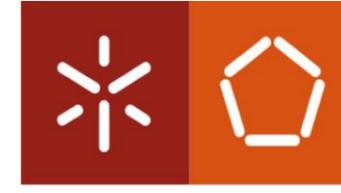




**Desenvolvimento de uma plataforma microfluidica  
para contagem de espécies de fitoplâncton tóxico**

Ângela Sofia Faria Meireles

Uminho | 2021

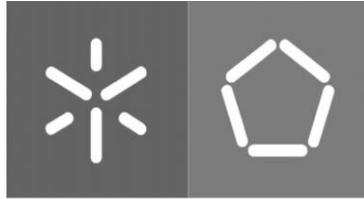


**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Ângela Sofia Faria Meireles

**Desenvolvimento de uma plataforma  
microfluidica para contagem de espécies de  
fitoplâncton tóxico**

Janeiro de 2021



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Ângela Sofia Faria Meireles

**Desenvolvimento de uma plataforma  
microfluídica para contagem de espécies de  
fitoplâncton tóxico**

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia Eletrónica Industrial e  
Computadores

Trabalho efetuado sob a orientação do  
Doutor Paulo Jorge Teixeira de Sousa

Janeiro de 2021

## **DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS**

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos. Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada. Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

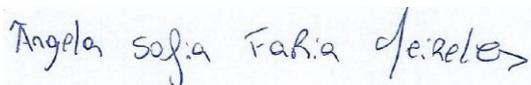
### ***Licença concedida aos utilizadores deste trabalho***



**Atribuição-NãoComercial-SemDerivações**  
**CC BY-NC-ND**

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Universidade do Minho, 12 / 01 / 2021

Assinatura: 

Este trabalho resultou do projeto FoodSens co-financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Interreg V-A Espanha-Portugal (POCTEP) 2014-2020. Projeto nº 0591\_FOODSENS\_1\_E.



# AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação é o fechar de um dos melhores capítulos da minha vida, que fica marcada por momentos que guardarei para sempre na minha memória.

Em primeiro lugar gostava de deixar um grande agradecimento à minha equipa de orientação. Ao meu orientador, Doutor Paulo Sousa e à professor Vânia Pinto, por todo o apoio e por todo o conhecimento que me passaram durante este ano e por toda a paciência que tiveram comigo. Ao Professor Luís Gonçalves, pela paciência, pela amizade e pelas oportunidades ao longo destes anos. Agradeço também a disponibilidade dada por parte do Vítor Hugo Magalhães na parte das simulações e por fim, um agradecimento ao professor Rui Lima, por todo o material disponibilizado. Deixo aqui uma palavra de agradecimento aos funcionários das oficinas de eletrónica, em particular ao Senhor Carlos e ao Senhor Paulo por estarem sempre disponíveis a ajudar. A todo o pessoal do laboratório, em particular à Camila Maria Penso e ao João Rocha, por todo o apoio em todos os momentos.

Ao longo destes anos, fiz amizades incríveis e conheci pessoas que é impossível encontrar palavras, que os descrevam. João Fernandes, Jorge Rafael Novais, Francisco Machado, Carlos Silva, Carolina Rua, Dimitri Santos, Ana Rita Fonseca, Gabriel Vilas Boas, João Martins, Sofia Paiva, Miguel Arrepia, Inês Ribeiro, João Macedo, Helder Peixoto, Diogo Martins, Zé Oliveira Martins, Luís Silva, Inês Garcia, Tiago Ribeiro, Joana Campos, Cátia Carneiro, Inês Pires, Gabriela Viana e Rafaela Sá, obrigada por todos os momentos partilhados, por todos os conselhos e por serem os parceiros de todas as horas que levarei sempre comigo. Obrigada por me terem deixado fazer parte da vossa história. Deixo também um agradecimento especial à minha melhor amiga, Carolina Queirós, que me acompanhou desde o infantário e que fez questão de estar sempre presente até agora.

E como os últimos são sempre os primeiros, deixo aqui o agradecimento mais especial de todos para o meu pai, a minha mãe e o meu irmão, por toda a paciência, por todo o apoio, por toda a amizade e carinho. Tanto esta dissertação como tudo o que consegui até agora, são dedicados a vós que sóis a minha maior fonte de inspiração e a minha maior força.

A todos vós MUITO OBRIGADA...

Vemo-nos por aí!

## DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Universidade do Minho, 12 / 01 / 2021

Assinatura: 

# RESUMO

O ciclo de nutrientes e o fluxo de energia nos ecossistemas marinhos está fortemente relacionado com a população de fitoplâncton, uma vez que este se encontra na base da cadeia alimentar marinha. No entanto, em certas condições ambientais pode ocorrer a proliferação de algumas espécies de fitoplâncton produtoras de toxinas, chamadas de florescimento de algas nocivas, as quais podem afetar a cadeia alimentar marinha e, conseqüentemente, a saúde humana quando são consumidos produtos contaminados provenientes da aquacultura e pesca. Apesar de já existirem várias técnicas sensíveis para a identificação de espécies de fitoplâncton, especialmente a citometria de fluxo, estas ainda não permitem análises rotineiras, *in-situ*, de baixo custo e de forma automatizada. Assim, o objetivo desta dissertação assenta no desenvolvimento de uma plataforma *Lab-on-a-chip* para contagem de células de fitoplâncton de uma forma automatizada, a qual será futuramente integrada num citómetro microfluídico. A plataforma desenvolvida compreende um canal microfluídico para passagem individual das células pela zona de deteção, no qual está integrado um sensor de impedância fabricado com microeléctrodos em filme fino. O princípio de deteção deste sensor é baseado na tecnologia *Resistive Pulse Sensing* (RPS), onde a identificação de células é obtida a partir das variações da tensão provocadas pela passagem destas sobre os microeléctrodos.

A melhor geometria e configuração dos microeléctrodos bem como dos microcanais foram estudadas através de simulações numéricas utilizando o *software COMSOL Multiphysics*. As configurações com melhores resultados foram fabricadas com recurso às microtecnologias e validadas experimentalmente. Para além disso, foi também implementada a eletrónica de atuação e leitura necessária para efetuar as medições elétricas, que compreende um circuito de excitação e um de amplificação. Os resultados experimentais permitiram observar alterações distintas na tensão com a passagem de partículas de diferentes tamanhos bem como com a passagem de diferentes células de fitoplâncton, demonstrando assim a viabilidade desta plataforma para ser integrada com um citómetro microfluídico.

**Palavras Chave:** Espectroscopia de Impedância (EIS), Fitoplâncton tóxico, microfabricação, microfluídica, *Resistive pulse sensing* (RPS).

## **ABSTRACT**

*The nutrient cycle and energy flow on marine ecosystems are strongly related to the phytoplankton population since they are the base of the marine food chain. However, under certain environmental conditions, the proliferation of some toxin-producing phytoplankton species may occur, called harmful algae blooms, which can affect the marine food chain and consequently, human health when contaminated products from aquaculture and fishing are consumed. Although there are already several sensitive techniques for the identification of phytoplankton species, especially flow cytometry, they still do not allow routine, in-situ, low-cost and automated analyses. Thus, the objective of this dissertation is to develop a Lab-on-a-chip platform for automated counting of phytoplankton cells, which in the future will be integrated with a microfluidic cytometer. The developed platform comprises a microfluidic channel for individual passage of cells through the detection zone, in which an impedance sensor made with thin film microelectrodes is integrated. The detection principle of this sensor is based on Resistive Pulse Sensing (RPS) technology, where the identification of cells is obtained from variations in electrical tension caused by their passage through microelectrodes.*

*The best geometry and configuration of the microelectrodes as well as the microchannels, were studied by numerical simulations using the COMSOL Multiphysics software. The configurations with the best results were fabricated by microtechnologies and validated experimentally. In addition, the actuation and readout electronics necessary to perform the electrical measurements were also implemented, which comprises an excitation and an amplification circuit. The experimental results allowed to observe different changes in the tension with the passage of particles of different sizes as well as with the passage of different cells of the phytoplankton, demonstrating the viability of this platform to be integrated with a microfluidic cytometer.*

**Keywords:** *Impedance Spectroscopy (EIS), Toxic phytoplankton, microfabrication, microfluidic, Resistive Pulse Sensing (RPS).*

# ÍNDICE

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>vi</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>vii</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>x</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>xv</b>
<b>Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos</b> .....	<b>xvi</b>
<b>1 Introdução</b> .....	<b>17</b>
1.1 Enquadramento .....	17
1.1.1 Técnicas microscópicas .....	18
1.1.2 Técnicas moleculares .....	19
1.1.3 Técnicas de HPLC .....	20
1.1.4 Citometria de fluxo.....	21
1.2 Motivação .....	21
1.3 Objetivos.....	22
1.4 Contribuições desta dissertação .....	23
1.5 Organização da dissertação.....	23
<b>2 Revisão