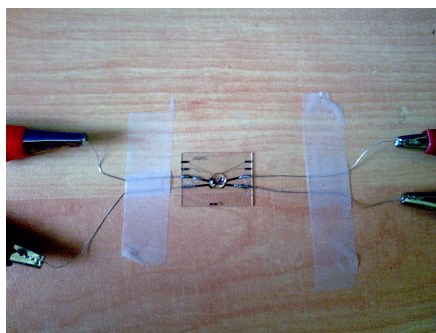


Figura 2.20: Eléctrodos com a amostra biológica.

A técnica utilizada para o cálculo da impedância consiste na aplicação de um sinal sinusoidal (onda de tensão AC), com uma determinada tensão e de frequência variável, entre os eléctrodos e efectuar uma medição directa a partir do osciloscópio de duas entradas de sinal após a onda resultante ter sido amplificada. O diagrama e esquema deste método são apresentados seguidamente.

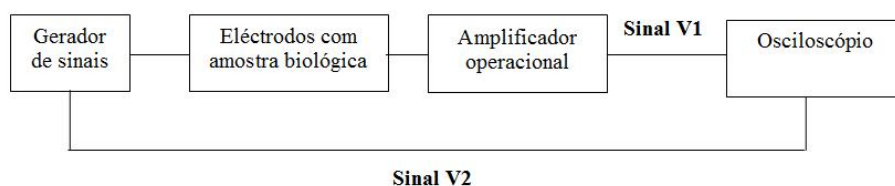
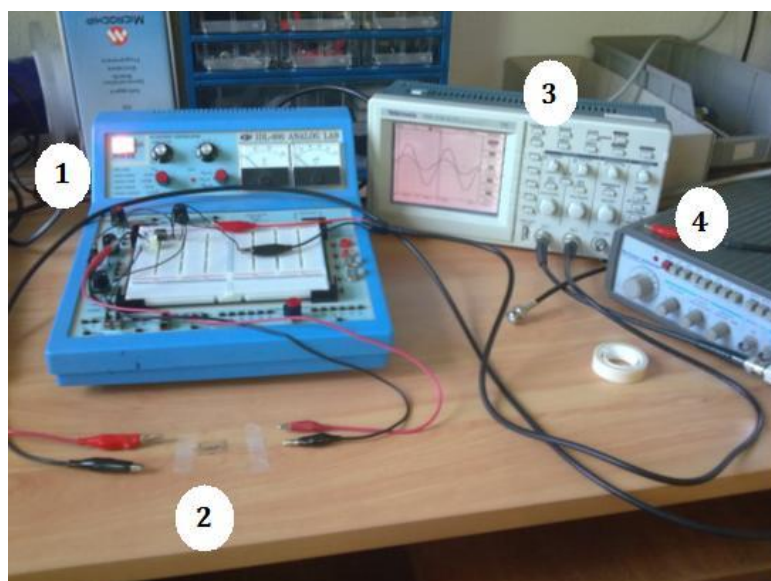


Figura 2.21: Diagrama do método de obtenção dos resultados de impedância de uma amostra biológica a partir de eléctrodos exteriores sem utilização de chip.



Legenda:

- 1-Amplificador Operacional;
- 2-Eléctrodos com amostra;
- 3-Osciloscópio;
- 4-Gerador de sinais.

Figura 2.22: Esquema representativo do diagrama do método de obtenção dos resultados de impedância.

O primeiro sinal injectado no osciloscópio (sinal V2) é aquele que é ao mesmo tempo injectado nos eléctrodos. O segundo sinal é aquele que é transformado com a passagem pela amostra biológica e pelo amplificador operacional, que irá realizar a diferença entre as duas correntes obtidas à saída dos pares de eléctrodos, amplificando também o sinal (sinal V1). Passando essa corrente depois por uma resistência de 1 k Ω , vamos então obter duas ondas sinusoidais desfasadas de ϕ e com amplitudes diferentes (figura 2.23).

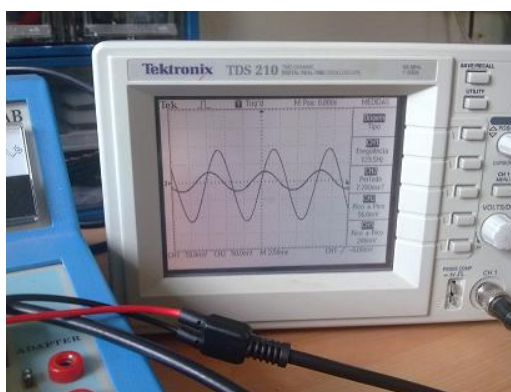


Figura 2.23: Osciloscópio laboratorial de dois canais de entrada de sinal onde foi possível observar as ondas resultantes.

A partir do osciloscópio, foram retirados todos os dados necessários ao cálculo das componentes real e imaginária da impedância, nomeadamente as amplitudes das ondas V1 e V2, o período T e a fase ϕ .

Este procedimento foi repetido para várias frequências, as que foram manualmente modificadas directamente no gerador de sinais.

Com todos estes dados construíram-se os gráficos da impedância, para várias substâncias-teste medidas, a partir das equações seguintes:

$$|Z| = R \frac{|V1|}{|V2|} \quad (2.6)$$

$$Z' = |Z| \cos \phi \quad (2.7)$$

$$Z'' = |Z| \sin \phi \quad (2.8)$$

$$\phi = \frac{2\pi \Delta t}{T} \quad (2.9)$$

De referir também que o amplificador operacional utilizado tem como referência INA129 e o seu esquema tem o seguinte formato:

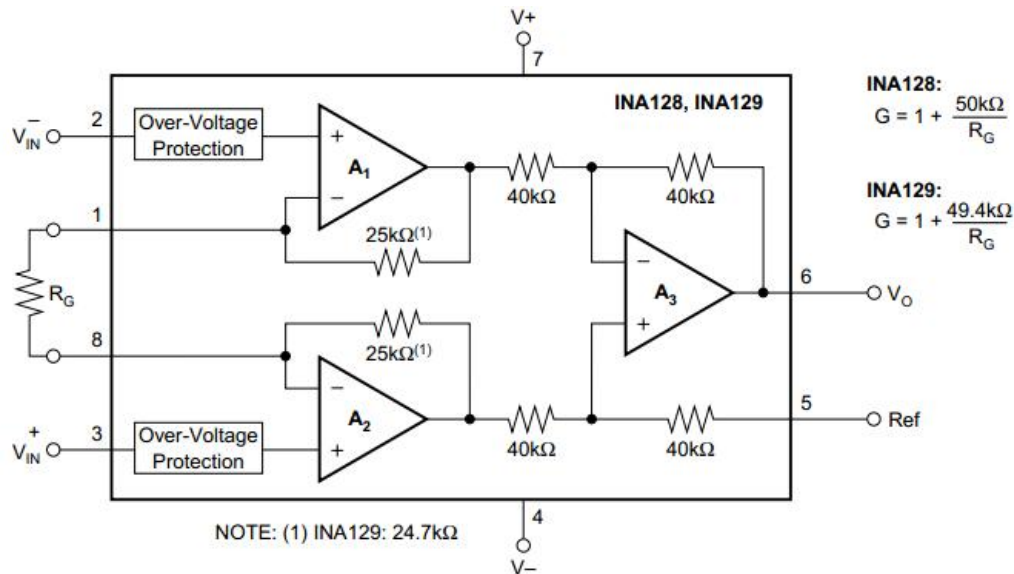


Figura 2.24: Esquema do amplificador operacional INA129 (adaptado de Texas Instruments, 2012).

Após discussão da respectiva dissertação, chegou-se à conclusão que este amplificador não seria o mais indicado para a obtenção dos resultados de impedância pretendidos. A substituição deste por dois amplificadores de transimpedância que possibilitariam a conversão corrente-tensão e posteriormente a inserção do sinal resultante num outro amplificador diferencial iria produzir uma melhor possibilidade de leitura da impedância da amostra em estudo. Uma outra opção seria a introdução de duas resistências imediatamente antes da inserção do sinal no amplificador INA129 para realizar a respectiva queda de tensão nas resistências e evitar essa mesma queda no amplificador que não está preparado para tal. Uma pequena nota a acrescentar será o facto da necessidade de modificação da colocação da amostra em estudo junto dos eléctrodos. Com o objectivo de aferirmos os resultados, a amostra deverá ser colocado apenas num par de eléctrodos opostos com o intuito de utilizar o restante par como referência para a realização da diferença do sinal a partir do amplificador diferencial. Estes pontos referidos seriam possibilidades para realização de trabalho futuro acerca deste tema.

2.2.2 Técnicas de aplicação a amostras para utilização em chips de microfluídica

2.2.2.1 "AC Discrete Frequency System"

A técnica mais largamente descrita na literatura, considerado também padrão de espectroscopia de impedância aplicada a amostras biológicas, com recurso a utilização de dispositivos de microfluídica, e que permite obter bons resultados na identificação de células parasitadas, é a "AC Discrete Frequency System" (figura 2.25).

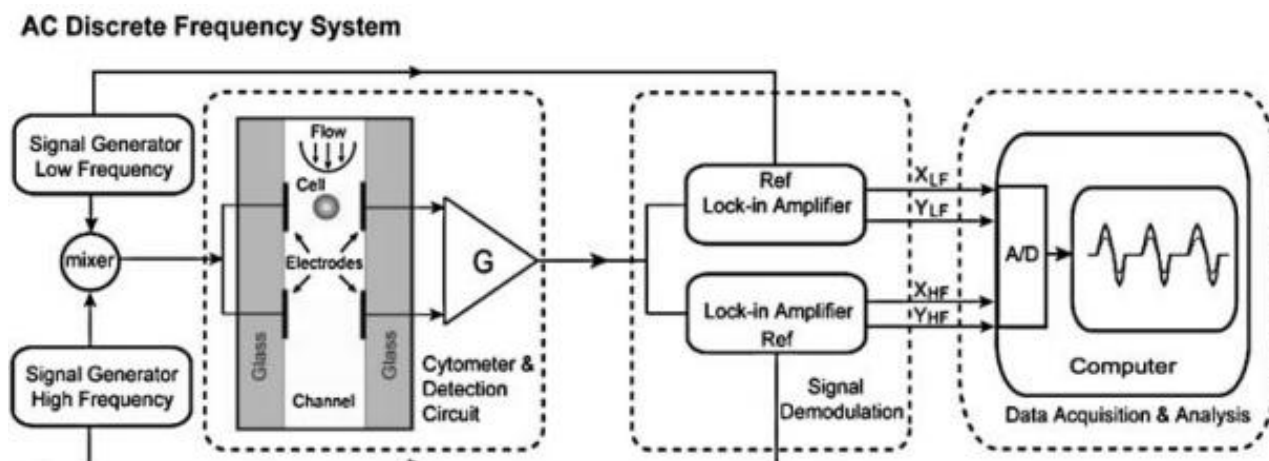


Figura 2.25: Esquema da técnica “AC Discrete Frequency System” (adaptado de Sun et al., 2008).

Este método consiste na soma de dois sinais, um de tensão AC de baixa (≈ 85 kHz) e outro de alta-frequência ($\approx 8,7$ MHz) e simultaneamente aplicada ao par de eléctrodos (figura 2.26) presentes no interior do chip de microfluidica (Sun et al., 2008; Gawad et al., 2008).

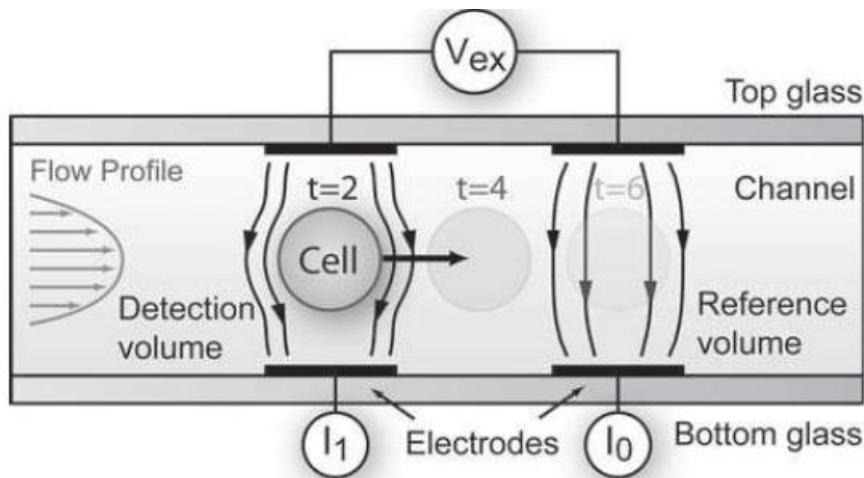


Figura 2.26: Microcanal durante a passagem de uma célula num dos dois pares de eléctrodos (adaptado de Gawad et al., 2008).

A utilização de dois pares de eléctrodos no canal de microfluídica, um de detecção e outro de referência, em vez de um par apenas, serve essencialmente para minimizar o desvio e vai possibilitar a medida simultânea a múltiplas frequências com o objectivo de podermos obter no mesmo estudo dados acerca do volume celular e propriedades dieléctricas injectando simultaneamente ondas de baixa e alta-frequência.

A corrente resultante é depois medida usando um amplificador operacional (o mesmo

amplificador dos métodos de teste anteriores, INA129) que vai proceder à diferença entre a corrente obtida com a passagem do sinal nos eléctrodos por onde a célula está presente (I_1) e a corrente obtida com a passagem do sinal nos eléctrodos de referência (I_0). De referir que após a discussão deste projecto concluiu-se que este amplificador operacional utilizado deverá ser substituído, num possível trabalho futuro, por dois amplificadores de transimpedância que funcionarão como conversores corrente-tensão e consequentemente o sinal obtido dos mesmos deverá então ser inserido num posterior amplificador diferencial, com uma gama alta de frequências de funcionamento, com o objectivo de obtermos então a tensão resultante da diferença dos sinais obtidos a partir dos eléctrodos opostos. Este é depois demodulado com um amplificador lock-in para obtermos os sinais que estão em fase e os sinais desfasados para cada frequência. Posteriormente a aquisição e análise do sinal é realizada a partir de um computador.

Este método apresenta como principais vantagens a obtenção de bons resultados de identificação de células parasitadas em tempo real. Obtemos também um SNR (“signal-to-noise ratio”) muito elevado pois devido aos amplificadores lock-in, obtém-se uma eficiente eliminação de ruídos presentes no sinal. No entanto, trata-se de um método com alguma sofisticação, associado à necessidade da utilização de vários instrumentos electrónicos algo dispendiosos, nomeadamente a utilização de amplificadores lock-in para as duas frequências geradas assim como os respectivos geradores de sinais.

2.2.2.2 “AC Discrete Frequency System” alternativo

Este método baseia-se no anteriormente apresentado, no entanto com algumas alterações no sentido de economizar a instrumentação necessária, tentando abstrairmo-nos fisicamente dos amplificadores lock-in. O esquema é o seguinte:

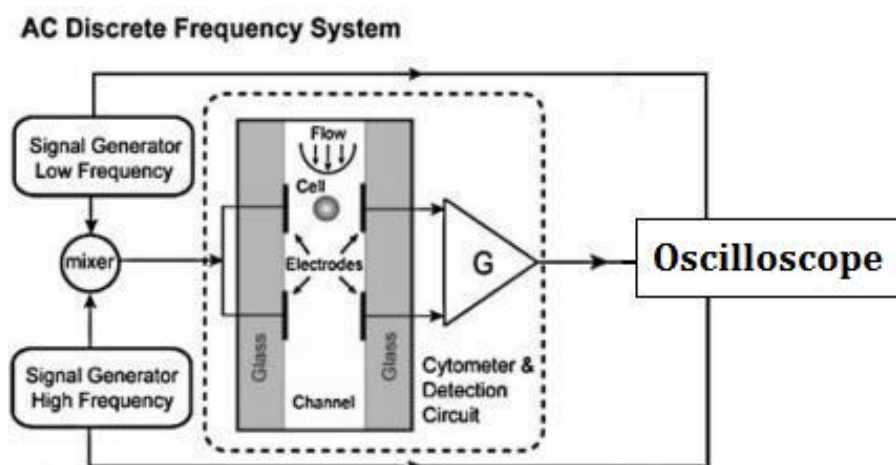


Figura 2.27: Esquema da técnica “AC Discrete Frequency System” alternativa.

O modelo baseia-se no esquema original mas sem a utilização dos dois amplificadores lock-in. Em vez disso, injecta-se o sinal directamente num osciloscópio com opção

de guardar os dados que, posteriormente, pudessem ser tratados com um software adequado (Matlab ou Labview, p.e.).

O principal problema que iríamos ter com esta solução seria a complexidade do tratamento dos dados devido ao elevado ruído e aos baixos sinais (e assim a imprevisibilidade de sabermos se iríamos obter os resultados que esperamos para o nosso projecto), o que impossibilitaria a obtenção de dados em tempo real.

Este modelo também apresenta outro revés importante. Neste caso vamos fazer entrar 3 sinais no osciloscópio, os 2 de referência (alta e baixa-frequência) e o sinal vindo dos eléctrodos. Os osciloscópios normais só têm 2 entradas pelo que teria que se utilizar outra opção paralela para fazer inserir o terceiro sinal necessário, ou então fazer entrar primeiro, nos dois canais do osciloscópio, os sinais de referência e só depois o sinal dos eléctrodos, mas aí não estaríamos a utilizar os sinais de referência no mesmo espaço temporal que se procedeu à realização da experiência.

2.2.2.3 “MLS Maximum Length Sequence system”

No sentido de contornar a utilização de um lock-in para cada frequência, pois são instrumentos demasiado dispendiosos, foi desenvolvido este novo método de multi-frequência de medição de impedância (figura 2.28).

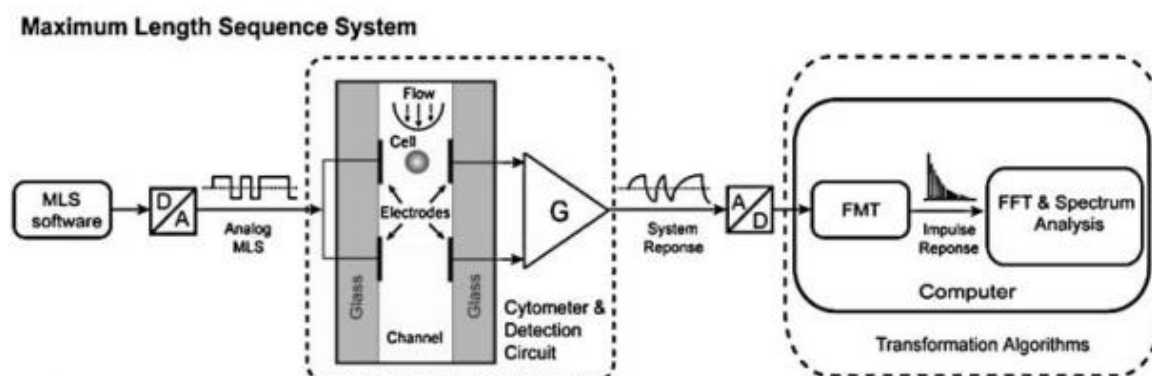


Figura 2.28: Esquema da técnica “Maximum Length Sequence System” (adaptado de Sun et al., 2008).

MLS é uma sequência binária pseudo-arbitrária cuja sua energia espalhada sobre uma banda larga possibilita medidas de multi-frequência realizadas num único período (ms) de excitação do MLS. O sinal digital é gerado por um software e convertido para analógico que por sua vez é inserido nos eléctrodos. À saída, o amplificador diferencial vai realizar o mesmo procedimento de detecção do sinal e este é depois transportado para um PC que o irá transformar a partir de algoritmos próprios. O primeiro será a FMT (fast M-sequence transform) que tem como objectivo obter a resposta do sistema por impulsos no domínio do tempo e o segundo a FFT (fast fourier transform) com o intuito de passar

o sinal para o domínio das frequências.

Este método apresenta como principais vantagens o facto de não utilizar instrumentos tão dispendiosos como o “AC Discrete Frequency System”, nomeadamente a utilização de lock-ins de demodulação de sinal e apresentar circuitos electrónicos mais simples e menos complexos. No entanto, a fim de conseguirmos identificar as células parasitadas na amostra temos que utilizar frequências pelo menos acima dos 10 MHz, pois é nesse intervalo de frequências que as mudanças na condutividade do citoplasma são aparentes e a capacitância da membrana é efectivamente curto-circuitada. Devido a este facto, é necessário a utilização de placas de aquisição e conversão analógico/digital extremamente rápidas e eficientes para possibilitar obter resultados nessa gama de frequências. Na literatura mais recente (Sun et al., 2007), é descrita a utilização de uma placa limitada a um “sample rate” de 1 MS/s o que possibilita uma frequência máxima de aquisição de 500 kHz. Com este valor é possível medir completamente o espectro de impedância de uma única célula e avaliar o seu tamanho, não sendo possível no entanto a discriminação entre as infectadas das não infectadas. Logo, esta teoria apresenta um forte revés para o propósito deste projecto.

2.2.2.4 “MLS Maximum Length Sequence system” alternativo

Novamente, este método baseia-se no anteriormente descrito mas ao invés de injectarmos o sinal que vem dos eléctrodos numa placa de aquisição de dados de conversor analógico/digital que não vai suportar estas velocidades tão elevadas, injectamos o sinal directamente num osciloscópio (figura 2.29) e, a partir da opção do osciloscópio de guardar os dados, tratá-los posteriormente num software para o efeito (Matlab ou labview, p.e.).

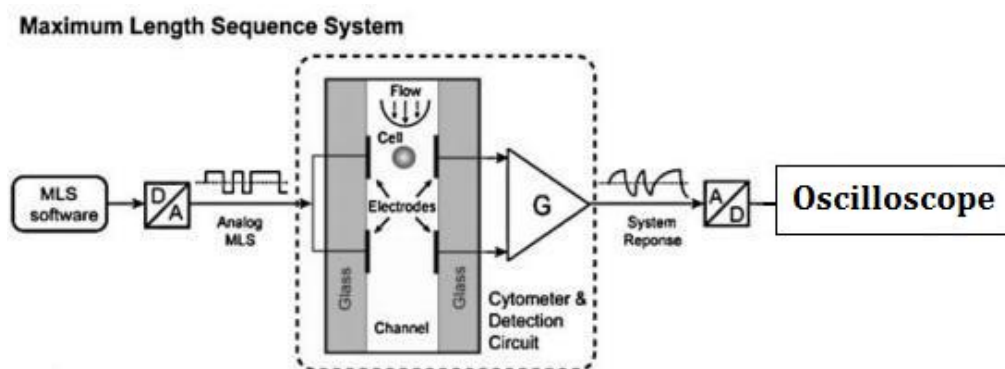


Figura 2.29: Esquema da técnica “Maximum Length Sequence System” alternativa.

Mais uma vez as principais desvantagens de um método desta natureza recaem no facto dos resultados não serem obtidos em tempo real e existir uma obrigatoriedade de guardar os dados exactamente aquando da passagem de uma célula pelos eléctrodos ou estar sistematicamente a armazená-los o que levará a uma enorme quantidade de dados

recolhidos. A complexidade do tratamento desses dados devido ao elevado ruído e aos baixos sinais (baixo SNR) seria outro ponto negativo a ter em conta.

2.3 Software de controlo e aquisição de dados - LabVIEW

LabVIEW é um software de projecto gráfico de sistemas. Este sistema fornece aos utilizadores como estudantes, engenheiros ou cientistas, as ferramentas necessárias para criar e implementar sistemas de medição e controle, por meio de uma integração de hardware, de uma forma simples, rápida, segura e inovadora.

Este software apresenta várias vantagens, principalmente no sentido de rapidez de programação, nomeadamente com o seu abrangente ambiente de projecto de sistemas, linguagem exclusiva de programação gráfica (linguagem G/código G), bibliotecas integradas de funções de software e interfaces de hardware para áreas específicas da engenharia, além dos seus recursos para a análise, visualização e compartilhamento de dados.

2.3.1 Breve história das linguagens de programação

Com o objectivo de perceber melhor as principais propostas de valor de programação gráfica em LabVIEW, é essencial uma breve descrição da criação das primeiras linguagens de programação de alto nível. Em meados dos anos 50 uma pequena equipa da IBM decidiu criar uma alternativa de programação de um novo super computador. O resultado dessa linguagem ficou conhecido por FORTRAN que, para a altura, além de ser uma linguagem mais fácil, também teve como objectivo aumentar os níveis de rapidez do processo de desenvolvimento.

Inicialmente a comunidade científica mostrou-se muito céptica a este novo método, mas rapidamente ganhou a confiança de todos pois reduzia num factor de 20 as instruções necessárias à programação de qualquer projecto, pelo que devido a esta característica é muitas vezes considerado a primeira linguagem criada de alto nível. Com o passar dos anos os engenheiros foram desenvolvendo novas tecnologias, sobretudo novas linguagens como C ou C++ que permitiram uma maior rapidez e simplicidade nas tarefas de programação. Foi com esta finalidade que em 1986 foi inserido no mercado a linguagem G que representa uma programação de extremo alto nível. Esta linguagem foi largamente adoptada em todo o mundo pois apresenta elevadas vantagens em termos de aumento de produtividade por parte dos seus utilizadores (National Instruments, 2012).

2.3.2 Estrutura e características do software

O LabVIEW é diferente da maioria dos outros programas existentes. Este é realizado na base da conexão entre si de ícones gráficos num diagrama (diagrama de blocos) que pode depois ser compilado directamente para código computacional e posteriormente executado pelo processador da máquina.

O programa está dividido em duas grandes janelas, o painel frontal (figura 2.31) e o respectivo diagrama de blocos (figura 2.30). O painel frontal está relacionado com a interface gráfica, o qual irá ser disponibilizado ao utilizador do programa, enquanto que o diagrama de blocos corresponde a toda a programação desenvolvida para que exista o painel frontal, ou seja, todos os botões e suas funções inseridas, todos os cálculos efectuados para a obtenção de resultados e todas as informações adicionais tiveram de ser programadas neste ambiente, sendo que este não vai estar acessível ao utilizador mas apenas ao programador. Apesar do código G ser representado graficamente em vez de textualmente, este contém os mesmos conceitos de programação encontrados na maioria das tradicionais linguagens, como é o exemplo de ciclos, variáveis, tipos de dados, arrays, etc.

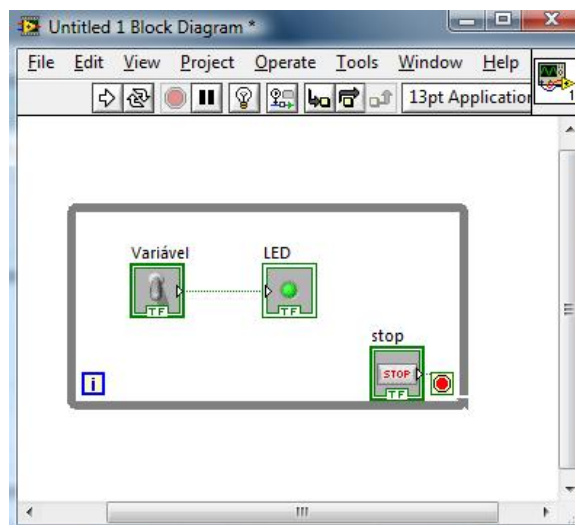


Figura 2.30: Exemplo de um diagrama de blocos.

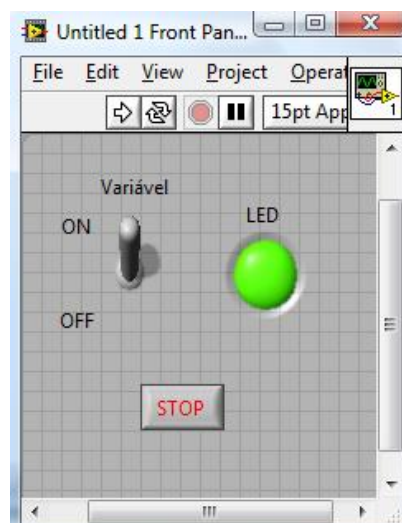


Figura 2.31: Correspondente painel frontal do diagrama de blocos apresentado.

Pode-se observar nas figuras anteriores um exemplo de programação em G onde está presente um exemplo de um código simples apenas para ligar e desligar um “led”. Verificamos no diagrama de blocos a presença de um ciclo “while” que faz o programa estar a correr mediante uma condição de paragem que, neste caso, corresponde à pressão de um botão STOP. Quando o utilizador pressiona o botão de paragem, a variável adquire o valor de 1 ou também denominado de valor “true” e o ciclo é quebrado, interrompendo o programa. Dentro desse ciclo “while” verificamos também a presença de outra variável que faz acender ou apagar um “led” consoante a vontade do mesmo utilizador no painel frontal. Mais uma vez quando o botão de activar ou desactivar o “led” é pressionado, a variável adquire o valor 1 ou 0, respectivamente, possibilitando assim que o “led” ligue ou desligue.

O Labview contém uma enorme e rica paleta de funções a partir da qual podemos realizar todo o tipo de programação. É importante referir também que podemos associar a este programa “DAQ cards” que são placas de aquisição e envio de sinais analógicos/digitais. A partir desta associação podemos realizar vários estudos e análises de sinais vindos do exterior (figura 2.32), por exemplo, representando-os no programa através de gráficos e efectuando as respectivas medidas como amplitude, frequência, período, fase, etc.

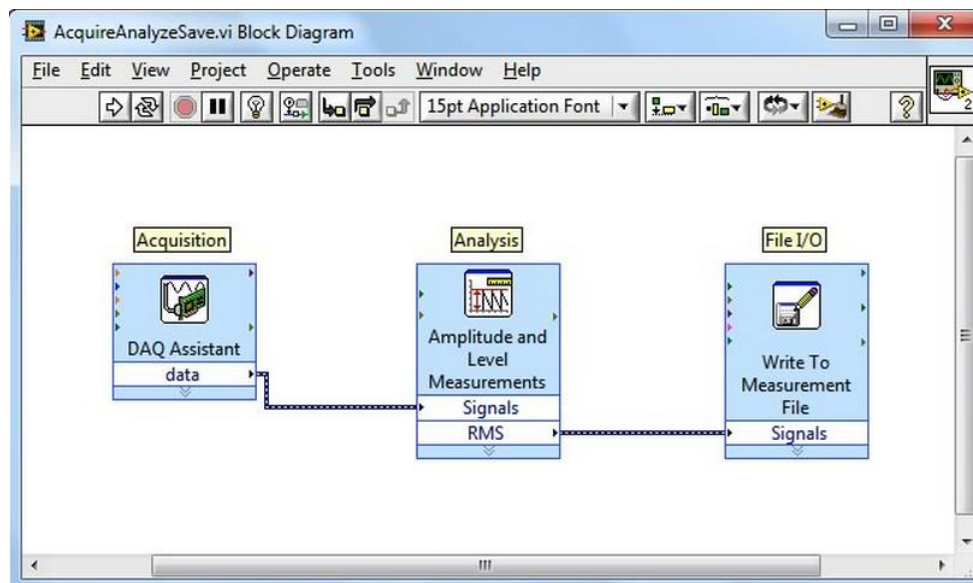


Figura 2.32: Exemplo de um diagrama de blocos de uma aquisição de sinal através de uma “DAQ card” e respectivo estudo e medidas no programa, guardando posteriormente os dados (adaptado de National Instruments, 2012).

Resultados e Discussão

3.1 Resultados do processo de microfabricação

A etapa mais demorada deste processo de microfabricação é, com certeza, a produção do molde em SU-8. A lista de processos a desenvolver nesta etapa é extensa e requer muita destreza e concentração na sua execução. O relatório do protocolo deste processo laboratorial está presente em anexo a esta dissertação (Anexo A - Relatório do protocolo de execução do processo de microfabricação). Enquanto que este processo é uma etapa demorada e complexa, o PDMS replica com microprecisão de forma bastante fácil e rápida todas as estruturas presentes no molde. Assim, se a fabricação do molde não for bem executada, a réplica de PDMS irá ficar comprometida.

Como já foi referido no capítulo anterior, o SU-8 é um fotorresiste altamente fotosensível e as suas propriedades finais podem ser afectadas pelos parâmetros do seu processamento (“spin coat”, “soft bake”, “exposure”, “post bake” e “development”). Como também foi descrito, os seus parâmetros óptimos variam de lote para lote devido a pequenas variações na sua própria constituição. Através da “datasheet” correspondente ao lote de SU-8 2025 usado na experiência laboratorial, determinámos os correspondentes valores de optimização em função da espessura desejada (20 μm).

Uma das principais desvantagens do SU-8 é a elevada tensão a que este é sujeito após a polimerização. Em grandes estruturas de SU-8 existe mesmo o risco deste ser eliminado da sua superfície devido ao elevado coeficiente de expansão termal que este dispõe em comparação com as suas bases comuns de silício ou vidro. A aderência é muito importante para obtenção de bons resultados. Foi com este objectivo que se utilizou “wafers” de silício em vez de vidro, pois este último pode apresentar aderências bastante fracas e o fotorresiste ser facilmente eliminado da superfície durante a fase de revelação.

Outro parâmetro igualmente importante para a fabricação deste molde é a temperatura. A variação da temperatura ambiente aquando da execução da experiência pode ser crucial para o tempo de “spin coat” ou espalhamento do SU-8 na “wafer” de silício. Um pequeno aumento de temperatura leva o SU-8 a tornar-se menos viscoso e é necessária uma redução da velocidade de rotação da “wafer” no processo de espalhamento, e vice-versa.

O objectivo foi produzir um molde de SU-8 para obtermos microcanais em PDMS com dimensões próximas dos 20 μm (figura 3.1).

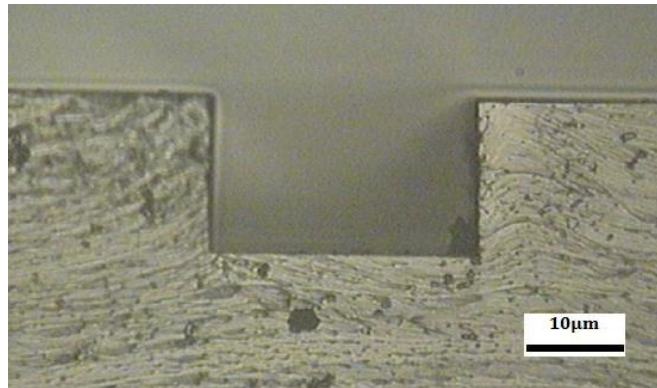


Figura 3.1: Imagem microscópica de um microcanal de perfil em PDMS (adaptado de Vaz, 2012).

Utilizaram-se três “wafers” de silício para a produção de moldes em SU-8. A utilização deste número de bolachas serviu essencialmente para dar uma margem de erro ao processo de fabricação, pelo que se irá verificar posteriormente que foi uma decisão acertada. Como temos três amostras a produzir, variámos os parâmetros de “spin coat”, ou seja, espalhamento do SU-8, com o intuito de achar a melhor amostra para os testes. Tal como o protocolo em anexo indica, utilizámos para o primeiro teste um “spin coat” de 3600 rpm, para o segundo 4100 rpm e por fim, para o terceiro, uma velocidade de rotação de 4600 rpm. Seguiram-se correctamente todos os procedimentos e aquando da revelação do SU-8 verificámos que a amostra A (figura 3.2), ou seja, a correspondente à velocidade de “spin coat” de 3600 rpm foi a que obteve melhores resultados. As outras duas amostras, como têm uma camada mais fina, não resistiram aos 4 minutos utilizados na revelação, pelo que o SU-8 começou a sair da “wafer” e o molde ficou perdido.

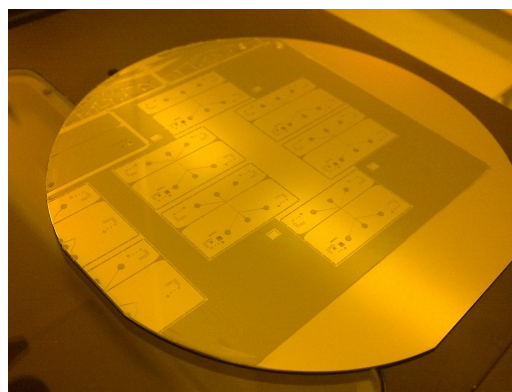


Figura 3.2: Resultado final da “Wafer A” revelada.

Observando ao microscópio os canais presentes na “wafer A” (figura 3.3), verificamos que estes encontram-se em bom estado e prontos a servir de molde para produção de PDMS:

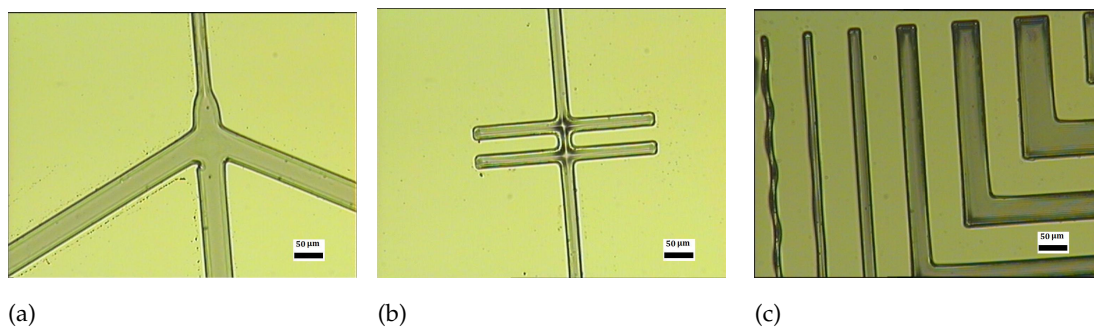


Figura 3.3: Vista ao microscópio dos canais (a), da zona de detecção eléctrica (b) e da barra de escala (c) do molde de SU-8 antes da produção de PDMS.

Esta barra de escala presente na última figura apresentada e presente também no molde de SU-8 serve essencialmente para nos dar informação acerca do sucesso ou insucesso do tempo de exposição utilizado. Verificamos que para os tamanhos dos canais desejados, estes não sofreram perturbações, pelo que o tempo de exposição para este teste foi o indicado.

Seguiu-se o processo de produção dos canais em PDMS a partir deste molde. Seguindo o protocolo, o silicone foi produzido e colocado sobre a “wafer A” (tal como se pode verificar na figura 3.4) de forma a gravar as estruturas no PDMS.

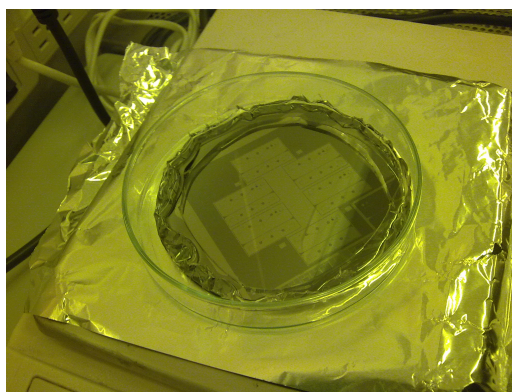


Figura 3.4: Molde de SU-8 após a produção de PDMS.

Observando a olho nu podemos concluir que após a produção da parte superior do chip a partir desta “wafer”, o SU-8 presente manteve-se intacto. No entanto, observando ao microscópio os canais (figura 3.5), verificámos que numa das estruturas do molde de SU-8, um microcanal junto à área de detecção eléctrica não resistiu à produção do PDMS e rompeu, saindo mesmo da própria “wafer”.

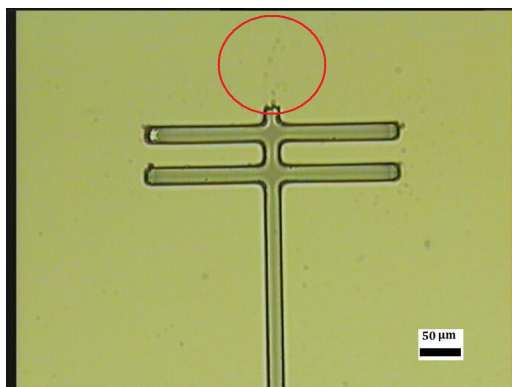
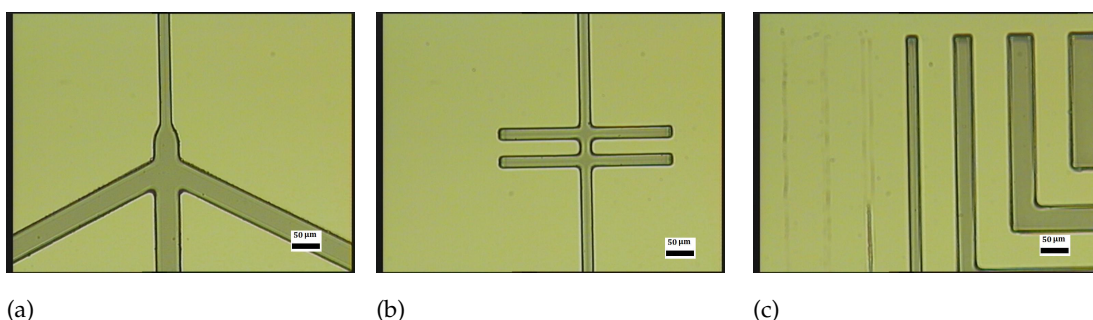


Figura 3.5: Zona de detecção eléctrica de uma estrutura do molde de SU-8 após a produção de PDMS.

As outras estruturas do molde de SU-8 após a produção de PDMS permaneceram intactas e com boas formas. Estas não sofreram roturas devido ao processo, permanecendo imóveis na “wafer” (como se observa através da figura 3.6). A rotura foi apenas registada numa única estrutura das seis existentes.



(a)

(b)

(c)

Figura 3.6: Vista ao microscópio dos canais (a), da zona de detecção eléctrica (b) e da barra de escala (c) do molde de SU-8 após a produção de PDMS.

A partir destas estruturas intactas ainda seria possível a fabricação de mais canais em PDMS, no entanto como se pode observar na barra de escala resultante, o SU-8 já começou a sair da “wafer”, nomeadamente nas estruturas mais pequenas, pelo que a produção de mais chips a partir deste molde poderá comprometer o mesmo e a qualidade do resultado não ser a desejada. Devido a esta situação foi criado outro molde a partir do PDMS obtido que tem exactamente as mesmas estruturas do SU-8, apresentando no entanto maior resistência à microfabricação de dispositivos em grande escala. Outra opção seria criar um molde em epóxi, como já foi referido no capítulo anterior. Neste projecto decidimos pelo molde em PDMS pois o tempo de fabricação da epóxi é muito maior.

Foi então a partir do molde de PDMS que se obtiveram chips de microfluídica ainda sem a presença dos eléctrodos (figura 3.7). Os “inlets” e “outlets” foram furados a partir de uma pequena agulha de seringa para possibilitar no futuro a entrada do líquido e os chips foram cortados, com as respectivas dimensões dos contornos.

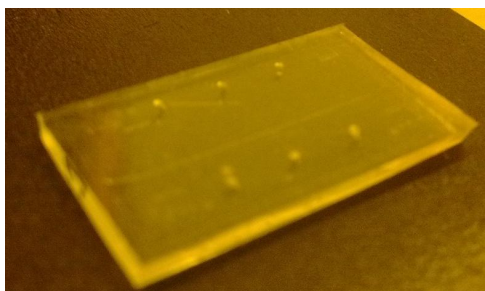


Figura 3.7: Imagem do PDMS com as respectivas estruturas, ou seja, a parte superior de um dispositivo de microfluídica.

Observando ao microscópio, verificamos que as estruturas presentes neste bloco de PDMS, apresentam igualmente formas indicadas para uma boa obtenção de resultados práticos:

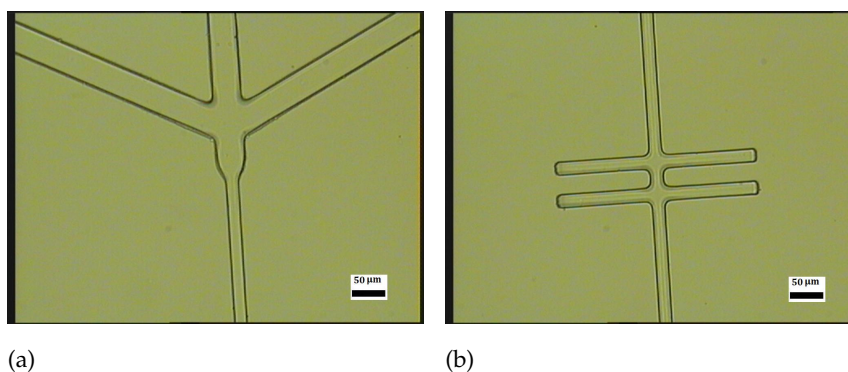


Figura 3.8: Vista ao microscópio dos canais (a) e da zona de detecção eléctrica (b) do PDMS.

Além das boas formas dos canais, também as suas dimensões correspondem aos valores pretendidos. A partir de uma opção do microscópio que permite medir pequenas distâncias, procedeu-se à medição da espessura dos canais a partir de um corte na secção transversal do PDMS (figura 3.9). Esta medição foi realizada a partir de um corte transversal num dos locais de alinhamento do dispositivo, presente a 2,5 cm do centro da “wafer”, pois não pretendíamos inutilizar o chip em questão fazendo o corte no próprio canal.

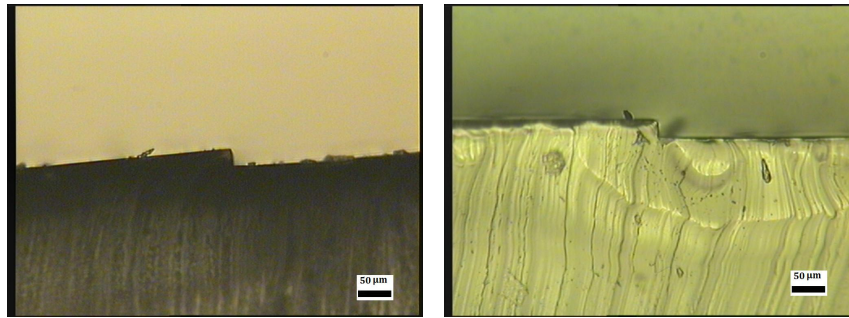


Figura 3.9: Vista ao microscópio de duas secções transversais do PDMS.

Este local de alinhamento, gerado logo na máscara de crómio inicial, tem uma função importante nomeadamente quando for realizada a selagem do PDMS ao vidro com os eléctrodos. A partir deste, poderemos alinhar correctamente as duas estruturas e verificar o desvio final existente, se for o caso. Consequentemente foram realizadas várias medidas da espessura e calculada a respectiva média e desvio padrão inerente aos valores obtidos. Todos estes dados são apresentados na seguinte tabela:

Tabela 3.1: Medidas realizadas da espessura dos canais em PDMS.

Medidas (μm)	Média (μm)	Desvio Padrão (μm)
20		
15		
15		
17	17,43	2,07
20		
18		
17		

Como podemos observar, a espessura média obtida foi de aproximadamente $17,5 \mu\text{m}$ que é um valor muito próximo dos $20 \mu\text{m}$ pretendidos. Como o diâmetro dos eritrócitos é de aproximadamente 7 a $9 \mu\text{m}$, concluímos que esta espessura obtida possibilita a realização do nosso estudo.

Concluída a execução da parte superior do nosso dispositivo de microfluídica, procedemos à realização da parte inferior do mesmo, nomeadamente a fabricação dos eléctrodos. A partir dos procedimentos apresentados no capítulo anterior, procedeu-se à realização da fotolitografia utilizando as quatro bases de vidro mediante a utilização da máscara de crómio dos eléctrodos. Com a máscara exposta e revelada no fotorresiste positivo presente na amostra de vidro, esta foi consequentemente colocada no canhão de electrões a fim de se obter a pequena camada de titânio e ouro cobrindo os quatro vidros (figura 3.10).

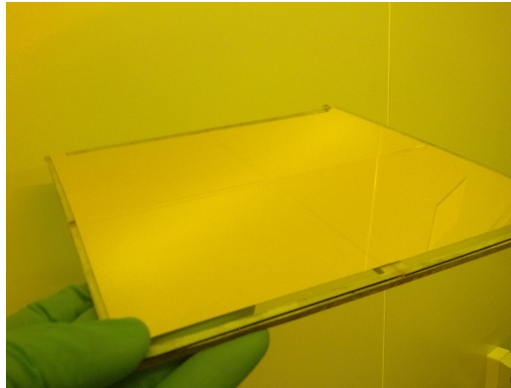


Figura 3.10: Imagem das quatro amostras de vidro após deposição das camadas de titânio e ouro no canhão de electrões.

Como podemos observar as amostras de vidro ficaram totalmente cobertas com uma camada dourada muito fina que será a base da constituição dos eléctrodos. Mediante o processo de “lift-off”, o fotorresiste que tinha sido colocado inicialmente é destruído, procedendo à eliminação dos excessos de titânio e ouro colocados na parte superior (figura 3.11). Obtiveram-se então quatro amostras de vidro, cada uma com 6 bases de eléctrodos.

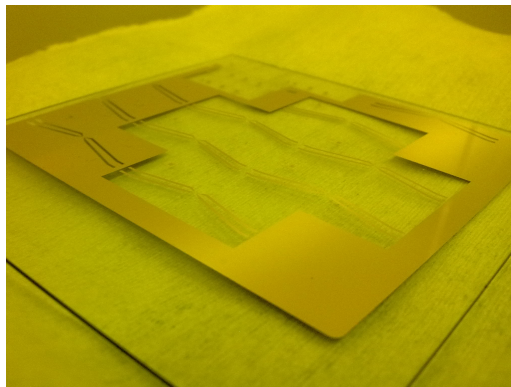


Figura 3.11: Amostra de vidro com os eléctrodos já expostos.

Através da máquina de corte com diamante e com a maior sensibilidade possível conseguiram-se obter vários eléctrodos individuais (figura 3.12) para procedermos ao respectivo alinhamento com os blocos de PDMS já produzidos.

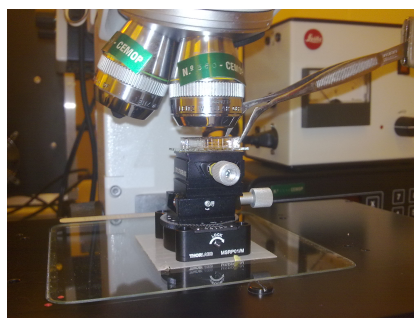


Figura 3.12: Imagem dos eléctrodos individuais expostos em vidro, que vão servir de base no chip de microfluídica.

O alinhamento destes últimos com o respectivo PDMS foi obtido através da utilização de um microalinhador próprio para o efeito. A colocação de todo o conjunto (microalinhador com vidro e PDMS) em microscópio (figura 3.13), vai permitir um alinhamento correcto e eficaz do chip. Após o tratamento das superfícies em plasma de oxigénio e consequente submersão em água para aumentar o tempo de alinhamento, foi montada toda a estrutura envolvente na construção do dispositivo de microfluídica.



(a)



(b)

Figura 3.13: Estrutura de alinhamento do dispositivo de microfluídica montado em microscópio com ampliação de 100x.

Após o alinhamento entre o vidro com os eléctrodos e o PDMS estar realizado, deixou-se repousar o chip durante o tempo necessário à evaporação da água presente e à criação das ligações moleculares irreversíveis entre as duas superfícies.

Verificou-se posteriormente o alinhamento dos dois a partir da zona de caracterização

eléctrica (figura 3.14) que é, neste caso, a zona mais crítica do dispositivo.

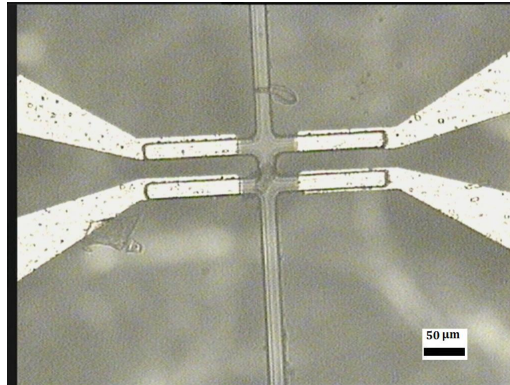


Figura 3.14: Imagem ao microscópio do alinhamento entre o vidro com os eléctrodos e o PDMS, na zona de caracterização eléctrica.

Concluiu-se que o alinhamento foi realizado com sucesso e que o dispositivo de microfluídica obtido e apresentado na figura 3.15 está pronto para a realização de testes práticos.

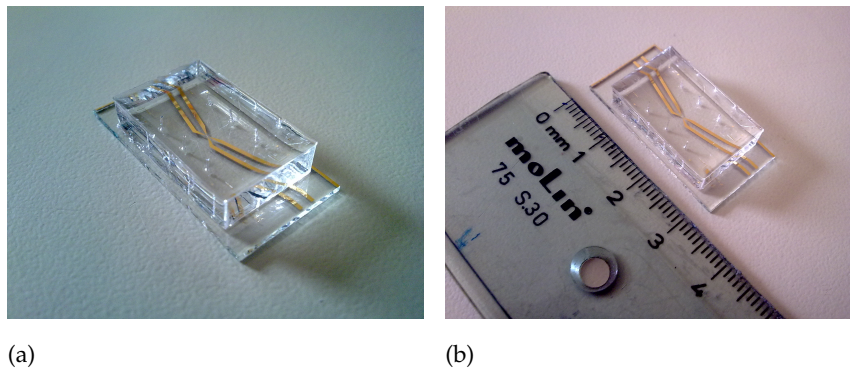


Figura 3.15: Dispositivo de microfluídica completo.

3.2 Espectroscopia de impedância aplicada a uma amostra biológica simulada com um circuito equivalente

Já referido anteriormente, este método serviu essencialmente como teste de simulação de amostras biológicas e como primeira abordagem a este conceito de impedância. O objectivo seria chegar ao espectro de impedância para a associação de uma resistência de $1\text{ k}\Omega$ em paralelo com um condensador de $1\text{ }\mu\text{F}$. Para isso, foi colocada uma resistência em série com esta associação com um valor de $1,5\text{ k}\Omega$ e injectado um sinal de tensão AC de 1 V pico a pico e de frequência variável, tal como se pode verificar no circuito da figura seguinte.

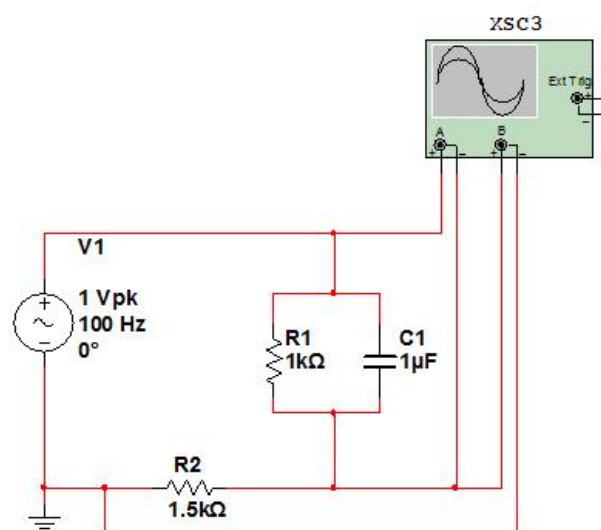


Figura 3.16: Circuito equivalente de simulação de uma amostra biológica para determinação de impedância.

O objectivo seria então obter o espectro teórico presente na literatura (Chinaglia et al., 2008):

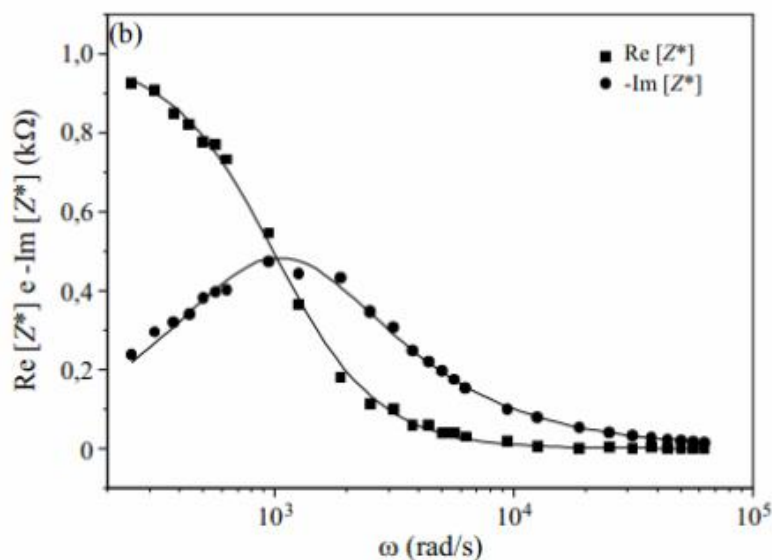


Figura 3.17: Espectro teórico da associação anterior.

Toda esta simulação foi realizada no software MULTISIM e posteriormente construída uma tabela de resultados a partir da medição dos parâmetros das ondas obtidas entre a associação presente na "caixa" e a resistência em série. Estas medições foram realizadas a partir do osciloscópio interactivo (figura 3.18) presente neste software.

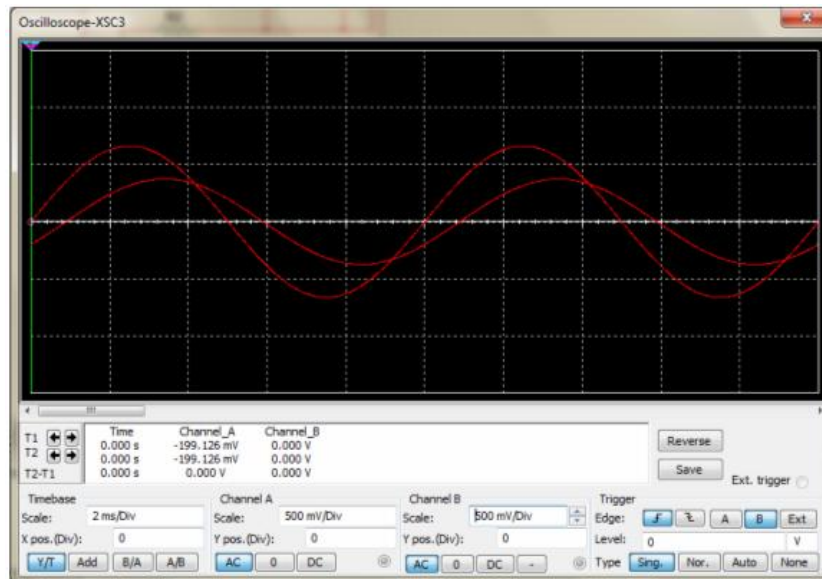


Figura 3.18: Ondas obtidas, a partir do osciloscópio interativo, entre a “caixa” e a resistência em série.

Retirados todos os parâmetros para esta frequência, procedeu-se à variação da mesma no sentido de podermos construir a tabela com todos os dados necessários para obtenção do espectro de impedância.

Tabela 3.2: Dados relativos às ondas entre a “caixa” e a resistência R em série para várias frequências.

ω (rad/s)	f (Hz)	R (k Ω)	V_{cx} (V)	V_r (V)	Δt (s)	T (s)	ϕ (rad)
200	31,83	1,50	0,3970	0,6070	9,82E-04	3,15E-02	0,19594
500	79,58	1,50	0,3820	0,6420	9,28E-04	1,27E-02	0,45912
800	127,32	1,50	0,3600	0,6920	8,34E-04	7,86E-03	0,66669
1100	175,07	1,50	0,3338	0,7440	7,45E-04	5,77E-03	0,81126
1400	222,82	1,50	0,3040	0,7960	6,77E-04	4,46E-03	0,95375
10000	1591,55	1,50	0,0795	0,9887	1,51E-04	6,23E-04	1,52289
70000	11140,85	1,50	0,0093	0,9893	2,25E-05	9,00E-05	1,57062

Com a tabela de dados construída para várias frequências (tabela 3.2) e a partir da equação 2.5 apresentada no capítulo 2 construiu-se nova tabela agora com os valores da parte real e da parte imaginária.

Tabela 3.3: Valores da parte real e da parte imaginária do espectro de impedância da associação em questão.

Parte Real (Ω)	Parte Imaginária (Ω)
9,62E+02	1,91E+02
8,00E+02	3,96E+02
6,13E+02	4,83E+02
4,63E+02	4,88E+02
3,31E+02	4,67E+02
5,78E+00	1,20E+02
2,49E-03	1,41E+01

Por fim, a partir dos valores da tabela 3.3, construiu-se o gráfico do espectro de impedância para esta associação:

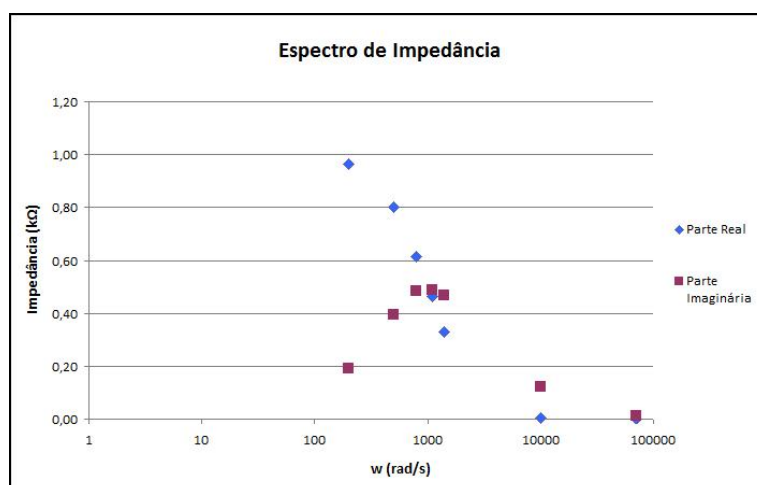


Figura 3.19: Espectro de impedância relativo à associação em teste.

Verificamos pela observação do gráfico da figura 3.19 que o espectro da parte real vai diminuir desde valores de impedância próximos do k Ω até valores próximos de zero, consoante o aumento da velocidade angular e consequentemente da frequência. Já o espectro da parte imaginária relativo a esta associação apresenta-se crescente até valores de velocidade angular a rondar os 1000 rad/s, altura em que atinge um pico de impedância de aproximadamente 0,5 k Ω cruzando-se com o gráfico da parte real. A partir deste ponto vai igualmente decrescer até valores próximos de zero. Concluimos então que este espectro de impedância está muito concordante com o espectro teórico apresentado na figura 3.17 pelo que apresentam igualmente as mesmas características e conformações. A naturalidade deste facto incide sobre a utilização da mesma associação em ambos os testes para a adaptação ao conceito de impedância.

3.3 Espectroscopia de impedância aplicada a amostras biológicas em eléctrodos exteriores

Ainda sem a utilização de dispositivos de microfluídica, procedeu-se à realização de testes de espectroscopia de impedância, desta vez aplicada a amostras biológicas propriamente ditas. Como já foi referido no capítulo 2, estes testes tiveram como objectivo, não só ganhar experiência de manuseamento dos instrumentos necessários à realização deste método de estudo, como também obter alguns dados relevantes acerca da impedância de alguns líquidos usados nos ensaios com material biológico.

Estes testes foram realizados em diferentes soluções aquosas de referência ou de uso comum na cultura celular, nomeadamente água, água com sal, PBS (tampão fosfatossalino ou “phosphate buffered saline”, que é uma solução de cloreto de sódio e fosfato de sódio, muitas vezes utilizada para diluição de soluções com o objectivo de manter um valor de pH constante), vinagre e sangue. Os resultados obtidos a partir das duas ondas (sinal inicial injectado nos eléctrodos e sinal recolhido à saída do amplificador diferencial) foram interpretados manualmente através da observação do osciloscópio Tektronix TDS 210 e, posteriormente, construíram-se tabelas com todos esses valores, para cada frequência e para cada amostra. Por último e para interpretação dos dados obtidos, foram construídos, a partir das tabelas, três gráficos para cada amostra (dois espectros de impedância, um da parte real e imaginária em função da frequência e outro da parte imaginária em função da parte real, e um gráfico da fase em função da frequência). Seguidamente são apresentados os gráficos relativos à água com sal, PBS e sangue, sendo que as respectivas tabelas e os restantes dados acerca das outras substâncias estão em anexo a esta dissertação (Anexo B – Dados relativos aos espectros de impedância de amostras biológicas em eléctrodos exteriores).

3.3.1 Resultados obtidos nos ensaios com água com sal

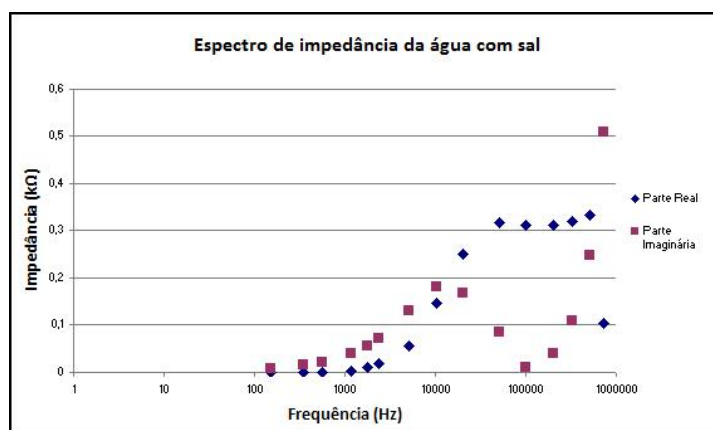


Figura 3.20: Espectro de impedância da água com sal em função da frequência.

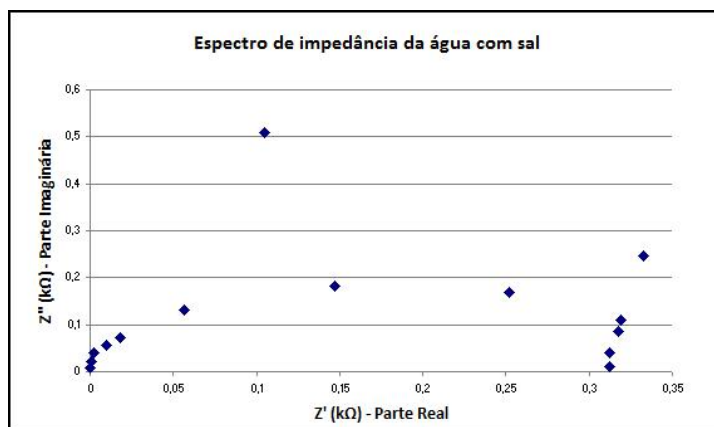


Figura 3.21: Espectro da parte imaginária da impedância da água com sal em função da parte real.

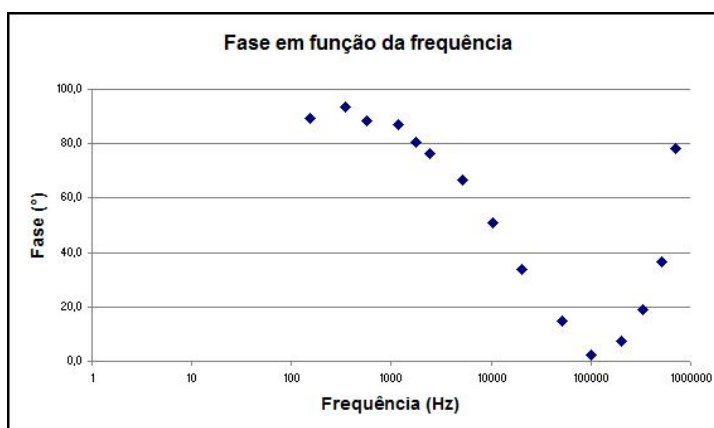


Figura 3.22: Gráfico da fase em função da frequência, relativo à água com sal.

3.3.2 Resultados obtidos nos ensaios com PBS

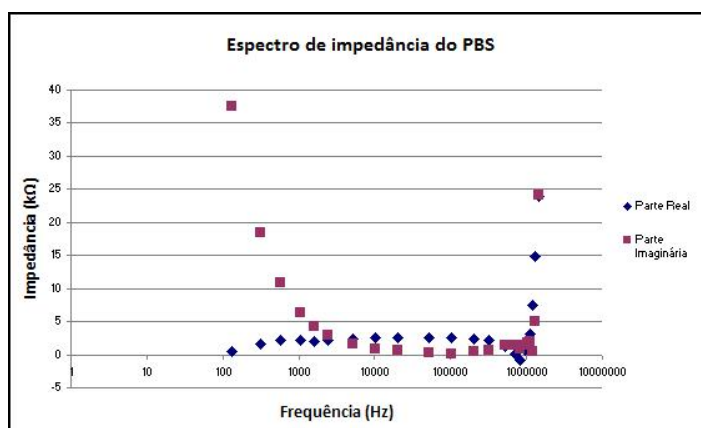


Figura 3.23: Espectro de impedância do PBS em função da frequência.

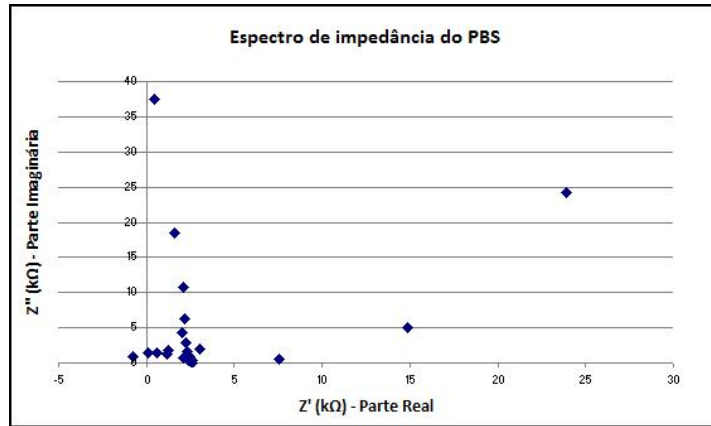


Figura 3.24: Espectro da parte imaginária da impedância do PBS em função da parte real.

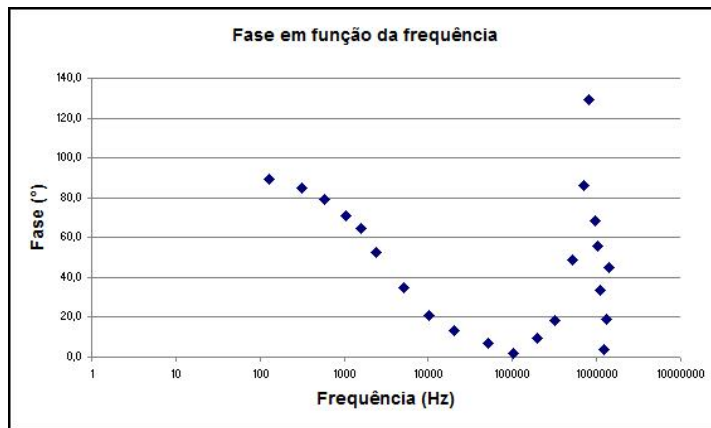


Figura 3.25: Gráfico da fase em função da frequência, relativo ao PBS.

3.3.3 Resultados obtidos nos ensaios com sangue ovino (eritrócitos desfibrinados)

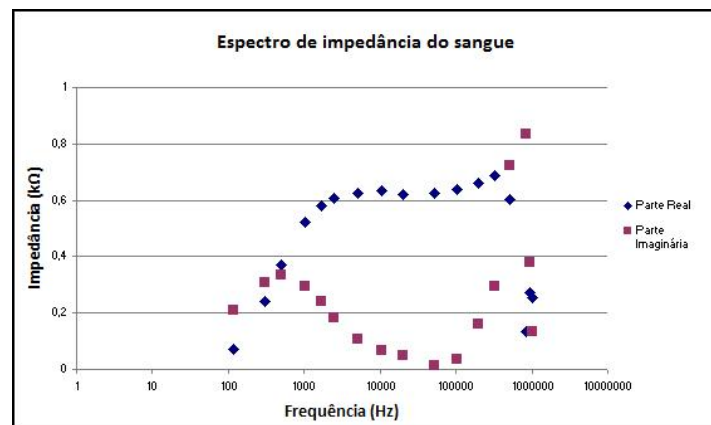


Figura 3.26: Espectro de impedância do sangue em função da frequência.

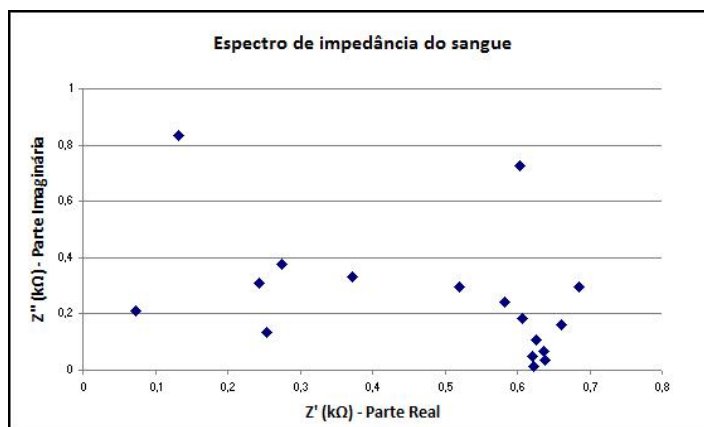


Figura 3.27: Espectro da parte imaginária da impedância do sangue em função da parte real.

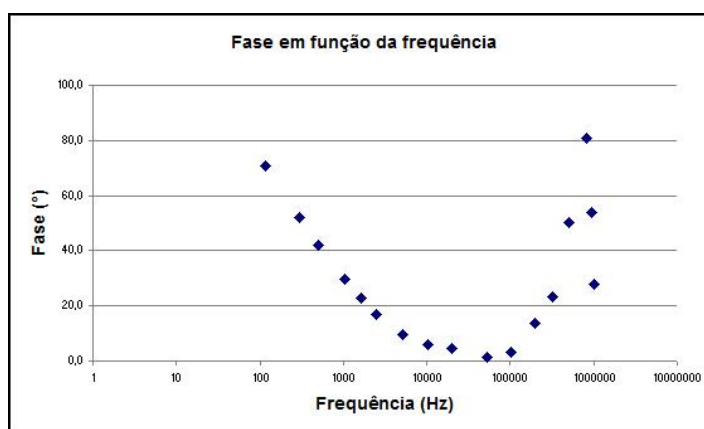


Figura 3.28: Gráfico da fase em função da frequência, relativo ao sangue.

A partir de todos estes resultados obtidos e gráficos construídos analisaram-se as semelhanças e diferenças de material para material.

Em comum, todas as amostras biológicas estudadas apresentam um gráfico da fase em função da frequência muito semelhante. Verificamos que, com o aumento da frequência, a fase, entre a onda do sinal de tensão AC inserida nos eléctrodos exteriores e a onda obtida à saída do amplificador diferencial, vai sendo cada vez menor, atingindo valores muito próximos de zero. Esta diminuição vai-se mantendo constante até um valor de frequência, da onda injectada, de aproximadamente 100 kHz. É então a partir deste valor que podemos observar uma inversão na tendência de decréscimo da fase entre as ondas, começando, a partir deste ponto, a evoluir no sentido positivo, ou seja, a crescer com o aumento da frequência inserida. Posteriormente iremos ter outro ponto de inversão quando a ordem de grandeza da frequência for 10 vezes superior. A partir de valores a rondar o MHz a fase volta a sofrer uma inversão e começa novamente a decrescer, como podemos observar nos gráficos correspondentes da fase em função da frequência relativos ao PBS e ao sangue.

Verificamos também, com a observação atenta de todos os dados recolhidos, que existem diferentes valores de impedância para cada líquido/amostra em questão. No capítulo 2 foi definido este conceito como sendo uma maneira de representar a quantidade de corrente, com uma determinada tensão AC, que atravessará um circuito eléctrico com uma determinada medida de oposição. Nos líquidos (electrólitos), a quantidade de corrente que é atravessada vai depender da quantidade de iões presente na amostra e a forma como eles interagem ou o estado em que se encontram para transportarem essa energia. Sendo a corrente eléctrica um fluxo ordenado de partículas portadoras de carga eléctrica e, nos líquidos, os portadores de corrente eléctrica serem iões (positivos e negativos), podemos concluir que em substâncias com maior quantidade de iões presentes completamente ionizados em solvente, têm uma maior corrente eléctrica a ser atravessada (electrólito forte) e, conseqüentemente, uma menor impedância (lei de Ohm). Pelo contrário, uma substância molecular que está parcialmente ionizada em solução, ou seja, possui iões livres na solução, assim como moléculas, caracteriza-se pela pouca condutividade eléctrica (electrólito fraco). Assim, observando em detalhe os gráficos da impedância, tanto a parte real e imaginária em função da frequência como os gráficos de Nyquist (semi-círculos representativos da parte imaginária da impedância em função da sua parte real), podemos concluir que a amostra correspondente à água com sal é a que apresenta menores valores de impedância e conseqüentemente maior concentração de iões completamente ionizáveis em solução, pelo que é o líquido dos cinco testados que representa menor oposição à passagem de uma corrente eléctrica. Seguem-se a água normal e o vinagre (Anexo B) que apresentam valores de impedância ligeiramente maiores. Posteriormente aparece o sangue que fica em penúltimo lugar desta lista crescente, sendo que em último está situado o PBS que, de entre todas as amostras estudadas, é o que apresenta maiores valores de impedância tornando-se uma má amostra, de entre as cinco, para fazer fluir corrente eléctrica. É devido a este facto que o PBS é muitas vezes utilizado para diluição de substâncias. Neste projecto em concreto iremos utilizar esta solução para realizar a focagem hidrodinâmica da substância a analisar.

Este estudo foi importante não só para aprofundar os conhecimentos acerca deste conceito de impedância como também para ganharmos alguma noção no seu envolvimento em líquidos e amostras biológicas, pois conseqüentemente este conceito estará presente aquando da elaboração das simulações da espectroscopia de impedância em células únicas, utilizando dispositivos de microfluídica.

3.3.4 Resultados obtidos em LabVIEW

Com o objectivo de procedermos a um primeiro teste em relação a todas as conexões necessárias à obtenção de resultados em computador a partir do software labview, simulou-se um diagrama de blocos e um painel frontal para apresentação e tratamento da informação recebida através da placa de aquisição de dados NI DAQ PCI6024E juntamente com o adaptador BNC2120.

Através da placa de aquisição de dados, que procede à conversão do sinal analógico em digital, conectou-se no computador o cabo portador da onda sinusoidal de tensão AC, que é injectada primeiramente nos eléctrodos, através do adaptador BNC2120 que possibilita a entrada simultânea de 8 cabos BNC. Também neste mesmo adaptador da placa foi conectado o cabo portador da onda recebida depois da passagem pela amostra e pelo amplificador diferencial. A partir destas duas ondas procedeu-se à construção de um algoritmo (no diagrama de blocos do labview – figura 3.29) necessário à extracção dos dados desejados para elaboração dos gráficos de impedância, nomeadamente as fases, frequências, períodos e amplitudes.

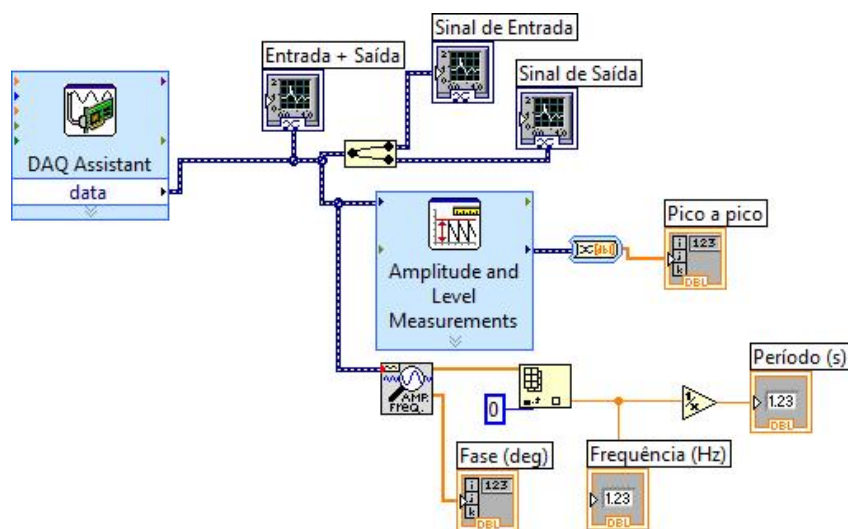


Figura 3.29: Diagrama de blocos do algoritmo para obtenção dos dados das ondas.

Observando o diagrama anterior podemos constatar que o sinal (“data”) vindo da “DAQ Assistant” vai primeiramente ser inserido em indicadores gráficos (“Entrada + Saída”, “Sinal de Entrada” e “Sinal de Saída”) para disponibilizar ao utilizador a visualização dos sinais que está a obter, ou seja, dos sinais que estão a ser inseridos no computador através da placa de aquisição de dados e consequentemente através do adaptador BNC2120. Seguidamente o sinal é inserido em duas funções de medida (“Amplitude and Level Measurements” e “AMP. FREQ.”) já existentes no labview que vão simplesmente

medir a amplitude, fase, frequência e período do sinal. Estes dados foram depois colocados em “arrays” de armazenamento de informação (“Pico a pico”, “Fase (deg)”,) e indicadores próprios (“Frequência (Hz)” e “Período (s)”) no sentido de ficarem visíveis no painel frontal para o utilizador.

Após a aquisição de todos estes dados procedeu-se ao tratamento dos mesmos. Calculou-se o quociente entre as amplitudes do sinal de entrada e saída (dV) tal como a respectiva diferença de fases, em graus e em radianos, entre as mesmas ondas (dF).

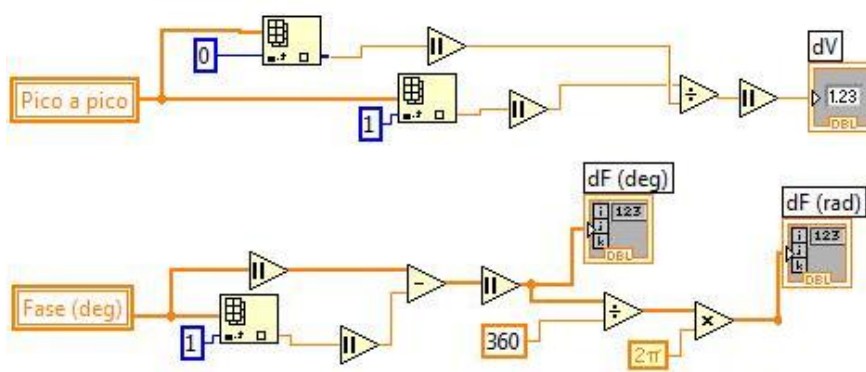


Figura 3.30: Diagrama de blocos do algoritmo de tratamento dos dados adquiridos.

Este algoritmo presente no diagrama de blocos da figura 3.30 vai tratar os dados acerca das amplitudes e das fases dos sinais de entrada e saída. Os “arrays” de dados onde a informação sobre a amplitude e fase foi armazenada (“Pico a pico”, “Fase (deg)”) são então colocados em funções de “index array” que vão devolver os últimos valores adquiridos pela placa de aquisição de dados para o sinal de entrada e saída, ou seja, para o sinal que é injectado primeiramente nos eléctrodos e para o sinal resultante. Esses valores passam depois por uma função módulo para os transformar em números positivos e finalmente é realizado o quociente entre os dois, no caso da amplitude, e a diferença, no caso da fase. De referir também que para transformar as unidades dos dados da fase em radianos procedeu-se ao quociente desses valores por 360 e conseqüentemente ao produto dos mesmos por 2π .

Seguiu-se a construção dos respectivos gráficos de impedância idênticos aos elaborados manualmente nos capítulos anteriores para as amostras estudadas (água, água com sal, PBS, vinagre e sangue). Desta vez foi construído um novo algoritmo no diagrama de blocos do labview (figura 3.31), no sentido de possibilitar a visualização dos mesmos de uma forma rápida e automática.

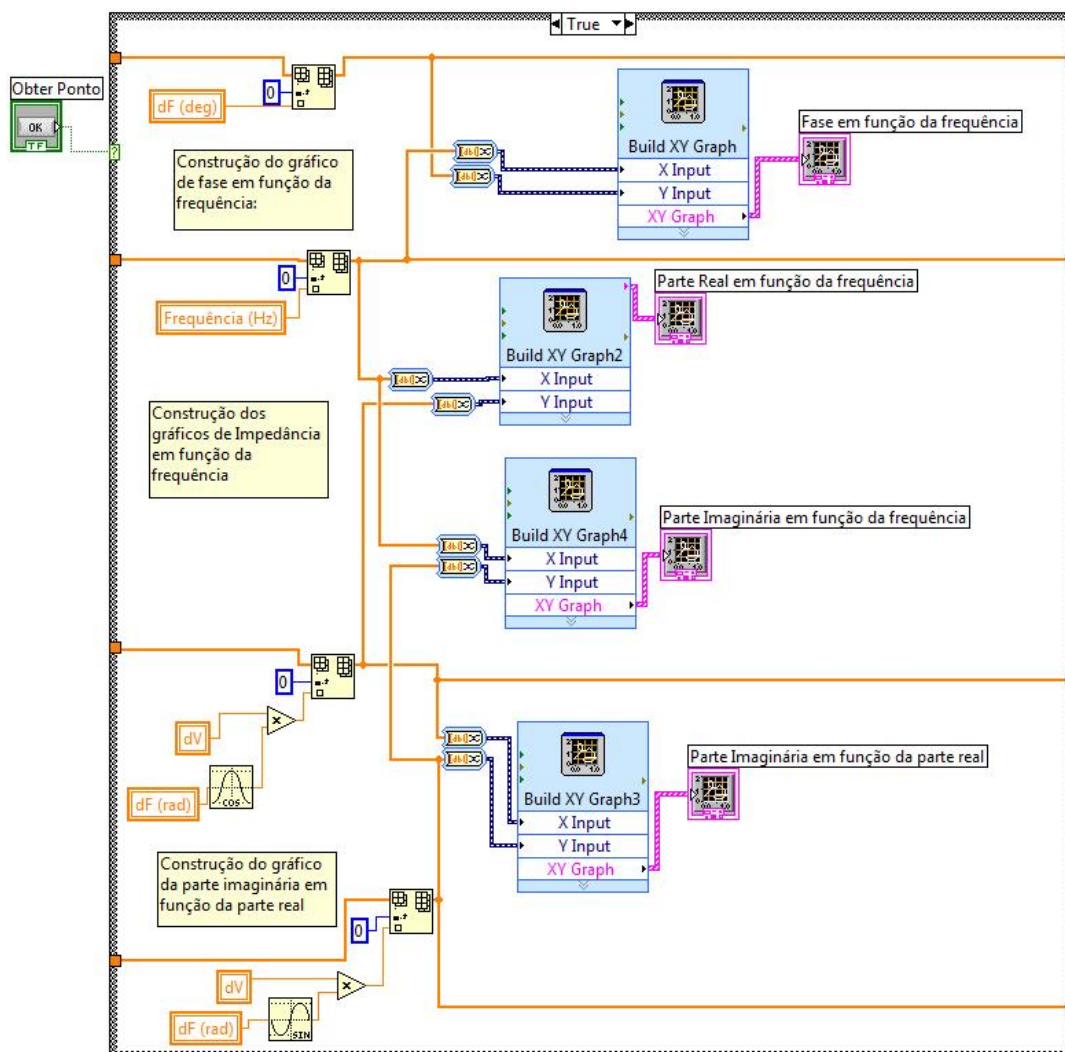


Figura 3.31: Diagrama de blocos do algoritmo de construção dos gráficos de impedância.

Manualmente o utilizador apenas teve que ir aumentando a frequência, inserida nos eléctrodos (sinal de entrada), no gerador de sinais e ir pressionando o botão de “Obter ponto”, presente no painel frontal do software, sempre que desejaria colocar nos gráficos esse determinado ponto nesses determinados parâmetros. O painel frontal deste programa está presente em anexo a esta dissertação (Anexo C - Painel frontal do teste com eléctrodos exteriores).

Após a obtenção, por parte do utilizador, de vários pontos consoante o aumento gradual da frequência do sinal de entrada, os respectivos gráficos construídos a partir desses pontos obtidos foram consequentemente guardados, assim como os próprios dados em questão (mediante a construção mais dois algoritmos presentes nas figuras 3.32 e 3.33). Ao longo do processo de obtenção de pontos, esses dados foram colocados em “arrays” que possibilitaram, no fim, guardá-los num ficheiro à parte para posterior manuseamento dos mesmos em folha de cálculo.

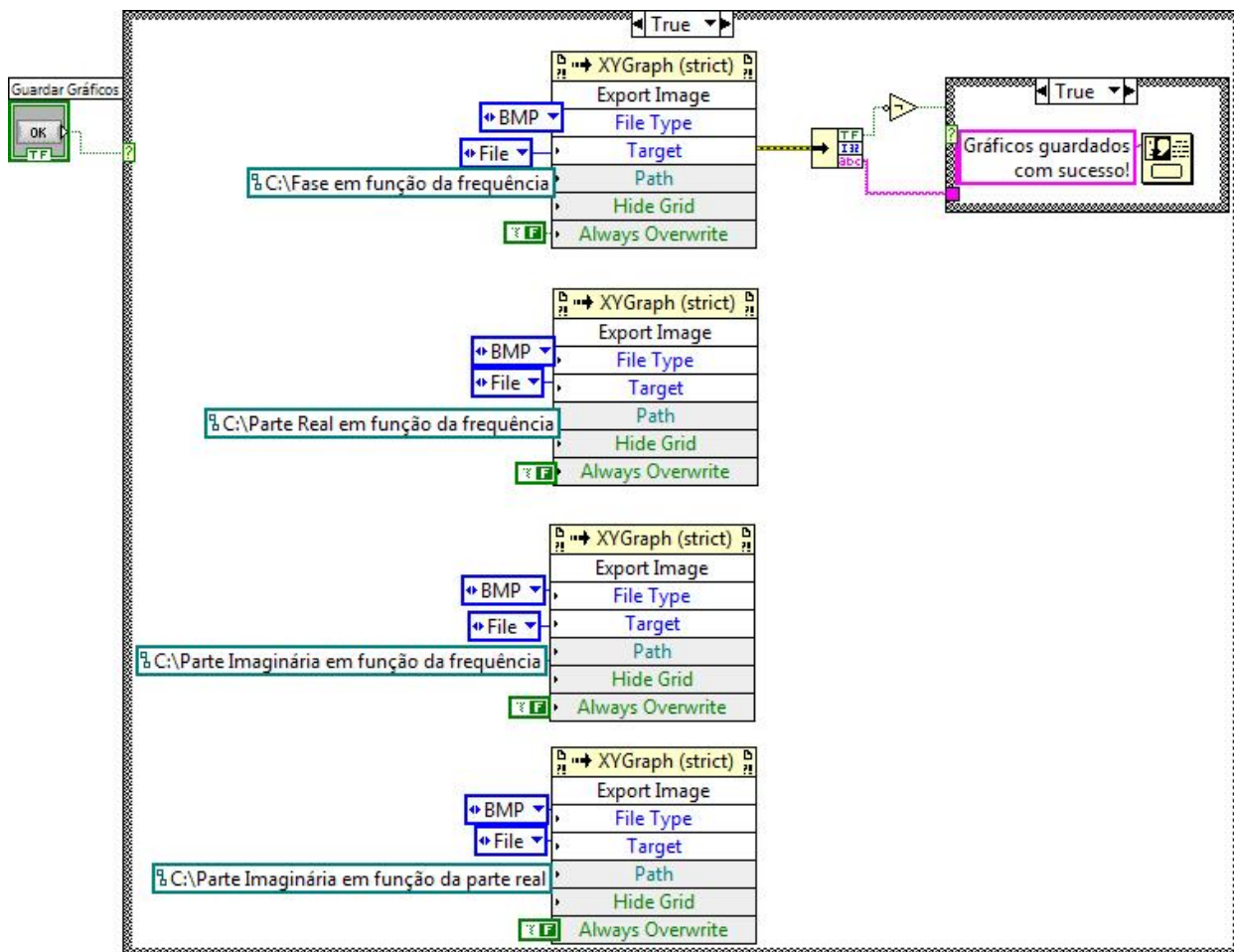


Figura 3.32: Diagrama de blocos do algoritmo do processo de guardar os gráficos.

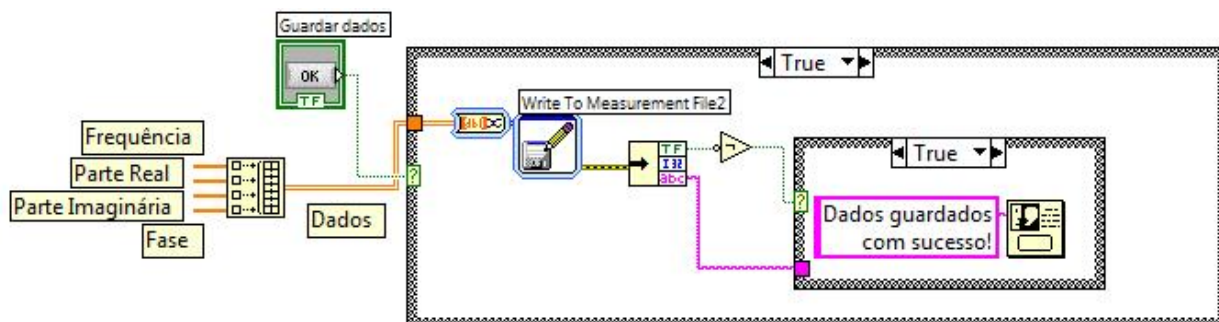


Figura 3.33: Diagrama de blocos do algoritmo do processo de guardar os "arrays" de dados.

A partir destes últimos algoritmos, podemos construir uma tabela em folha de cálculo com os dados gerados pelo utilizador (em anexo a esta dissertação - anexo B) e observar os mesmos a partir dos gráficos obtidos e guardados pelo software labview. Mediante a utilização deste software com todos estes processos e algoritmos realizados, procedeu-se ao teste, propriamente dito, do estudo de impedância de uma amostra de água colocada nos eléctrodos exteriores.

É importante referir novamente que este teste irá simular a impedância de uma amostra simples de água normal vista como um todo, ou seja, enquanto que o objectivo final será estudar uma amostra de sangue detalhada célula a célula, neste teste preliminar iremos ter presente as moléculas de água suspensas nos dois pares de eléctrodos. Assim, além de construirmos um algoritmo que possibilite o cálculo automático de impedância de substâncias, também podemos verificar o correcto funcionamento dos eléctrodos de ouro e de todas as comunicações com a placa de aquisição de dados e consequentemente com o software computacional.

Os resultados obtidos foram os seguintes:

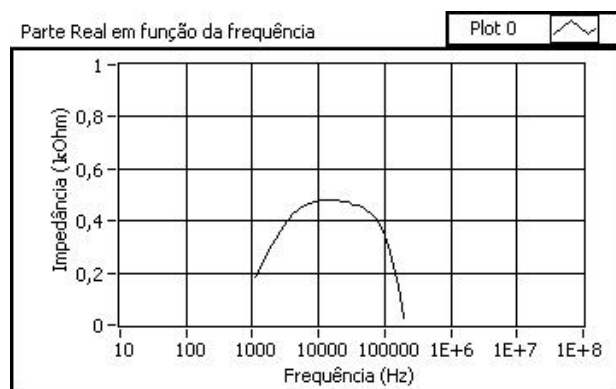


Figura 3.34: Gráfico da parte real da impedância da água em função da frequência, obtido em labview.

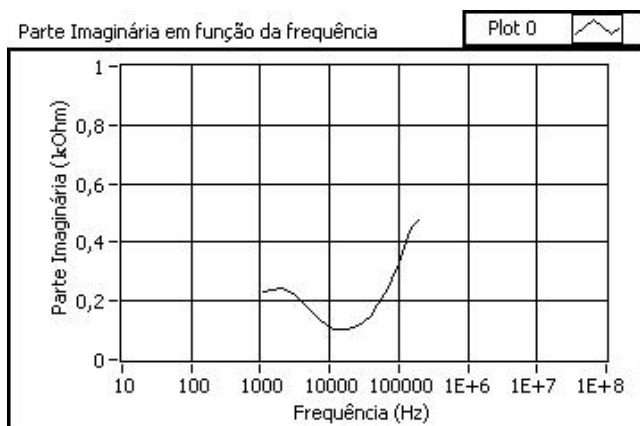


Figura 3.35: Gráfico da parte imaginária da impedância da água em função da frequência, obtido em labview.

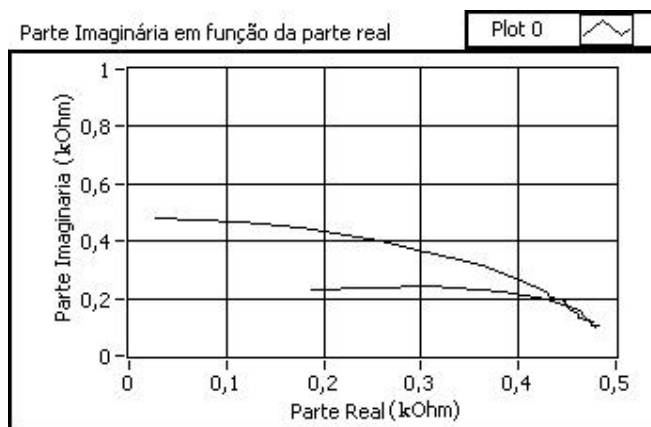


Figura 3.36: Gráfico da parte imaginária da impedância da água em função da parte real, obtido em labview.

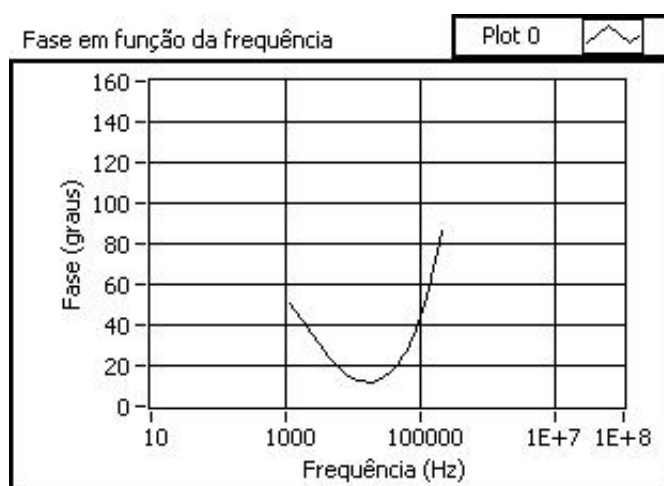


Figura 3.37: Gráfico da fase em função da frequência, relativo à água, obtido em labview.

Comparando estes resultados obtidos computacionalmente, a partir da utilização do software labview, com os resultados obtidos manualmente, a partir da medição individual dos dados mediante as características do osciloscópio, verificamos que os dados são muito semelhantes. No entanto, o desfasamento encontrado deve-se possivelmente à maior capacidade de rigor por parte deste último método, ou seja, o computacional, pois manualmente é muito provável que existam pequenos erros de medição por parte do utilizador. Outros possíveis factos para o desfasamento seriam o efeito da temperatura no estudo e o tempo total demorado no processo, pois quanto mais tempo decorre durante a experiência, maior quantidade de amostra é evaporada visto que os eléctrodos estão colocados ao ar livre e não em vácuo.

3.4 Testes prévios e simulação da técnica “AC Discrete Frequency System” em circuitos equivalentes

Como pudemos constatar, a técnica “AC Discrete Frequency System” apresentada no capítulo anterior é a que nos irá possibilitar obter os resultados pretendidos para este projecto, pelo que optámos proceder por este método e realizar alguns testes e simulações acerca do mesmo.

Com o objectivo de simular todo o esquema necessário para realização do estudo de espectroscopia de impedância aplicado à caracterização de células parasitadas numa plataforma de microfluídica, foi construído um modelo electrónico que, a partir das suas características, podemos realizar simulações e estudos prévios acerca desta técnica.

Ainda sem a utilização dos dispositivos de microfluídica, com os quais iremos poder fazer passar por um microcanal uma única célula até ao local de estudo e análise e assim obter resultados sobre uma determinada amostra, procedemos primeiro a uma montagem de um modelo idêntico, construído em placa “breadboard”. A “AC Discrete Frequency System”, como já foi referido anteriormente, baseia-se na seguinte montagem eléctrica:

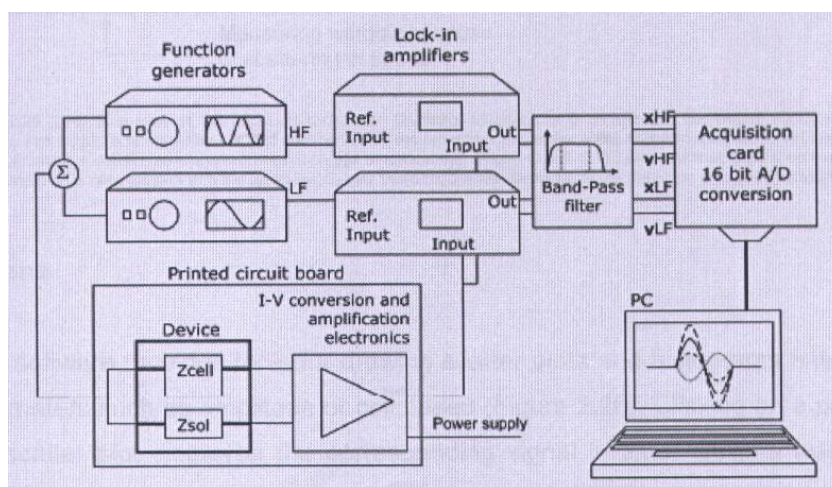


Figura 3.38: Montagem eléctrica da técnica “AC Discrete Frequency System” (adaptado de Nascimento, 2006).

Respeitando a montagem global desta técnica, procedemos então à criação dos dois sinais de tensão AC a partir de dois geradores de sinais “TTi TG200 20 MHz Function Generator” (figura 3.39), um com uma frequência de 8,7 MHz (frequência alta) e outro com uma frequência de 85 kHz (frequência baixa). A amplitude foi a mesma para ambos os sinais, de valor 250 mVrms.

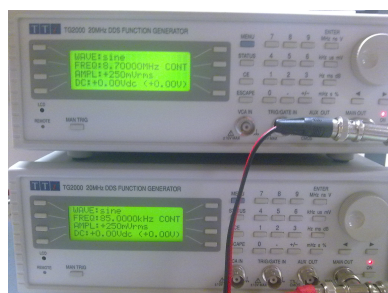


Figura 3.39: Geradores de funções.

Com base no MULTISIM (software de simulação de circuitos eléctricos) simulou-se um simples somador de ondas a partir de duas resistências de $500\ \Omega$ (figura 3.40) e observaram-se as mesmas a partir do osciloscópio interactivo integrado no próprio software (figuras 3.41 e 3.42):

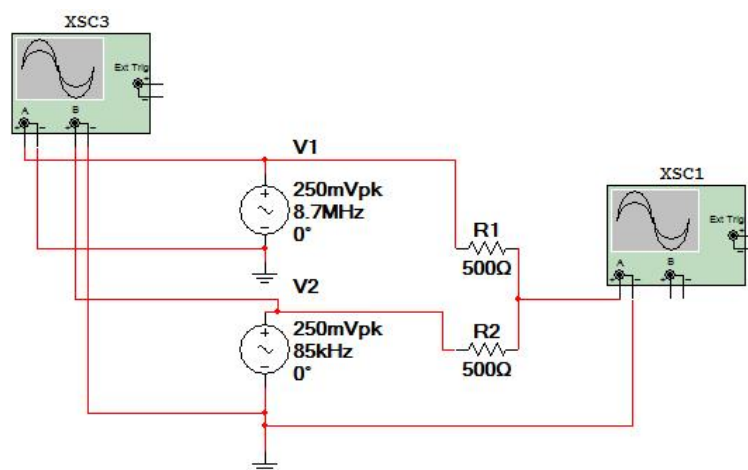


Figura 3.40: Circuito eléctrico, simulado com o programa MULTISIM, de um simples somador de duas ondas.

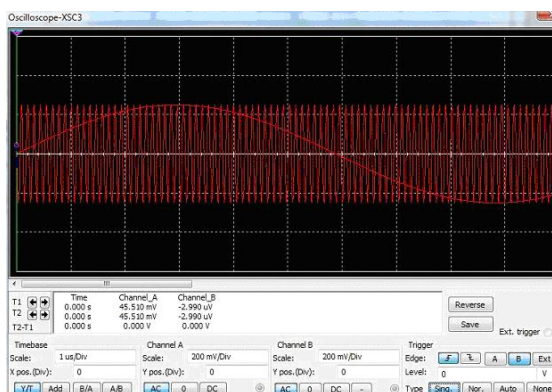


Figura 3.41: Visualização do osciloscópio digital do circuito onde estão presentes as ondas geradas.

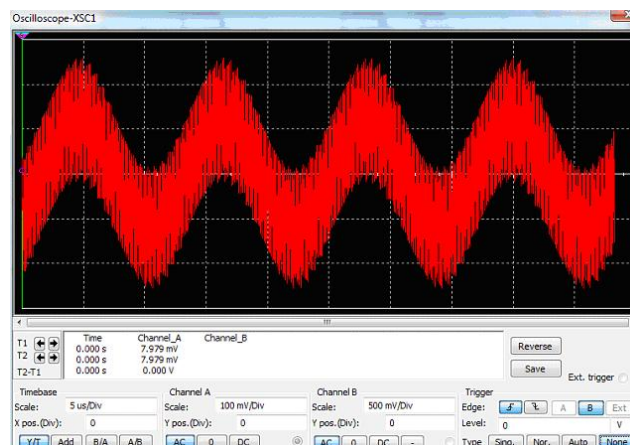
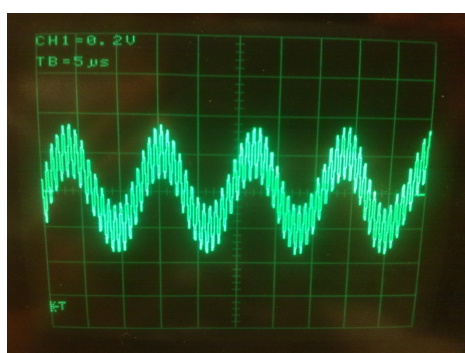
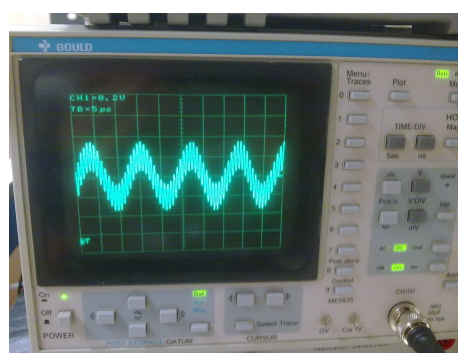


Figura 3.42: Visualização do osciloscópio digital do circuito onde estão presentes as ondas somadas.

Seguiu-se a montagem do mesmo circuito em placa “breadboard” confirmando o resultado com um osciloscópio digital:



(a)



(b)

Figura 3.43: Ondas somadas em placa “breadboard” e posteriormente inseridas no osciloscópio laboratorial.

Com os dois sinais já somados, procedemos então à simulação da passagem de uma célula. O esquema electrónico utilizado para tentativa de reproduzir a impedância de uma única célula resume-se em colocar resistências e condensadores electrolíticos em série e em paralelo. Este método será apenas uma simples aproximação da complexidade de uma verdadeira célula (Cheung et al., 2005; Gawad et al., 2004; Schade-Kampmann et al., 2008; Küttel et al., 2007).

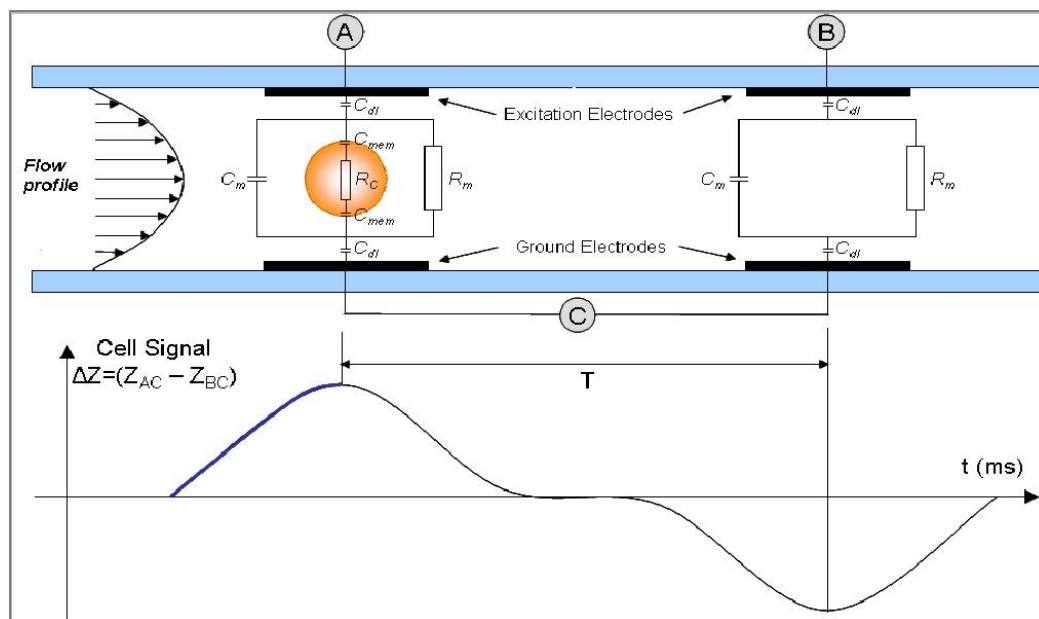


Figura 3.44: (Em cima) Circuitos eléctricos de simulação de células biológicas na passagem pelos eléctrodos, ou seja, na região de aquisição de resultados, num dispositivo de microfluídica. (Em baixo) Sinal esperado a partir da diferença da impedância entre AC e BC (adaptado de Kim e Ligler, 2010).

A figura acima mostra-nos então a possibilidade de reproduzir/simular este método sem a utilização de amostras em chips de microfluídica, mas sim com simples circuitos eléctricos.

Após montados estes determinados circuitos em placa “breadboard” que possibilitarão a simulação da passagem de células pelo microcanal, vamos inserir as nossas ondas já somadas nos eléctrodos simulados A e B, obtendo a resposta dos mesmos em C. A resposta irá passar pelo amplificador diferencial que irá proceder à amplificação da diferença da corrente resultante obtida nos dois eléctrodos em C.

Acompanhando o esquema deste método, e realizando agora o respectivo tratamento do sinal obtido, ou seja, da corrente obtida vinda dos eléctrodos e que contém a informação acerca da impedância, vamos inseri-lo em dois amplificadores lock-in (“EG&G Princeton Applied Research model 5202” e “Stanford Research Systems model SR830 DSP”) que vão, além de filtrar o sinal, extrair a informação acerca da impedância (demodulação do sinal) que é necessária para o nosso estudo. Os amplificadores lock-in (figura 3.45) irão funcionar com as frequências de referência geradas ao início, ou seja, alta-frequência de 8,7 MHz e baixa-frequência de 85 kHz que serão inseridas respectivamente no modelo 5202 e no SR830.

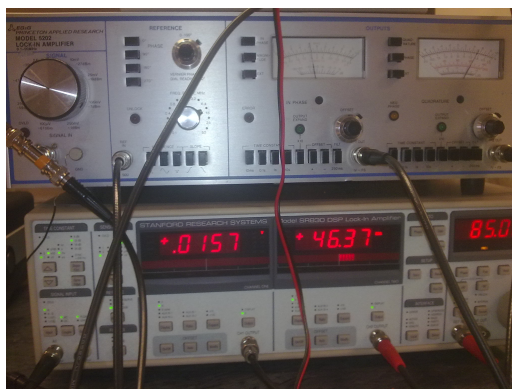
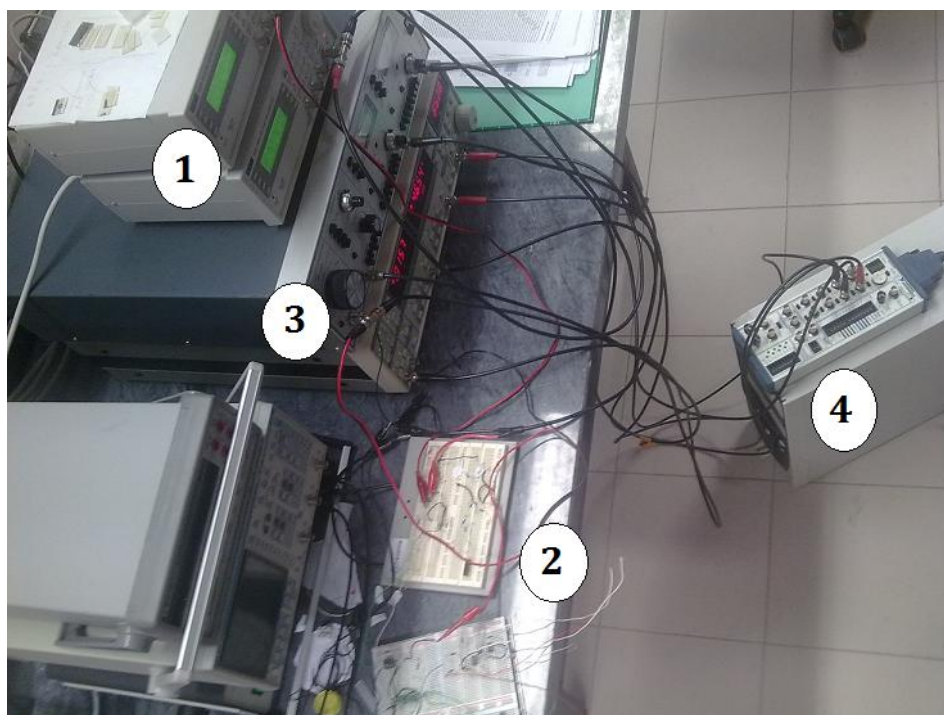


Figura 3.45: Figura representativa dos dois amplificadores lock-in em funcionamento.

Iremos obter, a partir dos lock-ins, 4 sinais. Um componente X (em fase), que corresponde à parte real do sinal, e um componente Y (fora de fase), que corresponde à parte imaginária do sinal, para cada frequência. Outros parâmetros como a amplitude, fase e râtios podem depois ser calculados a partir destes sinais.

Por fim, o armazenamento e observação dos resultados foi realizado por um computador, mediado por uma placa de aquisição de dados e conversor analógico/digital NI DAQ PCI6024E juntamente com um BNC2120 e, por último, executado utilizando o software LABVIEW.

Toda a montagem laboratorial é apresentada na seguinte figura:



LEGENDA:

- 1- Geradores de sinais;
- 2- Montagem em "breadboard" dos circuitos;
- 3- Amplificadores Lock-in;
- 4- Placa de aquisição de dados e conversor A/D;

Figura 3.46: Montagem laboratorial de todo o esquema.

Os resultados obtidos a partir deste circuito montado em “breadboard” tiveram como objectivo verificar a passagem de uma célula fictícia pelos eléctrodos simulados. Com esta finalidade foi montado um potenciómetro entre os eléctrodos que substituiu os dois condensadores C_{mem} e a resistência R_c no circuito eléctrico de simulação de células biológicas. Esta modificação no circuito possibilitará colocar uma determinada resistência eléctrica, consoante o alcance do potenciómetro, durante uma determinada quantidade de tempo desejada. Ora, como as células passam no microcanal com uma determinada velocidade fazendo variar num curto espaço de tempo a resistência presente entre os eléctrodos, o potenciómetro simulará o mesmo procedimento se for rapidamente variado o seu valor de resistência. Assim, através deste método, podemos verificar a passagem de células pelos dois eléctrodos simulados. Os resultados pretendidos baseiam-se na obtenção de picos intercalados, positivos e negativos, consoante a passagem no primeiro eléctrodo ou no segundo. As durações dos picos vão estar directamente dependentes da velocidade da passagem das células que, neste caso, é representada pela rapidez de mudança da resistência do potenciómetro. A diferença entre o sinal de cada eléctrodo oposto vai então ser realizada pelo amplificador diferencial, pelo que a sua amplificação foi regulada para funcionar com um ganho de 5. Posteriormente o sinal demodulado vindo dos amplificadores lock-in vai ser inserido na placa de aquisição de dados e recebido a partir de um simples algoritmo construído em labview (Anexo D – Diagrama de blocos e respectivo painel frontal do algoritmo de aquisição dos dados vindos dos amplificadores lock-in). Observamos, a partir deste último anexo, que os quatro valores obtidos através dos lock-ins estão presentes no software, pelo que a conversão analógico/digital realizada pela placa de aquisição de dados é feita com sucesso. Verificamos também que além dos dados obtidos da parte real e da parte imaginária também se procedeu ao cálculo da magnitude e da fase para cada frequência a partir das fórmulas:

$$Fase = \arctan\left(\frac{Y}{X}\right) \quad (3.1)$$

$$Magnitude = \sqrt{X^2 + Y^2} \quad (3.2)$$

A partir deste ponto em que temos à nossa disposição todos os dados acerca das características celulares, nomeadamente volume celular obtido a baixas-frequências e propriedades dieléctricas a altas-frequências, vamos proceder então à simulação da passagem de algumas células pelos eléctrodos fictícios. Neste teste apenas realizámos a detecção da passagem das células, pelo que apenas foi necessário a utilização dos dados acerca do volume celular, ou seja, à frequência correspondente a 85 kHz. No entanto a utilização desses dados só foi possível mediante a construção de novo algoritmo em labview que possibilitou guardar essa informação para posterior criação de um gráfico pormenorizado em folha de cálculo (figura 3.47).

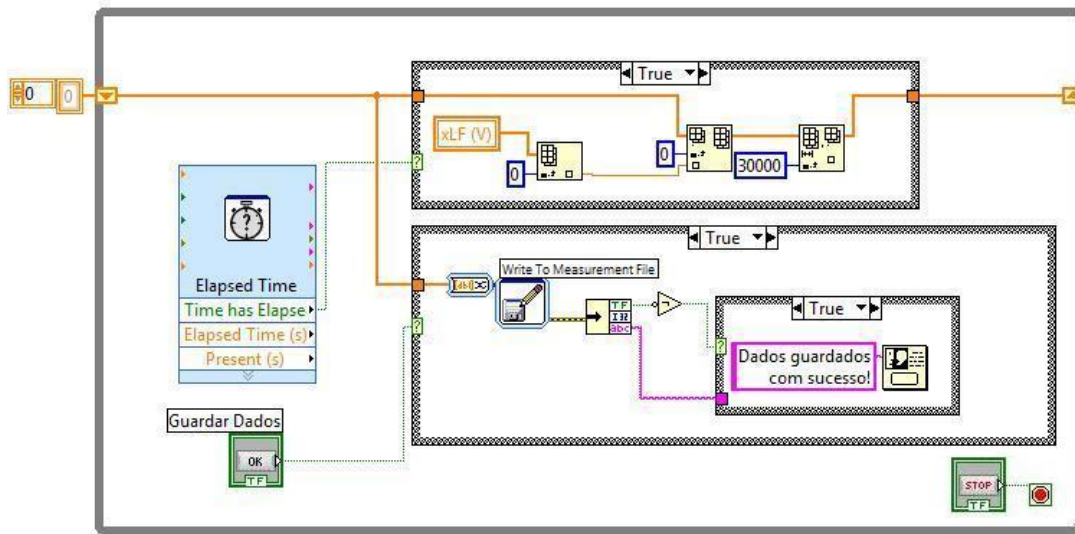


Figura 3.47: Diagrama de blocos do algoritmo para guardar os dados obtidos.

Este diagrama de blocos apresentado retrata a construção de um “array” de dados que possibilita o armazenamento da informação acerca dos dados que foram obtidos através da placa de aquisição. É neste “array” que são colocados, neste caso, os dados da amplitude da parte real do sinal de baixa-frequência pois apenas este conjunto de dados é o necessário para a detecção da presença de uma célula entre os eléctrodos. Após modificarmos por várias vezes os valores da resistência do potenciômetro no circuito eléctrico e guardarmos os dados obtidos através do painel frontal do labview, verificámos a simulação da passagem de células fictícias pelos eléctrodos através da construção de um gráfico, em folha de cálculo, da amplitude da parte real do sinal de baixa-frequência em função do tempo (figura 3.48).

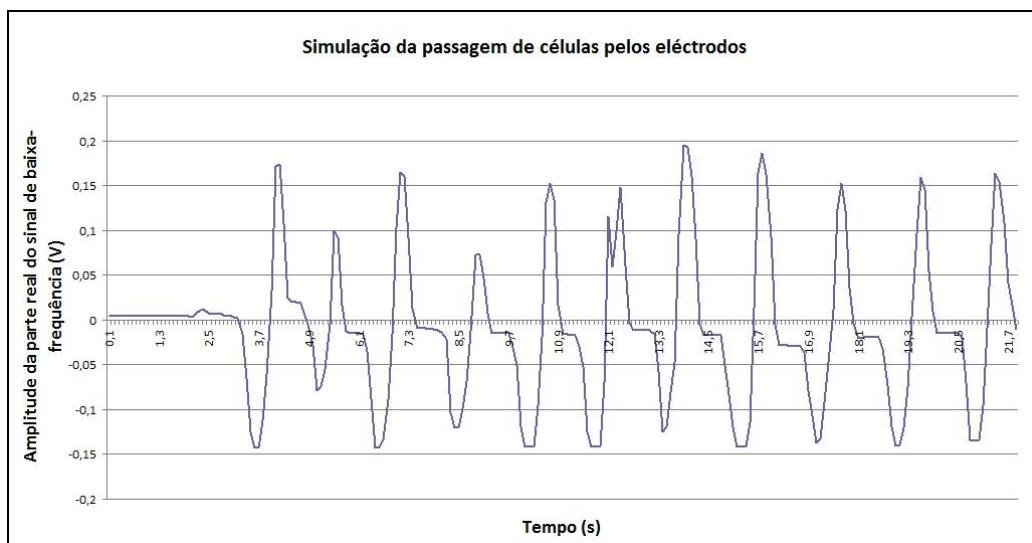


Figura 3.48: Gráfico da simulação da passagem de células pelos eléctrodos fictícios.

Como era de esperar obtivemos um conjunto de dados interessantes em que podemos verificar a simulação da passagem de 11 células fictícias através dos eléctrodos construídos em “breadboard”. Obtivemos os esperados picos intercalados entre valores positivos e negativos que estão coerentes com a passagem pelo primeiro eléctrodo e consequentemente pelo segundo. Verificamos uma pequena duração dos picos pois a simulação foi realizada com um fluxo rápido de células. Em cerca de 21 segundos de teste foram simuladas 11 células, pelo que faz um fluxo de aproximadamente uma célula por cada 2 segundos.

Em conclusão podemos afirmar que a partir deste teste realizado é possível obter uma clara detecção de células a passar por dois pares de eléctrodos utilizando o método “AC Discrete Frequency System”. Toda a instrumentação está então pronta e apta para a realização das experiências com os dispositivos de microfluídica.

3.5 Espectroscopia de impedância utilizando a técnica "AC Discrete Frequency System" aplicada a amostras biológicas utilizando chips de microfluídica

Após todas as simulações e testes realizados acerca da técnica de espectroscopia de impedância e após verificarmos que toda a instrumentação necessária ao processo está de acordo com o desejado, ou seja, conseguimos obter resultados a partir de toda a montagem realizada, procederemos finalmente à obtenção de resultados utilizando um fluxo de amostra biológica nos dispositivos de microfluídica previamente fabricados. O objectivo deste projecto, como já foi referido, será identificar células parasitadas de entre uma amostra biológica de eritrócitos, utilizando a técnica de espectroscopia de impedância. Devido à falta de amostras frescas de eritrócitos parasitados na altura da realização destes testes, este processo decorreu a partir da caracterização de "beads" fluorescentes de poliestireno ("Duke Scientific Corporation, CA, USA"). Estas microesferas ou micropartículas apresentam características ideais para a realização dos nossos testes. Além de apresentarem tamanhos variáveis, estas também têm uma impedância considerável pois são constituídas por um material polimérico sólido com uma ampla variedade de densidades. No sentido de podermos apresentar resultados o mais próximo dos desejados, as microesferas ("beads") utilizadas têm um tamanho de $6\ \mu\text{m}$ e de $10\ \mu\text{m}$, sendo que estes dois tipos de microesferas são feitos do mesmo material para poder existir uma base de comparação de impedância entre as duas. Como estas pequenas esferas estão em soluções bastante concentradas quando vêm de origem, foi necessário proceder a uma diluição das mesmas com o objectivo de impedir que obstruam o microcanal aquando da passagem da amostra pelo dispositivo de microfluídica. Como já concluímos anteriormente neste mesmo capítulo, o PBS apresenta boas características de diluição de soluções. Tendo em conta esses resultados juntámos a uma pequena amostra de "beads" uma quantidade de PBS de pH 7,4 com uma condutividade de $1,55\ \text{S/m}$, ficando a solução com uma concentração de aproximadamente $4\text{-}5 \times 10^6$ "beads"/ml.

Com as duas soluções preparadas com as amostras de "beads" de $6\ \mu\text{m}$ e $10\ \mu\text{m}$, preparouse o dispositivo de microfluídica para a realização da experiência laboratorial. No capítulo 2 foi referido o método de "pressure driven flow" para inserção do líquido/amostra no chip. Esta técnica utiliza um sistema de pressão adequado para fazer inserir o líquido nos canais. Um pequeno volume da solução preparada anteriormente é então colocado nos "inlets" centrais e posteriormente é colocada mais uma amostra de PBS nos orifícios laterais para a realização da focagem hidrodinâmica. Por sua vez o dispositivo é selado superiormente com uma placa de PMMA (polimetil-metacrilato) que é um material termoplástico ou polímero rígido, transparente e incolor que muitas vezes é denominado simplesmente de acrílico, com o objectivo de podermos conectar o sistema de pressão aos "inlets" e "outlets".

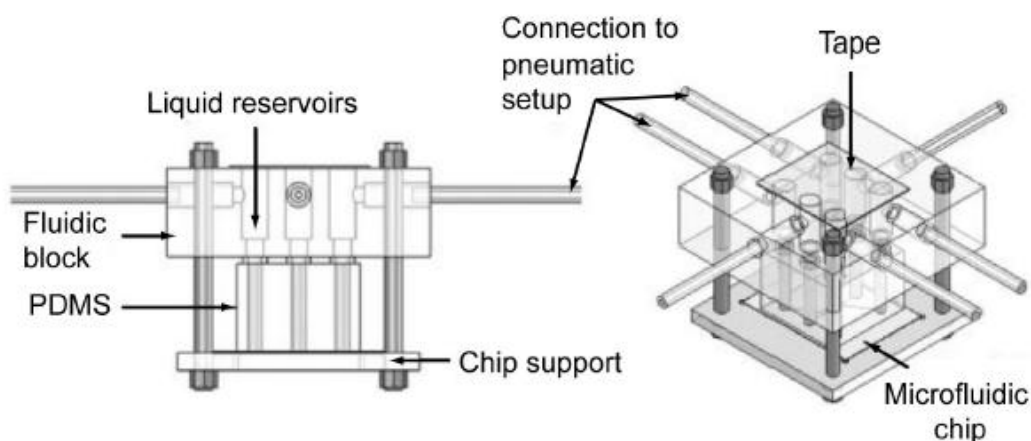


Figura 3.49: Sistema de pressão utilizado para fazer inserir a amostra no chip de microfluídica (adaptado de Demierre, 2008).

Podemos observar nesta última figura o método de pressão utilizado para fazer inserir o líquido com a amostra no dispositivo de microfluídica. A esta estrutura é então conectado o sistema pneumático às entradas laterais por onde é inserida a pressão e posteriormente é colocado um tampão na parte superior do PMMA onde estão localizados os orifícios que estão em contacto com as entradas e saídas (“inlets” e “outlets”). Após a colocação da amostra e do PBS por esses orifícios superiores até aos reservatórios, estes serão tapados com uma fita adesiva de forma a evitar que, com o aumento da pressão, o líquido seja expelido naquela direcção impedindo assim a sua entrada no chip. Toda a estrutura é então posteriormente colocada sob o microscópio com uma ampliação de 600 vezes de forma a possibilitar a visualização da passagem das “beads” pelo microcanal.

De referir que antes da montagem do chip de microfluídica nesta estrutura, procedeu-se à ligação dos fios condutores às extremidades dos eléctrodos do chip. Estes fios eléctricos foram soldados ao dispositivo (figura 3.50) de forma a garantir a perfeita conexão entre a electrónica envolvente e os eléctrodos no chip.

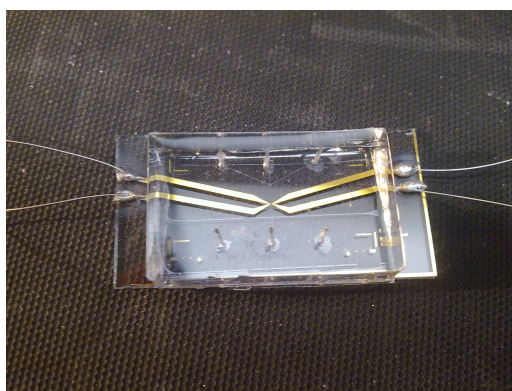
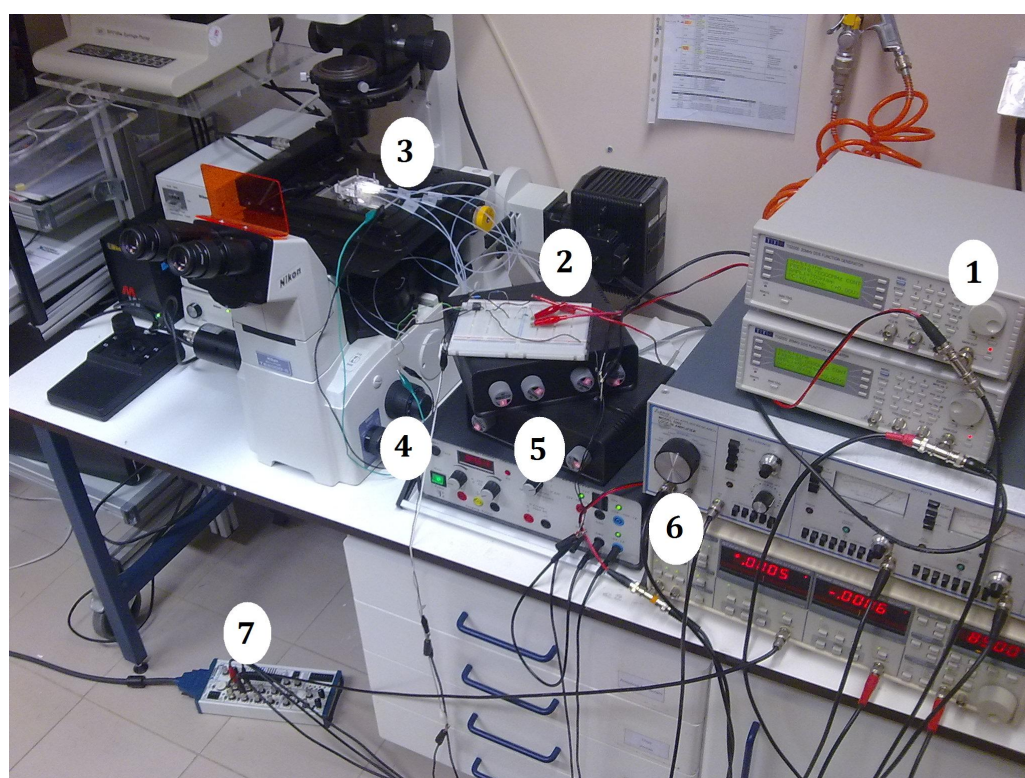


Figura 3.50: Imagem do chip com os fios condutores soldados aos eléctrodos.

Por fim procedeu-se a toda a montagem da instrumentação necessária para a realização da experiência laboratorial. A estrutura construída foi semelhante à simulação anteriormente feita em eléctrodos e células fictícias. No entanto desta vez as comunicações foram realizadas nos verdadeiros dispositivos de microfluídica em vez de eléctrodos simulados em "breadboard". As únicas montagens realizadas em "breadboard" foram o circuito somador das duas ondas de alta e baixa-frequência e o amplificador operacional que desta vez foi modificado para trabalhar com um ganho de 50.

A seguinte figura apresenta toda a montagem laboratorial completa deste método para aplicação a amostras biológicas utilizando dispositivos de microfluídica:



Legenda:

- 1- Geradores de sinais;
- 2- Circuito somador e amplificador operacional;
- 3- Dispositivo de microfluídica;
- 4- Alimentação do amplificador operacional;
- 5- Sistema de pressão;
- 6- Amplificadores lock-in;
- 7- Placa de aquisição de dados;

Figura 3.51: Montagem laboratorial do esquema global do método "AC Discrete Frequency System" aplicado a amostras biológicas utilizando dispositivos de microfluídica.

A comunicação feita com a placa de aquisição de dados é idêntica à realizada quando da simulação anterior, no entanto existiu uma pequena modificação em relação ao diagrama de blocos e correspondente painel frontal utilizado no labview. Para facilitar a identificação automática da passagem de células, neste caso "beads", pelo microcanal do dispositivo, foi inserido um gráfico, no painel frontal (figura 3.52), da amplitude da parte real do sinal de baixa-frequência em função do tempo.

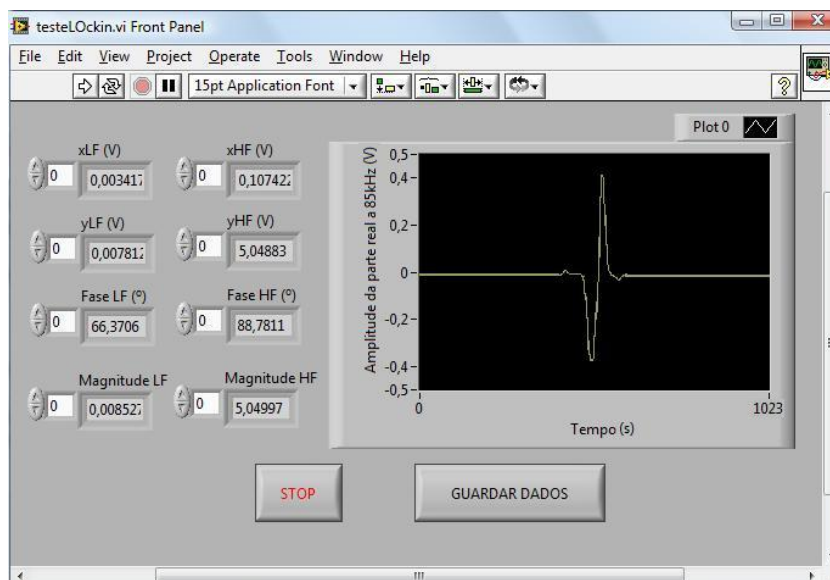


Figura 3.52: Painel frontal de obtenção dos dados.

Assim, durante a realização da experiência laboratorial, podemos rapidamente identificar a passagem de uma célula pelo local de caracterização eléctrica, ou seja, o local onde estão presentes os eléctrodos no microcanal, sempre que este gráfico apresentar os respectivos picos intercalados entre positivos e negativos. Este método em conjunto com a observação ao microscópio identifica claramente se uma “bead” está a passar ou não no microcanal.

Outra modificação realizada ao diagrama de blocos utilizado na simulação precedente foi a forma utilizada de guardar os dados obtidos a partir da placa de aquisição de dados. Em vez de construirmos apenas um “array” de dados, foram construídos quatro “arrays” para podermos armazenar todos os valores recebidos dos amplificadores lock-in acerca da parte real e imaginária existente para ambas as frequências. Toda esta informação vai ser necessária pois desta vez não queremos apenas observar as células a passar pelo microcanal, mas também queremos poder distingui-las pela sua dimensão e impedância. O novo diagrama de blocos construído para guardar todos os dados obtidos a partir da placa de aquisição de dados.

Iniciámos a experiência laboratorial com a inserção da solução de “beads” de $6 \mu\text{m}$ de diâmetro no dispositivo de microfluídica. As ondas de tensão AC de 85 kHz (baixa-frequência) e 8,7 MHz (alta-frequência) com uma amplitude de $250 \text{ mV}_{\text{rms}}$ foram produzidas pelos geradores de sinais, somadas a partir das mesmas resistências de 500Ω anteriormente utilizadas, e injectadas nos eléctrodos do chip. Os fios condutores dos eléctrodos opostos foram ligados ao amplificador operacional devidamente alimentado e a funcionar com um ganho de 50 e consequentemente o sinal resultante é inserido nos amplificadores lock-in que vão demodular o sinal a partir das ondas de referência geradas inicialmente. O sistema de pressão de ar é colocado em funcionamento nos 3 “inlets”

e o líquido começa a fluir pelo dispositivo de microfluídica. Verificámos a passagem de "beads" através da zona de caracterização eléctrica a partir do gráfico da amplitude da parte real do sinal de baixa-frequência em função do tempo, presente no painel frontal do nosso programa em funcionamento, tal como a partir da observação ao microscópio. Os "arrays" foram preenchidos com os dados recolhidos vindos dos amplificadores lock-in através da placa de aquisição de dados que converteu essa informação analógica em digital e procedeu-se ao armazenamento dos mesmos em folha de cálculo. Primeiramente e tal como na simulação construiu-se um gráfico apenas da amplitude da parte real do sinal para a baixa-frequência de 85 kHz no sentido de podermos confirmar a passagem das "beads" pela zona de caracterização eléctrica do chip.

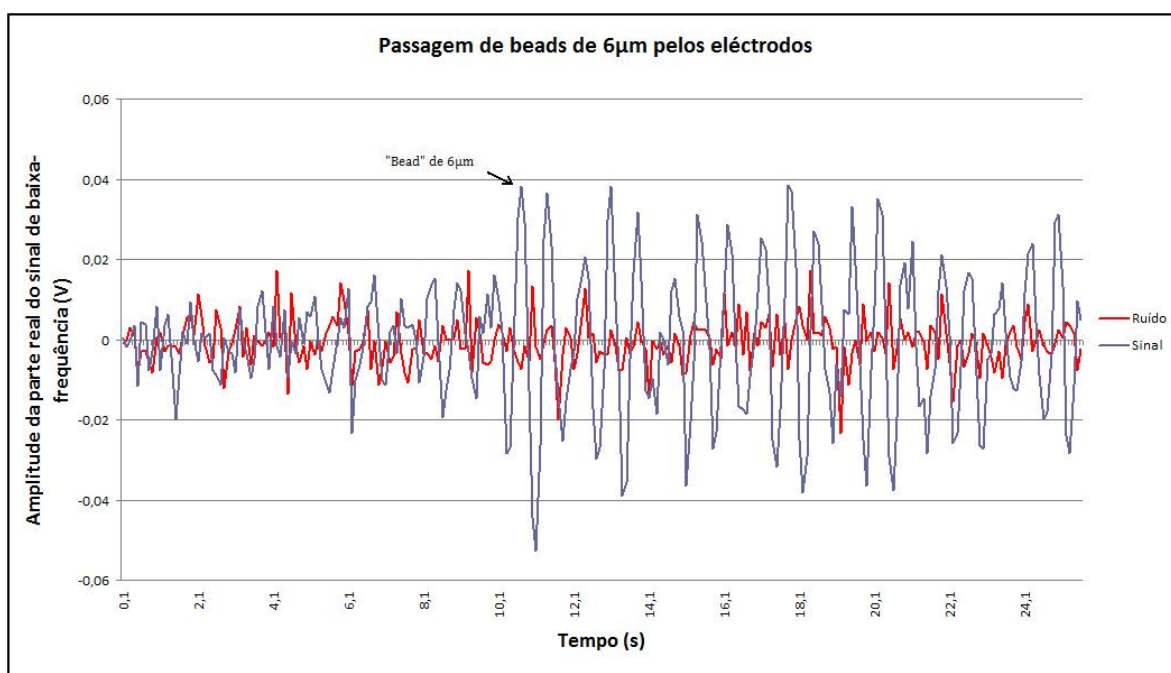


Figura 3.53: Gráfico da passagem das "beads" de 6 µm pelos eléctrodos.

Como podemos observar pelo gráfico apresentado acima, a partir aproximadamente dos 10 segundos as "beads" começaram a passar pela zona de caracterização eléctrica. É a partir deste ponto que o sinal apresenta valores mais elevados quando comparados com o ruído envolvente, valores esses correspondentes aos picos intercalados entre positivos e negativos já obtidos e verificados anteriormente através da simulação. A partir destes dados podemos verificar a passagem de cerca de 13 "beads" de 6 µm pelos eléctrodos. No entanto apenas com estas conclusões não conseguiríamos identificar as células parasitadas das saudáveis. É necessária a utilização dos restantes dados acerca da impedância, nomeadamente os dados relativos à parte real e imaginária do sinal de alta-frequência que dizem respeito às propriedades dieléctricas e de impedância em si. Para isso, procedeu-se a novo ensaio desta vez utilizando a outra solução preparada de

"beads" com 10 μm de diâmetro. Se conseguirmos distingui-las não só pelo tamanho destas como também pelos seus dados acerca da impedância, podemos então chegar a uma conclusão semelhante para glóbulos vermelhos parasitados e normais.

Após novo ensaio, desta vez utilizando as "beads" maiores, e construídos todos os "arrays" de dados necessários com informação referente a várias passagens de esferas de poliestireno pelo local de caracterização eléctrica, construiu-se um gráfico, desta vez relativo à correlação entre a magnitude do sinal a alta-frequência em função do sinal a baixa-frequência, no sentido de conseguirmos discriminar os dois tipos de "beads".

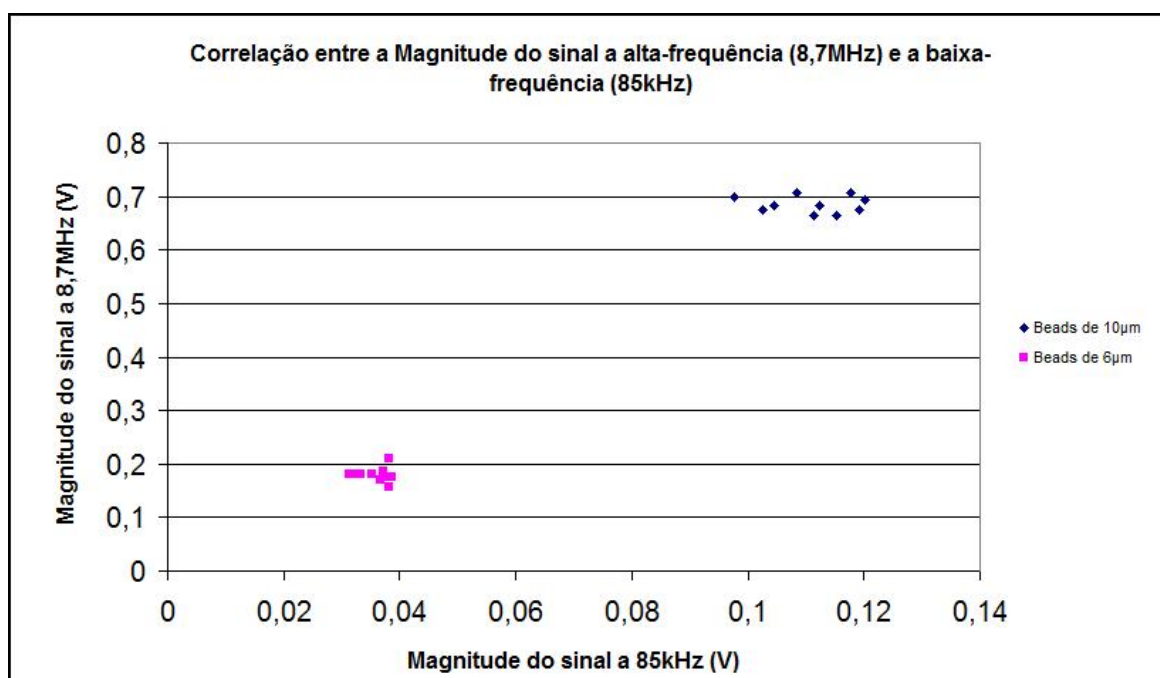


Figura 3.54: Gráfico da magnitude do sinal a 8,7 MHz em função da magnitude do sinal a 85 kHz.

Como podemos observar a partir deste último gráfico em que utilizamos todos os dados obtidos a partir dos amplificadores lock-in, não só conseguimos distinguir as "beads" pelos diferentes tamanhos a partir da informação que nos é disponibilizada pela magnitude do sinal a baixa-frequência, como também as conseguimos distinguir pelas características dieléctricas e impedância das mesmas a partir da informação disponibilizada pela magnitude do sinal a alta-frequência. É a partir desta apresentação gráfica e desta distribuição de dados que vai ser possível observar diferenças entre eritrócitos parasitados e eritrócitos normais. A importância destes dados centra-se no conceito de opacidade que é definido como o quociente entre a magnitude do sinal obtido a alta-frequência e a magnitude do sinal obtido a baixa-frequência (equação 3.3).

$$Opacidade = \frac{|Z_{HF}|}{|Z_{LF}|} \quad (3.3)$$

Relativo às "beads", o valor de opacidade vai-se manter constante pois à medida que o tamanho destas aumenta o seu valor de impedância também aumenta de uma forma proporcional. Esta teoria pode ser observada tanto a partir dos dados obtidos sobre as "beads" de 10 μm e 6 μm na nossa experiência laboratorial como também a partir de dados já publicados em artigos internacionais (Cheung et al., 2005).

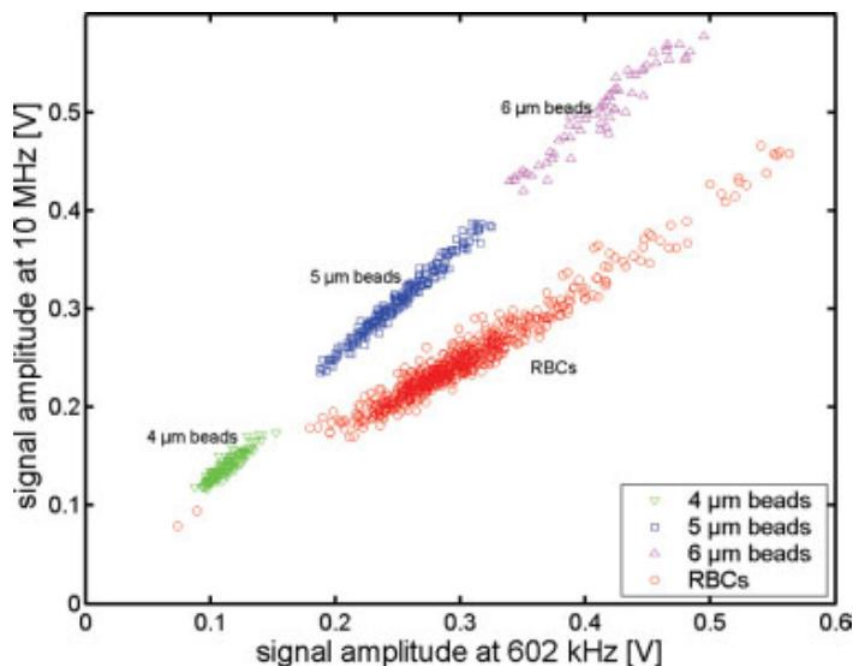


Figura 3.55: Dados sobre espectroscopia de impedância acerca de "beads" e eritrócitos não parasitados (adaptado de Cheung et al., 2005).

Apesar dos dados já publicados terem sido realizados mediante outras condições de aquisição de resultados, nomeadamente utilizando um sinal de baixa-frequência de 602 kHz e um sinal de alta-frequência de 10 MHz (figura 3.55), as conclusões base são muito idênticas às obtidas neste projecto e verificamos que, tanto a partir dos dados já publicados como nos obtidos laboratorialmente, o valor da opacidade para as "beads" de diferentes diâmetros não varia e nota-se um declive constante para as linhas de tendência inerentes aos respectivos dados.

Relativamente ao estudo em eritrócitos, estes apresentam tamanhos muito similares havendo apenas uma ligeira variação no diâmetro. Assim o valor de opacidade entre os eritrócitos parasitados e os eritrócitos normais vai variar. Assumindo que o volume dos glóbulos vermelhos não varia, a magnitude do sinal obtido a baixa-frequência vai-se manter aproximadamente constante enquanto que a magnitude do sinal obtido a alta-frequência sofre alterações, consoante o facto das células estarem parasitadas ou não. Como os parasitas vão afectar a permeabilidade da membrana plasmática para permitir a entrada de iões e nutrientes necessários à sua subsistência, a impedância de uma célula

debitada deste tipo vai ser menor, contribuindo para um decréscimo do valor de opacidade. Se, por qualquer razão, existisse uma diminuição na condutividade do citoplasma de uma célula causado pelo decréscimo da mobilidade de íões pela mesma, o valor de impedância iria ser maior e conseqüentemente o valor de opacidade iria aumentar.

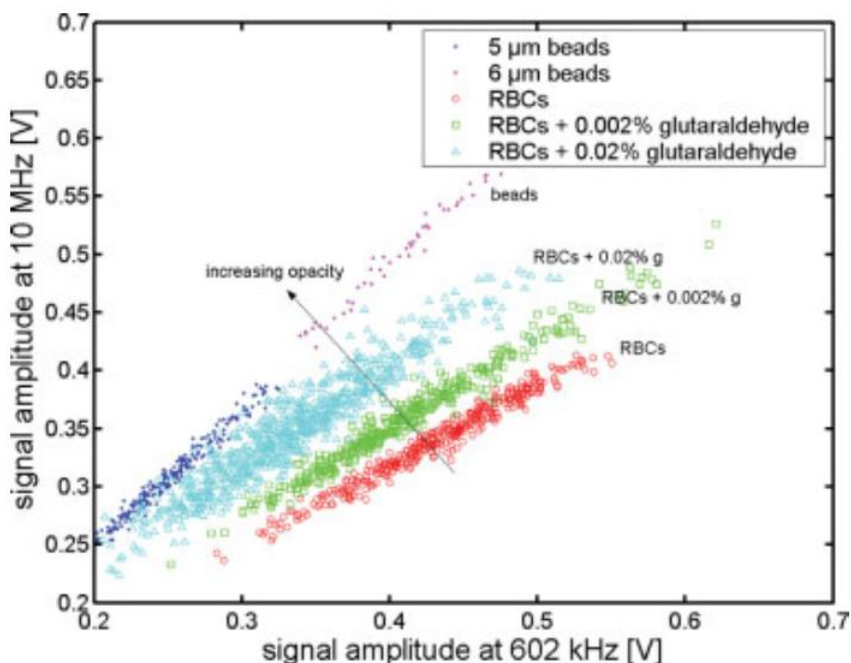


Figura 3.56: Estudo sobre espectroscopia de impedância de "beads" e eritrócitos quimicamente modificados (adaptado de Cheung et al., 2005).

Esta linha de raciocínio pode ser confirmada a partir de um estudo realizado com eritrócitos quimicamente modificados a partir da adição de glutaraldeído (figura 3.56), que é um dialdeído saturado com fórmula química $C_5H_8O_2$, que reduz a deformação celular e leva a um decréscimo da mobilidade de íões a partir da formação de ligações covalentes entre as partes aminas primárias das proteínas presentes na membrana plasmática. Assim, o valor da impedância e magnitude a alta-frequência vai aumentar para estas células que conseqüentemente implicará um aumento observável no valor de opacidade, comprovado a partir desta última figura apresentada.

Contrariamente a este estudo as células parasitadas que são a base deste projecto, vão-se apresentar distribuídas no sentido inverso das células quimicamente modificadas com glutaraldeído. O declive relativo às linhas de tendência inerentes aos dados destas vai ser menor em comparação aos dados relativos aos glóbulos vermelhos saudáveis. No entanto a partir dos dados já obtidos laboratorialmente, conseguindo diferenciar com sucesso as "beads" de diferentes diâmetros e conseqüentemente de diferentes impedâncias, estamos em condições de afirmar que esta mesma técnica de diferenciação seria possível ser empregue na caracterização das células parasitadas.

Outra forma de apresentar os dados obtidos seria a utilização apenas da informação

acerca das propriedades dielétricas das partículas, ou seja, a informação de impedância obtida através do sinal de alta-frequência. Como as células têm aproximadamente o mesmo volume, a informação obtida através do sinal de baixa-frequência não vai ser tão relevante quando comparado com o estudo em "beads". Assim uma outra apresentação dos resultados passaria pela construção de um gráfico da amplitude da parte imaginária em função da amplitude da parte real apenas para os resultados obtidos a partir do sinal de 8,7 MHz, como podemos verificar seguidamente em estudos deste tipo já publicados (Küttel et al., 2007).

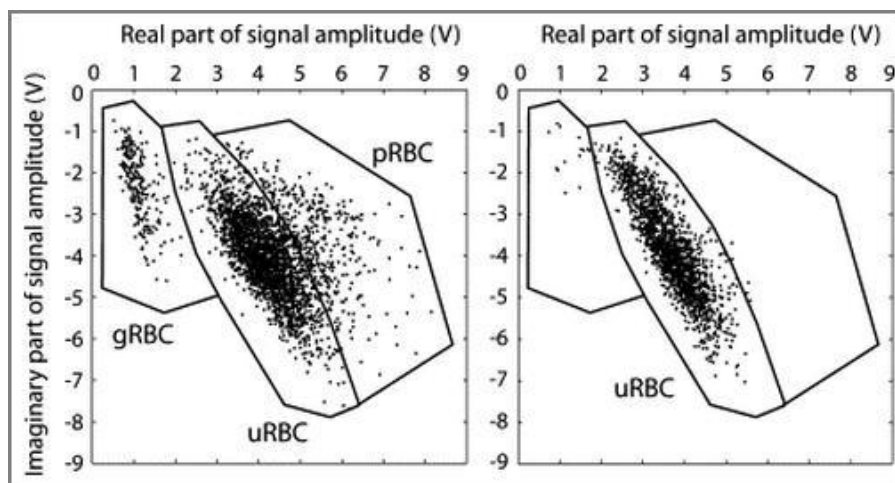


Figura 3.57: Gráficos de dispersão das medidas de espectroscopia de impedância apresentando mudanças nas características dielétricas para eritrócitos normais ("uRBC"), parasitados ("pRBC") e fantasma ("gRBC") (adaptado de Küttel et al., 2007).

Observamos que a partir deste tipo de representação gráfica podemos distinguir claramente os eritrócitos saudáveis dos parasitados, tal como podemos distinguir também os eritrócitos "fantasma" que são uma consequência do envelhecimento e ruptura celular.

Conclusões

Neste projecto desenvolveu-se um método de espectroscopia de impedância para caracterização de células parasitadas utilizando um fluxo laminar de amostra por um microcanal de 20 μm num dispositivo de microfluídica otimizado.

O dispositivo de microfluídica foi fabricado recorrendo a métodos litográficos. Primeiramente fabricou-se um molde com o fotorresiste SU-8 em substrato de silício através do método de fotolitografia. Todos os parâmetros de microfabricação foram optimizados para conseguirmos obter a espessura desejada para os microcanais no molde. As estruturas finais de SU-8 foram depois utilizadas como base para a produção do PDMS. A elaboração de réplicas consecutivas a partir do mesmo molde de SU-8 iria danificar o mesmo e impossibilitar a produção em grande escala de chips. Por isso, introduziu-se um molde intermédio, primeiramente de resina epóxi e depois através da fabricação de um molde próprio em PDMS.

A parte inferior do chip foi realizada mediante a utilização de técnicas de fotolitografia e deposição de filmes finos por canhão de electrões, o que possibilitou a produção de dois pares de eléctrodos de ouro depositados em substratos de vidro através do método de “lift-off”. A selagem das duas partes do dispositivo foi possível através do tratamento das superfícies de PDMS e vidro por plasma de oxigénio e o alinhamento foi realizado através de um microalinhador posicionado estrategicamente sob um microscópio óptico com uma ampliação de 100 vezes.

Foram realizados vários testes prévios sem a utilização do dispositivo de microfluídica com o objectivo não só de ganhar algum conhecimento acerca do conceito de espectroscopia de impedância, como também proceder à verificação do funcionamento de toda a instrumentação e softwares presentes. Estes testes consistiram na obtenção de dados de impedância acerca de um circuito eléctrico correspondente à associação de resistências e condensadores electrolíticos e na obtenção de espectros de impedância de líquidos utilizando eléctrodos exteriores.

Mediante a utilização dos dispositivos de microfluídica a técnica utilizada para caracterização de células parasitadas foi a “AC Discrete Frequency System” que consistiu na aplicação do somatório de duas ondas de tensão AC de alta e baixa-frequência nos eléctrodos presentes no chip. O resultado obtido através dos eléctrodos opostos, após a

passagem das células pelo canal, foi inserido num amplificador operacional que procedeu à amplificação da diferença da corrente resultante. O sinal foi depois injectado em dois amplificadores lock-in onde foi demodulado obtendo-se as partes real e imaginária correspondentes às ondas de baixa e alta-frequência, trazendo a informação acerca do volume celular, características dieléctricas e impedância da amostra. Concluiu-se que ao aplicarmos uma onda de baixa-frequência de 85 kHz e uma onda de alta-frequência de 8,7 MHz com amplitudes de 250 mV_{rms} conseguimos discriminar a passagem pelo microcanal de “beads” de diferentes tamanhos e consequentemente de diferentes impedâncias. Provou-se que o mesmo estudo pode ser aplicado simultaneamente à caracterização de eritrócitos parasitados.

Todos os resultados obtidos foram mediados pelo software labview que, através da elaboração da respectiva programação de todos os algoritmos necessários, permitiu a consequente visualização, tratamento e interpretação dos resultados obtidos através da placa de aquisição de dados.

Esta dissertação foi desenvolvida em paralelo com um projecto de conteúdos semelhantes onde se pretende discriminar células parasitadas simultaneamente através da caracterização eléctrica e óptica mediante dispositivos de microfluídica mais complexos. Trabalhos futuros a desenvolver neste projecto passariam pela realização da ligação e do entrosamento entre os dados obtidos pela parte eléctrica e os dados obtidos a partir da parte óptica, além de utilização de eritrócitos frescos e do desenvolvimento de uma cultura de glóbulos vermelhos parasitados para realizamos a respectiva comparação entre os dados.

Ouros aspectos que necessitam de desenvolvimento seriam a optimização da microfabricação em grande escala de dispositivos de microfluídica no sentido de apresentarem todos as mesmas dimensões predefinidas e não existirem pequenos erros de desalinhamento; o melhoramento do método de “pressure driven flow” utilizado na inserção das amostras no chip, pois por vezes a focagem hidrodinâmica torna-se muito difícil de realizar sem sabermos o valor da pressão que estamos a inserir e consequentemente o valor do fluxo de líquido nas entradas dos canais; o aperfeiçoamento da instrumentação utilizada no projecto, nomeadamente a substituição do amplificador operacional utilizado por dois de transimpedância e por outro amplificador diferencial com uma gama alta de frequências de funcionamento com o objectivo de optimizarmos os resultados obtidos; e a automatização do sistema de aquisição de dados, nomeadamente o diagrama de blocos e o painel frontal do labview, pois o método utilizado prende-se com a utilização de um programa intermediário de folha de cálculos para realização do estudo dos dados e futuramente deseja-se automatizar esse aspecto procedendo à leitura e transformação dos resultados de uma forma automática e simples sem utilização de outros programas.

Bibliografia

Alexander, C., Sadiku, M., Fundamentals of Electric Circuits. 4^a Ed., McGraw-Hill, Nova Iorque, pp. 387–389, 2006.

Biosurfit (2012). Acedido em 2 de Outubro de 2012, em <http://www.biosurfit.com>.

Braschler, T., Metref, L., Zvitov-Marabi, R., Van Lintel, H., Demierre, N., Theytaz, J., Renaud, P., A simple pneumatic setup for driving microfluidics. Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology, v. 7 (4), pp. 420–422, 2007.

Cheung, K., Gawad, S., Renaud, P., Impedance Spectroscopy Flow Cytometry: On-Chip Label Free Cell Differentiation. Cytometry Part A, v. 65A, pp. 124-132, 2005.

Chinaglia, D.L., Gozzi, G., Alfaro, R.A.M., Hessel, R., Impedance spectroscopy used in a teaching lab. Revista Brasileira de Ensino de Física, v. 30 (4), pp. 4504, 2008.

Demierre, N., Continuous-Flow Separation of Cells in a Lab-on-a-Chip using "Liquid Electrodes" and Multiple-Frequency Dielectrophoresis. École polytechnique fédérale de Lausanne, Suíça, 2008.

Duffy, D. C., McDonald, J. C., et al., Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). Analytical Chemistry, v. 70 (23), pp. 4974-4984, 1998.

Foster, K. R., Schwan, H.P., Dielectric properties of tissues and biological materials: A Critical Review. Rev. Biomed. Eng, v. 17, pp. 25-104, 1989.

Fricke, H., Morse, S., The electric capacity of tumors of the breast. Journal of Cancer Research, v. 10, pp. 340-376, 1926.

Gascoyne, P., Satayavivad, J., Ruchirawat, M., Microfluidic approaches to malaria detection. Acta Tropica, v. 89, pp. 357-369, 2004.

Gawad, S., Holmes, D., Benazzi, G., Renaud, P., Morgan, H., Microengineering in Biotechnology: Impedance spectroscopy and optical analysis of single biological cells and organisms in microsystems. Methods in Molecular Biology, v. 583, pp. 149-181, 2008.

Gawad, S., Cheung, K., Seger, U., Bertsch, A., Renaud, P., Dielectric spectroscopy in a micromachined flow cytometer: theoretical and practical considerations. *Lab on a chip*, v. 4 (3), pp. 241-251, 2004.

Grimnes, S. J., Martinsen, O. G., *Bioimpedance and Bioelectricity Basics*. 2ª Ed., Academic Press, San Diego, 2002.

Kim, J., Ligler, F., *The Microflow Cytometer*. 1ª Ed., Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., Singapura, 2010.

Kima, J. Y., Baeka, J. Y., et al., Automatic aligning and bonding system of PDMS layer for the fabrication of 3D microfluidic channels. *Sensors and Actuators A*, v. 119, pp. 593–598, 2005.

Küttel, C., Nascimento, E., Damierre, N., Silva, T., Braschler, T., Renaud, P., Oliva, A., Label-free detection of *Babesia bovis* infected red blood cells using impedance spectroscopy on a microfabricated flow cytometer. *Acta Tropica*, v. 102, pp. 63-68, 2007.

Lewis, G., Olbricht, W., Cost-effective broad-band electrical impedance spectroscopy measurement circuit and signal analysis for piezo-materials and ultrasound transducers. *Measurement Science and Technology*, v. 19 (10), pp. 105102, 2008.

Loureiro, J., *Lab on Chip microsystem for flow cytometric analysis, separation and counting of cells and particles*. Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

MicroChem (2012), *SU-8 2000 Permanent Epoxy Negative Photoresist, Processing Guidelines for: SU-8 2025, SU-8 2035, SU-8 2050 and SU-8 2075*. Acedido em 9 de Outubro de 2012, em <http://www.microchem.com>

MIT Open Courseware (2012), *Physics of Microfabrication: Front End Processing*. Acedido em 5 de Outubro de 2012, em <http://ocw.mit.edu/courses/electrical-engineering-and-computer-science/6-774-physics-of-microfabrication-front-end-processing-fall-2004>.

Moretti, Paulo E., *Microbiologia: Fundamentos & Aplicações*. 1ª Ed., Faculdade de Americana, Brasil, 2008.

Nascimento, E., *Microfluidic platforms as tools for identification, characterization and manipulation of Babesia bovis infected red blood cells*. Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2006.

National Instruments (2012). Acedido em 22 de Setembro de 2012, em <http://www.ni.com/labview/pt>.

Richard, Jaeger, Introduction to microelectronic fabrication. Volume V, 2ª Ed., Addison-wesley PC, Nova Iorque, 1988.

Renaud, P., Linderholm, P., Braschler, T., Demierre, N., Seger, U., Apparatus for manipulating, modifying and characterising particles in a micro channel. École polytechnique fédérale de Lausanne, International Patent Application PCT/IB2007/050338, 2006.

Schade-Kampmann et al. On-chip non-invasive and label-free cell discrimination by impedance spectroscopy. *Cell Prolif*, v. 41, pp. 830-840, 2008.

Sun, T., Berkel, C., Green, N. G., Morgan, H., Digital signal processing methods for impedance microfluidic cytometry. *Microfluidics and Nanofluidics*, DOI 10.1007/s10404-008-0315-3, 2008.

Sun, T., Gawad, S., Bernabini, C., Green, N. G., Morgan, H., Broadband single cell impedance spectroscopy using maximum length sequences: theoretical analysis and practical considerations. *Meas. Sci. Technol.*, v. 18, pp. 2859, 2007.

Sze, S.M., *Vlsi Technology*. 2ª Ed., Mc Graw-Hill, Boston, 1988.

Texas Instruments (2012). Acedido em 9 de Outubro de 2012, em http://www.ti.com/product/ina129&lpos=Middle_Container&lid=Alternative_Devices.

Vaz, A., Desenvolvimento de um biossensor de ADN integrado num chip de microfluídica, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2012.

Wang, M. H., Jang, L. S., A systematic investigation into the electrical properties of single HeLa cells via impedance measurements and COMSOL simulations. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, pp. 2830-2835, 2009.

Wang, L., Flanagan, L., Jeon, N., Monuki, E., Lee, A., Dielectrophoresis switching with vertical sidewall electrodes for microfluidic flow cytometry. *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology*, v. 7 (9), pp. 1114–1120, 2007.

Wolf, S., Tauber, R., *Silicon Processing for the VLSI Era*. Volume 1, 2ª Ed., Lattice Press, Califórnia, 2005.

Yang, Edward S., Micro electronic devices, Mc Graw-Hill, Singapura, 1988.


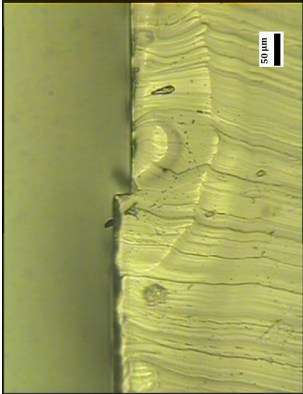
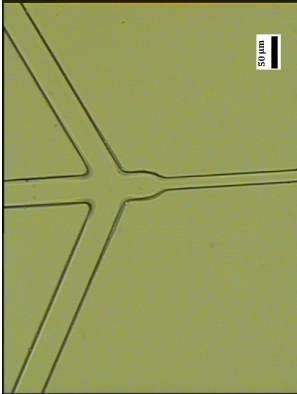
Anexos

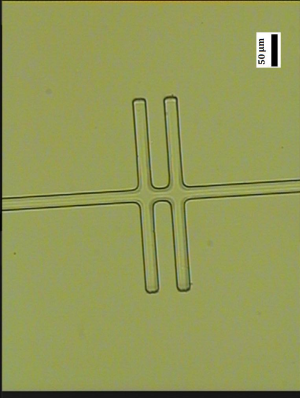
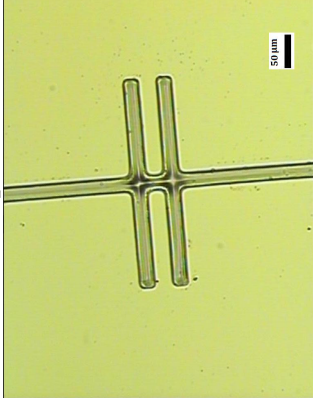
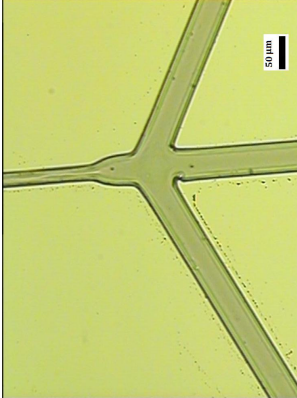
A Relatório do protocolo de execução do processo de microfabricação

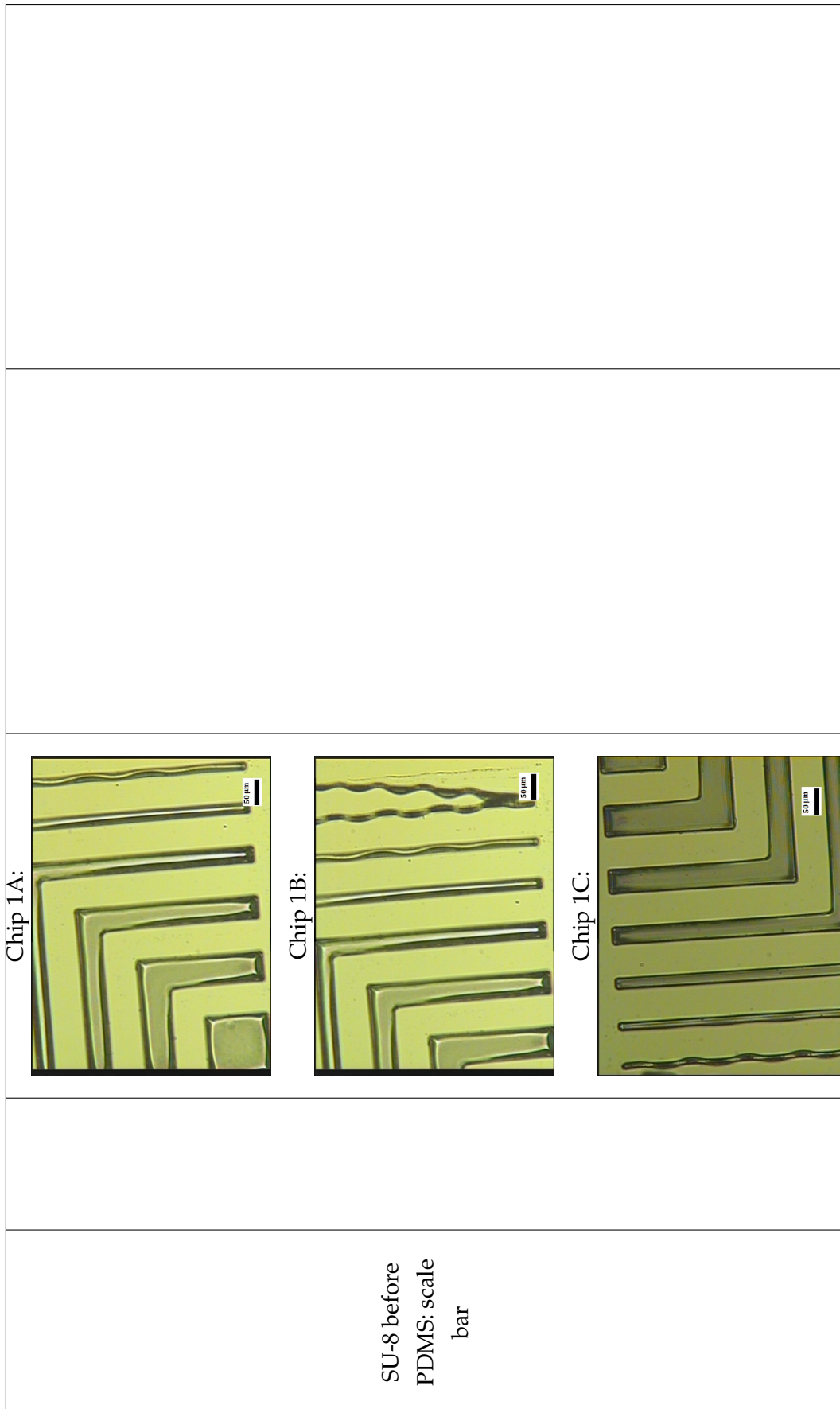
Series CH1 done on silicon by: Fabio, Iracema, IBW Aimed thickness: 15-20um in R=2.5 cm

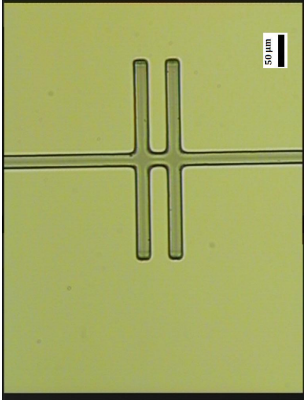
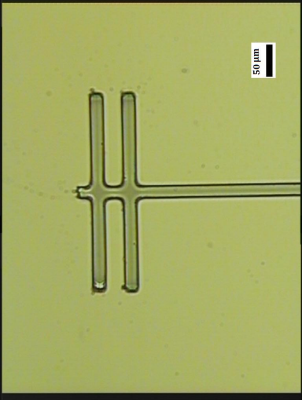
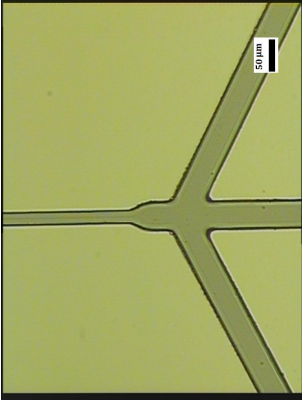
	temp.[°C]	CH1A	CH2B	CH2C
wafer preparation		4in. Si wafers (MONITORS), cleaning: acetone 10min in ultrasounds, then IPA 10min in ultrasounds, DI rinse, N ₂ dry, cleaned on 2012.08.20. baking 10min@180°C, cool down ≥ 10min SU-8 2025 500rpm/7s/100rpm/s, then ... rpm/30s/300rpm/s. The SU-8 flow stopped with glass Petri. Open spinner carefully ("hairs").		
spin coat*	18,4 °C	3600 at 18.8 °C, so at this temperature: 3600	4100 at 18.8 °C, so 4100	4600 at 18.8 °C, so 4600
relax [min]		10 min	5 min	0
soft base needed additional baking? **		5min@95C (+ 20s for placing samples), taken out and put on plane acrylic covered with paper. Cooling ≥ 10min		
exposure ***		No. After additional baking, no wrinkles.	No.	No.
details of exposure delay [min]		though i-filter, soft exp., CP mode. Should be 145 mJ/cm ² (make flood exposure to check power that day. Then calculate time: t=dose/power). Impressions from the mask? No. t=145/18,1=8,01 ≈ 8s		
post bake development [min]		18,3 mW/cm ²	18,2 mW/cm ²	18,3 Wm/cm ²
		2min30s	5 min	0
		min@65g then 5min@95C (+20t for putting on the other plate), then taken out and put on plane acrylic		
		4min@500rpm (after half time, rotate 180°).		

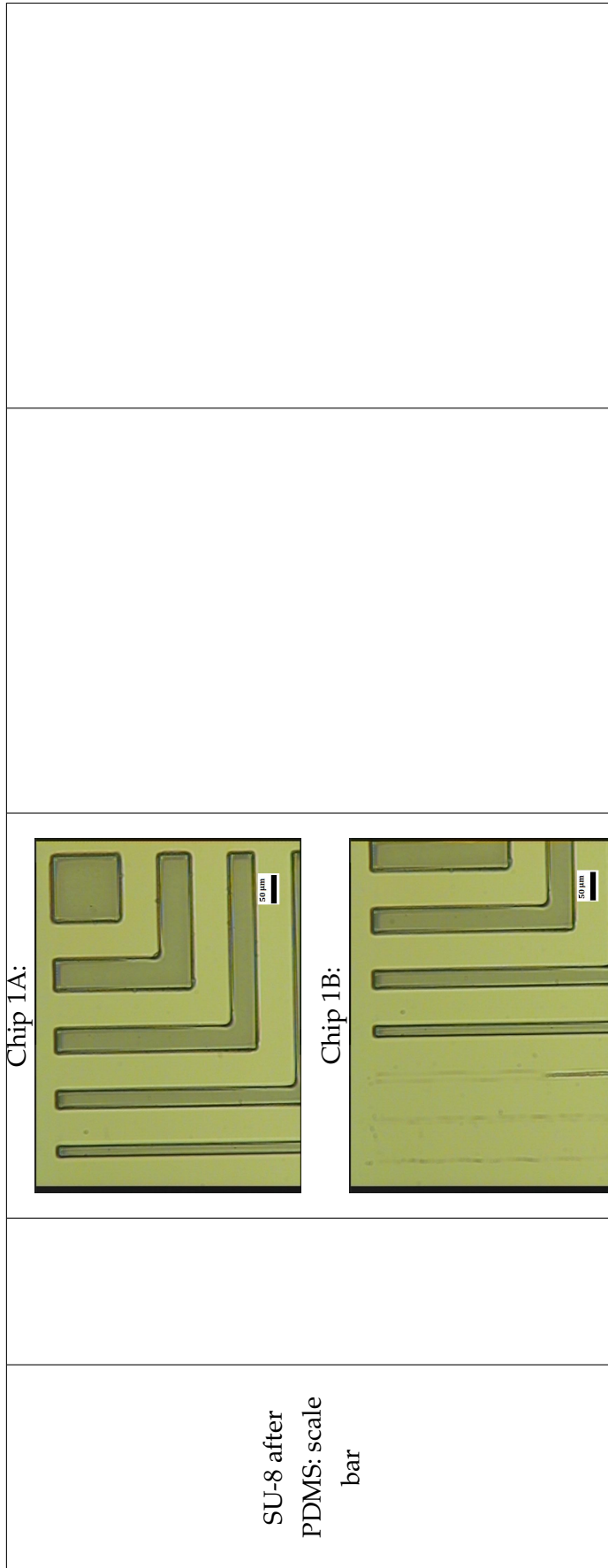
rinsing	1min in 2 nd dev., rinsing with IPA. If white traces appear, immerse sample (1min) in the 1 st developer, then 2 nd dev. and rinse. Repeat this step as many times as needed, but don't immerse samples anymore in the developer that was contaminated by the white traces.	Some SU-8 came out from the wafer	All SU-8 came out from the wafer
PDMS curing	ok Silanization Curing, in vacuum, with the pump working.	-	-
Thickness by microscope: (PDMS)	Chip 1 (vernier): R=2,5mm (20um/20uc) R=2,5mm (15um/15uc) R=2,5cm (17um/17um/18um)		
Average thickness by microscope at R=2.5 cm (PDMS)	17,43um; $\sigma=2,07$ um		

<p>PDMS: cross section</p>		<p>Chip 1:</p>  <p>Chip 2:</p> 		
<p>PDMS: channels</p>		<p>Chip 3:</p> 		

<p>PDMS: electrical detection area</p>		<p>Chip 1:</p> 		
<p>SU-8 before PDMS: electrical detection area</p>		<p>Chip 3:</p> 		
<p>Se-8 before PDMS: channels</p>		<p>Chip 3:</p> 		



<p>SU-8 after PDMS: electrical detection area</p>		<p>Chip 1:</p>  <p>Chip 2:</p> 		
<p>SU-8 after PDMS: channels</p>		<p>Chip 1:</p> 		



*the spinning speed is given for 21C. For every 1C of difference, the SU-8 spinning speed should be changed by 25 rpm

** optimization of soft bake time (most probably it is about baking at 95C)

Note: To optimize the baking times/conditions, remove the water from the hotplate after the prescribed time and allow it to cool to room temperature. Then, return the water to the hotplate. If the film 'wrinkles', leave the water on the hotplate for a few more minutes. Repeat the cool-down and heat-up cycle until 'wrinkles' are no longer seen in the film.

*** exposure dose (it is about baking at 95C)

Note: With optimal exposure, a visible latent image will be seen in the film within 5-15 seconds after being placed on the PEB hotplate and not before. An exposure matrix experiment should be performed to determine the optimum dosage.

B Dados relativos aos espectros de impedância de amostras biológicas em eléctrodos exteriores

Resultados obtidos nos ensaios com água

Tabela 6.2: Dados experimentais de impedância da água.

f (Hz)	V1 (V)	V2 (V)	Δt (s)	T (s)	ϕ (rad)	ϕ (°)	Parte Real (k Ω)	Parte Imaginária (k Ω)
120,6	0,272	1,070	1,28E-03	8,33E-03	0,9655	55,3181	0,1446	0,2090
289,4	0,368	1,070	3,40E-04	3,46E-03	0,6174	35,3757	0,2804	0,1991
503	0,392	1,070	1,50E-04	1,99E-03	0,4731	27,1084	0,3261	0,1669
1284	0,416	1,080	3,20E-05	7,79E-04	0,2581	14,7882	0,3724	0,0983
1862	0,432	1,100	1,80E-05	5,37E-04	0,2106	12,0670	0,3840	0,0821
2533	0,432	1,100	1,20E-05	3,95E-04	0,1909	10,9367	0,3856	0,0745
5330	0,440	1,100	4,80E-06	1,87E-04	0,1613	9,2406	0,3948	0,0642
10100	0,448	1,100	1,80E-06	9,90E-05	0,1142	6,5455	0,4046	0,0464
21760	0,448	1,100	7,20E-07	4,59E-05	0,0985	5,6421	0,4053	0,0400
49600	0,456	1,100	1,20E-07	2,02E-05	0,0374	2,1439	0,4143	0,0155
101600	0,480	1,100	1,40E-07	9,84E-06	0,0894	5,1220	0,4346	0,0390
203300	0,512	1,100	2,60E-07	4,92E-06	0,3320	19,0244	0,4400	0,1517
330700	0,560	1,100	2,80E-07	3,02E-06	0,5818	33,3333	0,4253	0,2798
571000	0,736	1,100	3,70E-07	1,75E-06	1,3284	76,1143	0,1606	0,6495

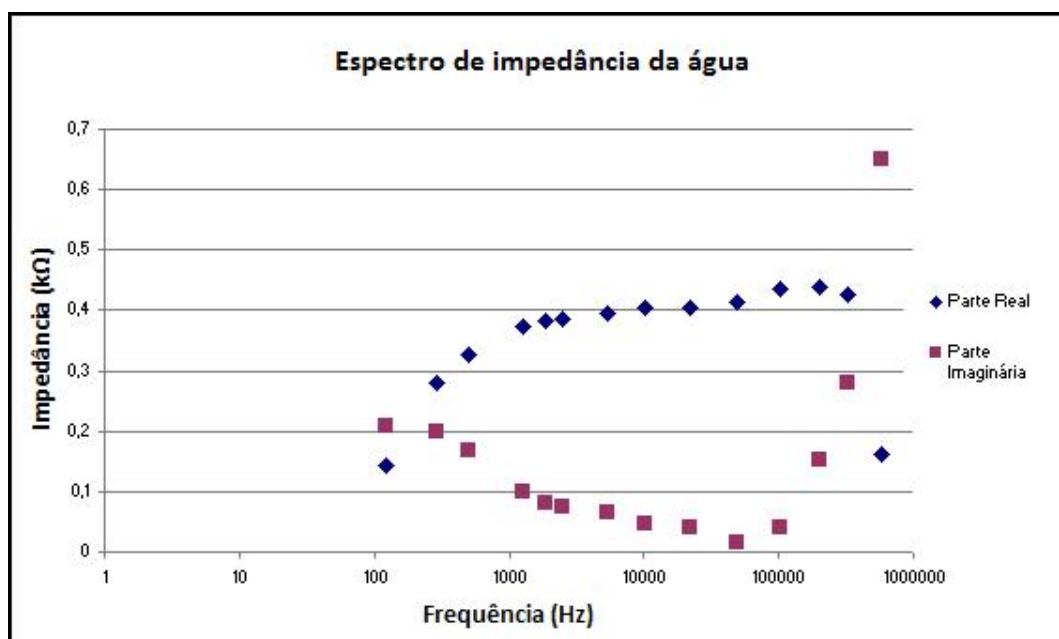


Figura 6.1: Espectro de impedância da água em função da frequência.

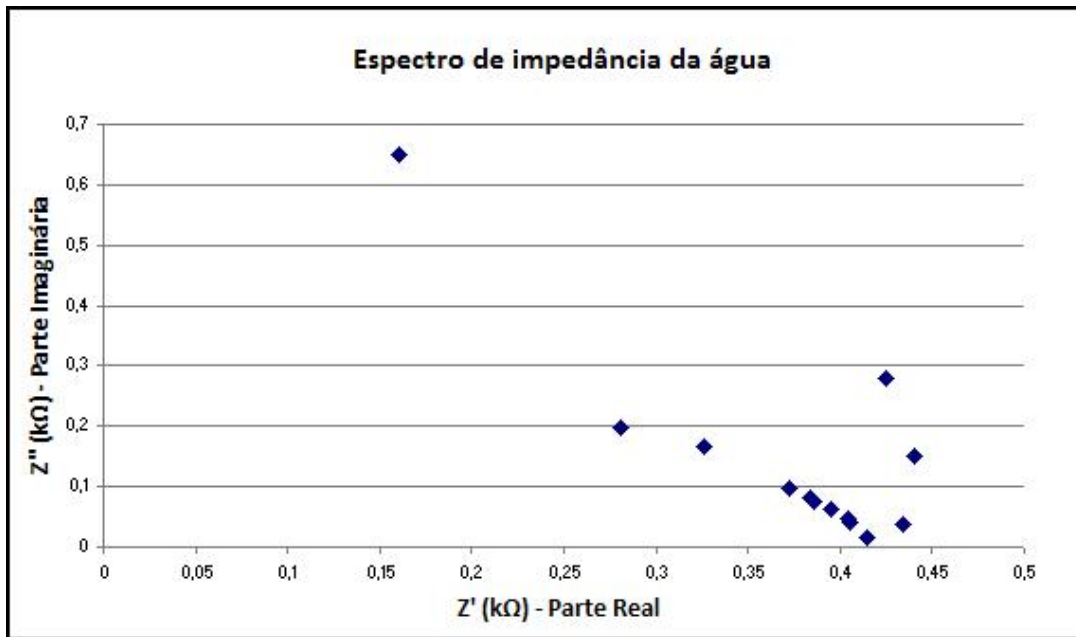


Figura 6.2: Espectro da parte imaginária da impedância da água em função da parte real.

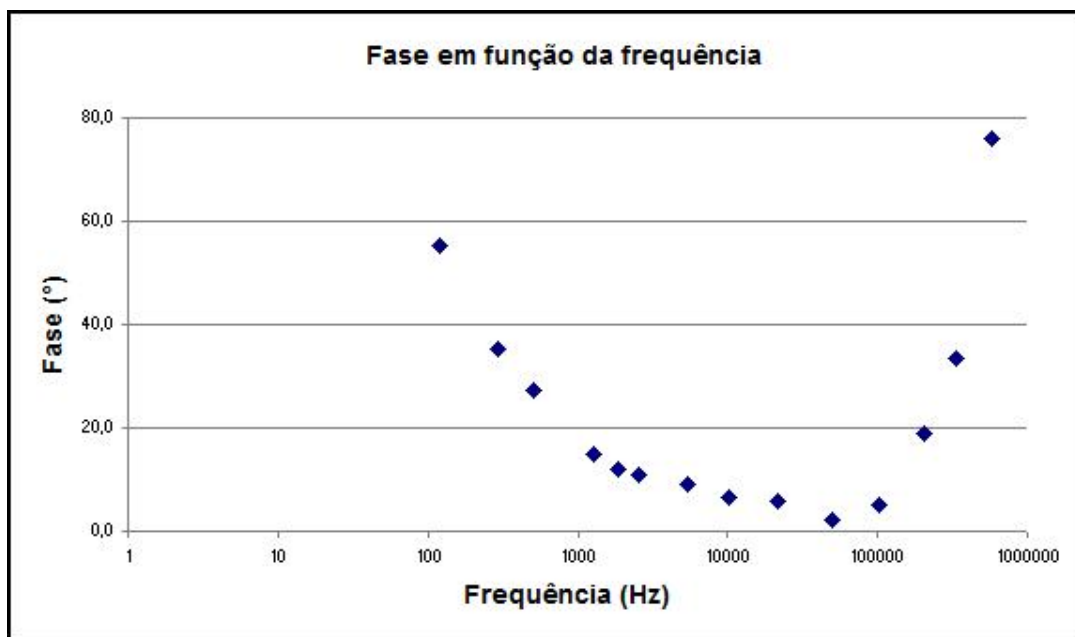


Figura 6.3: Gráfico da fase em função da frequência, relativo à água.

Resultados obtidos nos ensaios com água com sal

Tabela 6.3: Dados experimentais de impedância da água com sal.

f (Hz)	V1 (V)	V2 (V)	Δt (s)	T (s)	ϕ (rad)	ϕ (°)	Parte Real (k Ω)	Parte Imaginária (k Ω)
151,5	0,007	1,020	1,64E-03	6,60E-03	1,5613	89,4545	6,72E-05	7,06E-03
343,6	0,015	1,020	7,60E-04	2,92E-03	1,6353	93,6986	-9,49E-04	1,47E-02
570,8	0,022	1,020	4,30E-04	1,75E-03	1,5403	88,2554	6,57E-04	2,16E-02
1161	0,041	1,020	2,08E-04	8,61E-04	1,5179	86,9686	2,12E-03	3,99E-02
1774	0,058	1,010	1,26E-04	5,64E-04	1,4037	80,4255	9,49E-03	5,62E-02
2408	0,074	0,984	8,80E-05	4,15E-04	1,3323	76,3373	1,78E-02	7,31E-02
5155	0,126	0,880	3,60E-05	1,94E-04	1,1660	66,8041	5,64E-02	1,32E-01
10400	0,168	0,720	1,36E-05	9,62E-05	0,8883	50,8940	1,47E-01	1,81E-01
20330	0,184	0,608	4,60E-06	4,92E-05	0,5875	33,6585	2,52E-01	1,68E-01
51870	0,176	0,536	8,00E-07	1,93E-05	0,2607	14,9378	3,17E-01	8,46E-02
100100	0,160	0,512	6,00E-08	9,88E-06	0,0382	2,1862	3,12E-01	1,19E-02
200400	0,156	0,496	1,00E-07	4,99E-06	0,1259	7,2144	3,12E-01	3,95E-02
327200	0,166	0,492	1,60E-07	3,06E-06	0,3290	18,8482	3,19E-01	1,09E-01
508600	0,204	0,492	2,00E-07	1,97E-06	0,6392	36,6226	3,33E-01	2,47E-01
715300	0,256	0,492	3,04E-07	1,40E-06	1,3683	78,3954	1,05E-01	5,10E-01

Resultados obtidos nos ensaios com PBS

Tabela 6.4: Dados experimentais de impedância do PBS.

f (Hz)	V1 (V)	V2 (V)	Δt (s)	T (s)	ϕ (rad)	ϕ (°)	Parte Real (k Ω)	Parte Imaginária (k Ω)
129,4	0,992	0,026	1,92E-03	7,74E-03	1,5586	89,3023	0,4575	37,573
311,3	1,000	0,054	7,60E-04	3,22E-03	1,4848	85,0746	1,5900	18,4501
578	0,992	0,090	3,80E-04	1,73E-03	1,3769	78,8927	2,1234	10,8158
1049	0,992	0,150	1,88E-04	9,54E-04	1,2382	70,9434	2,1593	6,2509
1600	0,976	0,204	1,12E-04	6,25E-04	1,1259	64,512	2,0588	4,3187
2425	0,968	0,260	6,00E-05	4,12E-04	0,9141	52,3763	2,2728	2,9488
5112	0,920	0,328	1,88E-05	1,96E-04	0,6039	34,6012	2,3088	1,5928
10350	0,896	0,336	5,60E-06	9,66E-05	0,3642	20,8696	2,4917	0,9500
20390	0,864	0,336	1,80E-06	4,90E-05	0,2308	13,2245	2,5032	0,5883
51330	0,840	0,320	3,80E-07	1,95E-05	0,1224	7,0154	2,6053	0,3206
103100	0,824	0,320	4,80E-08	9,70E-06	0,0311	1,7814	2,5738	0,0800
200200	0,824	0,336	1,30E-07	5,00E-06	0,1634	9,3600	2,4197	0,3988
317700	0,824	0,368	1,60E-07	3,15E-06	0,3191	18,2857	2,1261	0,7025
520800	0,824	0,464	2,60E-07	1,92E-06	0,8508	48,7500	1,1709	1,3352
705200	0,824	0,592	3,40E-07	1,42E-06	1,5065	86,3188	0,0894	1,3890

Resultados obtidos nos ensaios com vinagre

Tabela 6.5: Dados experimentais de impedância do vinagre.

f (Hz)	V1 (V)	V2 (V)	Δt (s)	T (s)	ϕ (rad)	ϕ (°)	Parte Real (k Ω)	Parte Imaginária (k Ω)
128,7	0,110	1,000	1,78E-03	7,80E-03	1,4339	82,1538	0,0147	0,1070
269,5	0,180	1,000	7,00E-04	3,73E-03	1,1792	67,5603	0,0672	0,1627
469,9	0,260	1,000	3,30E-04	2,13E-03	0,9725	55,7223	0,1442	0,2115
1220	0,340	1,000	7,60E-05	8,20E-04	0,5823	33,3659	0,2873	0,1892
1789	0,360	1,000	4,20E-05	5,60E-04	0,4712	27,0000	0,3208	0,1634
2451	0,380	1,000	2,50E-05	4,08E-04	0,3850	22,0588	0,3485	0,1412
5319	0,380	1,000	7,60E-06	1,88E-04	0,2540	14,5532	0,3717	0,0965
10250	0,400	1,000	2,80E-06	9,74E-05	0,1806	10,3491	0,3935	0,0719
21050	0,400	1,000	1,20E-06	4,76E-05	0,1584	9,0756	0,3950	0,0631
59520	0,400	1,000	2,00E-07	1,68E-05	0,0748	4,2857	0,3989	0,0299
100600	0,420	1,000	1,00E-07	9,95E-06	0,0631	3,6181	0,4152	0,0263
200000	0,430	1,000	1,60E-07	5,02E-06	0,2003	11,4741	0,4234	0,0859
314500	0,480	1,000	2,00E-07	3,18E-06	0,3952	22,6415	0,4430	0,1848
404000	0,530	1,000	2,30E-07	2,48E-06	0,5827	33,3871	0,4409	0,2906

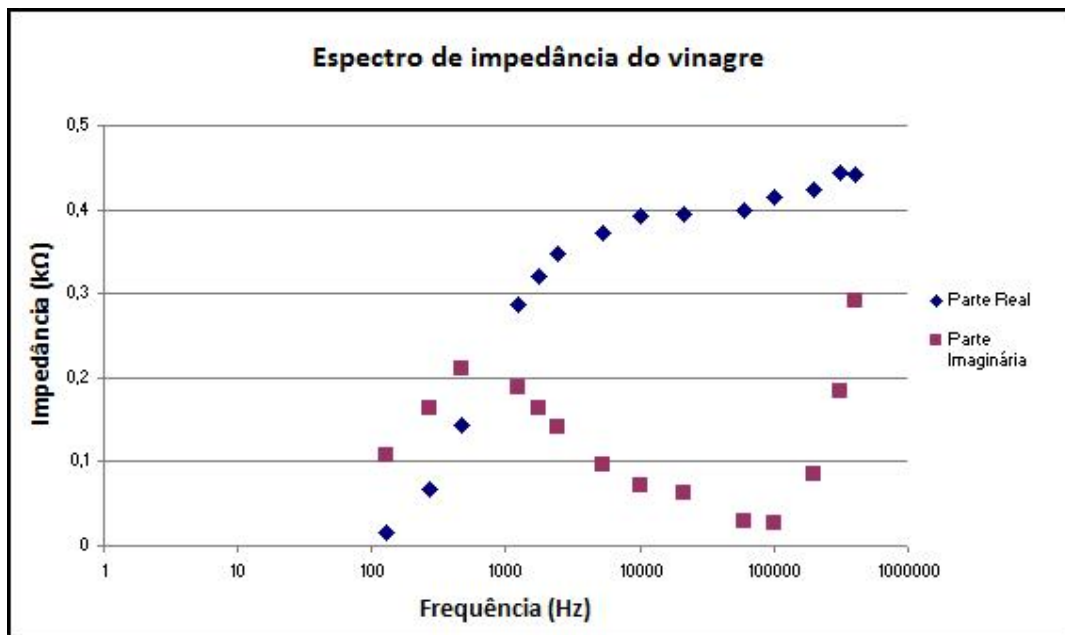


Figura 6.4: Espectro de impedância do vinagre em função da frequência.

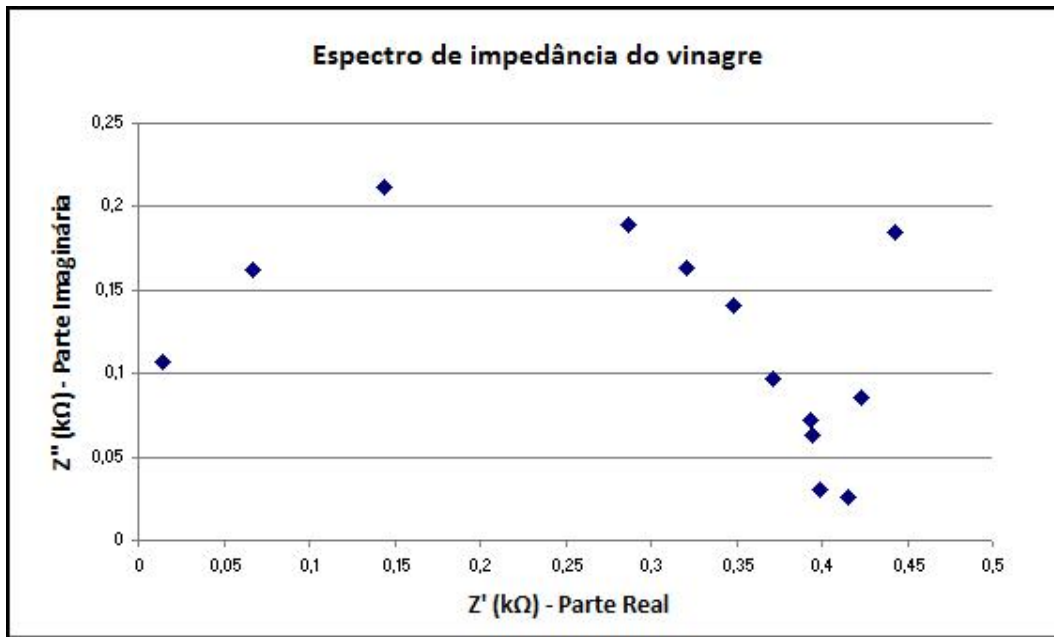


Figura 6.5: Espectro da parte imaginária da impedância do vinagre em função da parte real.

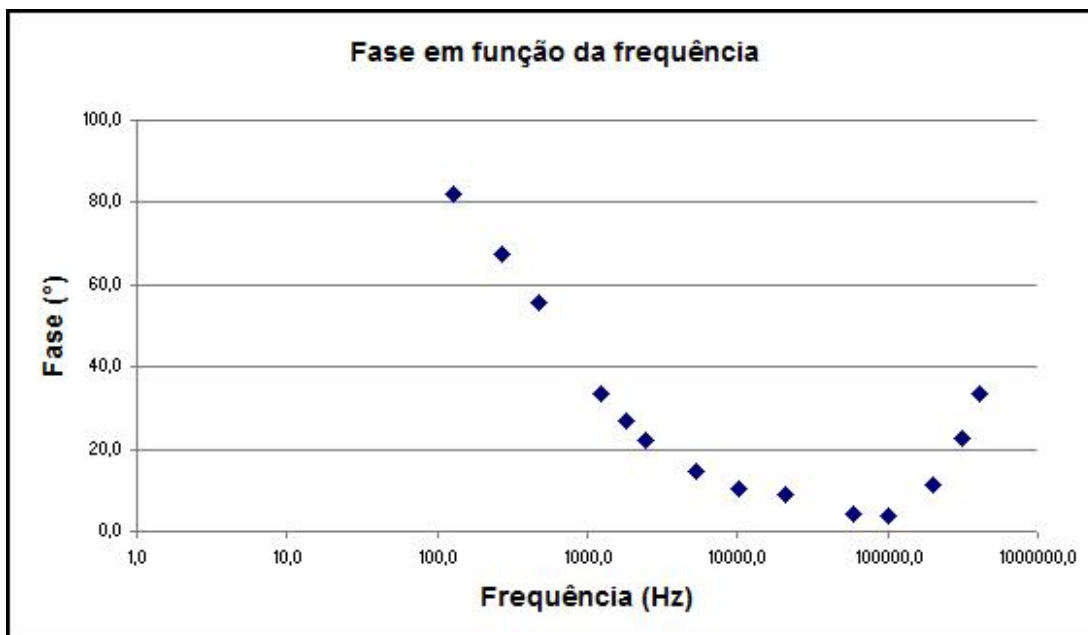


Figura 6.6: Gráfico da fase em função da frequência, relativo ao vinagre.

Resultados obtidos nos ensaios com sangue ovino (eritrócitos desfibrinados)

Tabela 6.6: Dados experimentais de impedância do sangue.

f (Hz)	V1 (V)	V2 (V)	Δt (s)	T (s)	ϕ (rad)	ϕ (°)	Parte Real (k Ω)	Parte Imaginária (k Ω)
117	0,216	0,968	1,68E-03	8,52E-03	1,2389	70,9859	0,0727	0,2110
302	0,384	0,976	4,80E-04	3,33E-03	0,9057	51,8919	0,2428	0,3096
506	0,488	0,976	2,30E-04	1,98E-03	0,7299	41,8182	0,3726	0,3334
1029	0,584	0,976	8,00E-05	9,72E-04	0,5171	29,6296	0,5201	0,2958
1658	0,616	0,976	3,80E-05	6,04E-04	0,3953	22,6490	0,5825	0,2430
2451	0,624	0,984	1,90E-05	4,08E-04	0,2926	16,7647	0,6072	0,1829
5123	0,624	0,984	5,20E-06	1,95E-04	0,1676	9,6000	0,6253	0,1058
10480	0,624	0,976	1,60E-06	9,54E-05	0,1054	6,0377	0,6358	0,0672
20200	0,608	0,976	6,00E-07	4,95E-05	0,0762	4,3636	0,6211	0,0474
53000	0,608	0,976	6,00E-08	1,88E-05	0,0200	1,1465	0,6228	0,0125
102100	0,624	0,976	9,00E-08	9,78E-06	0,0578	3,3129	0,6383	0,0369
200400	0,664	0,976	1,90E-07	4,98E-06	0,2397	13,7349	0,6609	0,1615
321800	0,728	0,976	2,00E-07	3,10E-06	0,4054	23,2258	0,6855	0,2942
512000	0,920	0,976	2,72E-07	1,95E-06	0,8764	50,2154	0,6032	0,7244
825100	0,824	0,976	2,70E-07	1,20E-06	1,4137	81,0000	0,1321	0,8339
936300	0,456	0,976	1,60E-07	1,07E-06	0,9431	54,0338	0,2744	0,3781
1025000	0,28	0,976	7,60E-08	9,76E-07	0,4893	28,0328	0,2532	0,1348

Resultados obtidos em LabVIEW

Tabela 6.7: Dados relativos aos resultados de impedância da água, obtidos mediante a utilização do software labview, em teste com eléctrodos exteriores.

Frequência (Hz)	Fase (°)	Parte Real (k Ω)	Parte Imaginária (k Ω)
198233,31	86,8025	0,0267	0,4772
174331,12	76,2677	0,1135	0,4644
157300,56	68,5797	0,1765	0,4498
131105,25	57,4113	0,2567	0,4016
114886,62	50,1034	0,3047	0,3645
93350,17	40,7810	0,3636	0,3136
80558,70	35,1813	0,3924	0,2766
70179,80	30,7147	0,4143	0,2461
62448,14	27,5838	0,4285	0,2239
56611,45	25,1043	0,4318	0,2023
50612,43	22,7958	0,4473	0,1880
43370,15	19,7444	0,4521	0,1623
38077,11	17,7250	0,4607	0,1473
33055,33	15,9206	0,4620	0,1318
28337,21	14,2547	0,4767	0,1211
22283,19	12,6926	0,4752	0,1070
18314,78	11,9874	0,4796	0,1018
12565,21	12,1574	0,4826	0,1040
11321,12	12,4072	0,4775	0,1051
7456,95	15,8406	0,4691	0,1331
6046,37	18,5278	0,4624	0,1550
4125,94	24,4479	0,4292	0,1951
3090,31	30,2297	0,3837	0,2236
2037,55	38,5219	0,3089	0,2459
1129,04	50,9195	0,1874	0,2307

C Painel frontal do teste com eléctrodos exteriores

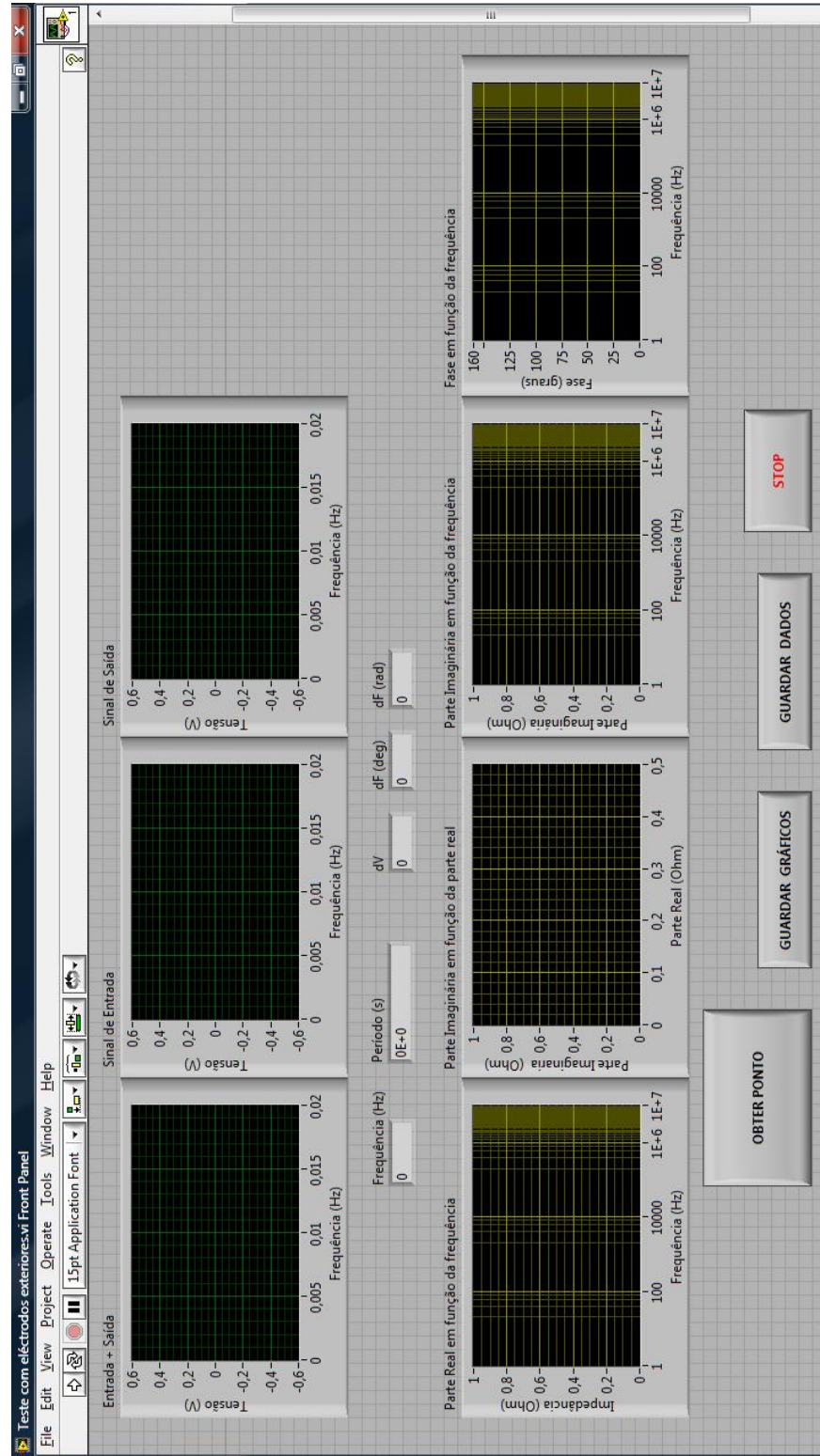


Figura 6.7: Painel frontal do teste com eléctrodos exteriores.

D Diagrama de blocos e respectivo painel frontal do algoritmo de aquisição de dados vindos dos amplificadores lock-in

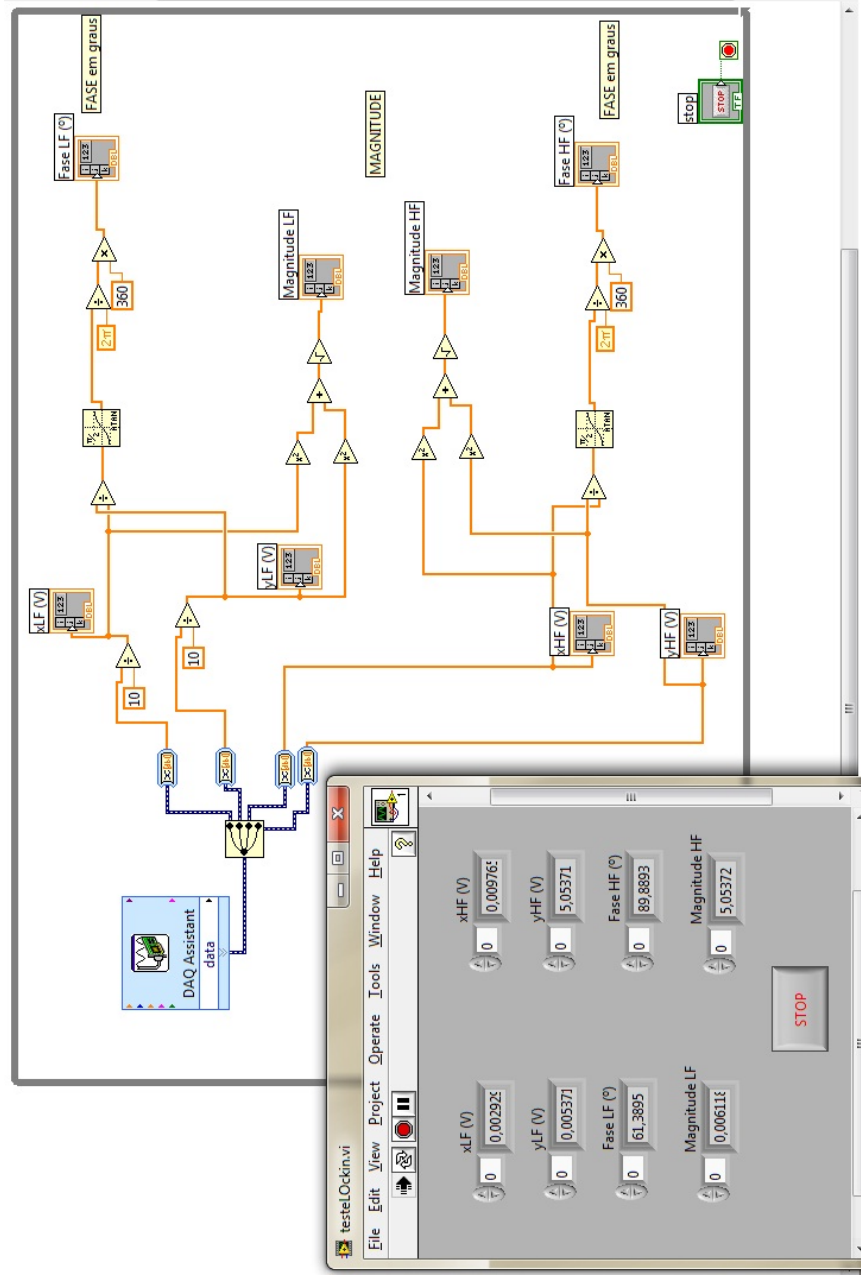


Figura 6.8: Diagrama de blocos e respectivo painel frontal do algoritmo de aquisição de dados vindos dos amplificadores lock-in.

E Diagrama de blocos do algoritmo para guardar todos os dados obtidos a partir da placa de aquisição de dados

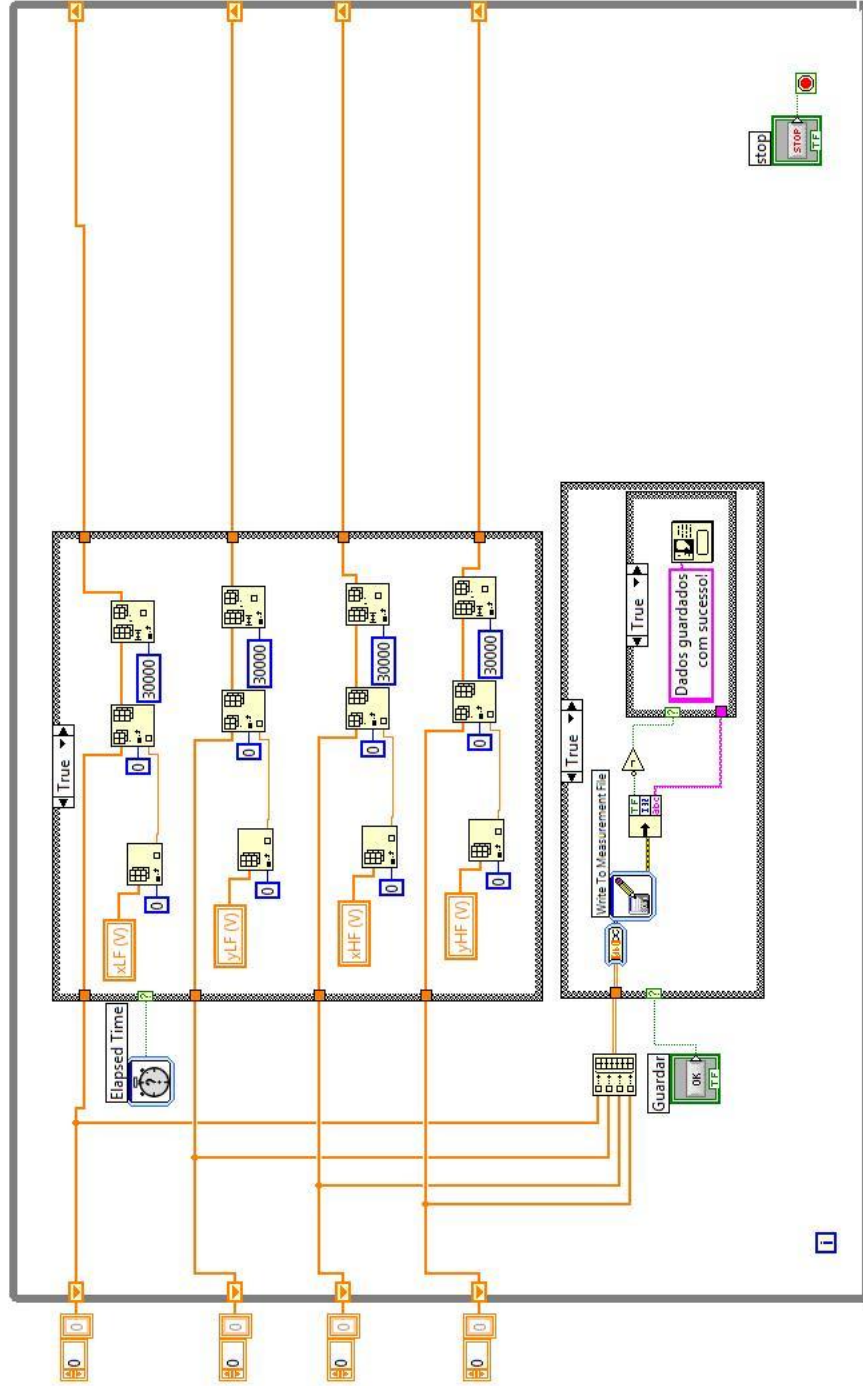


Figura 6.9: Diagrama de blocos do algoritmo para guardar todos os dados obtidos a partir da placa de aquisição de dados.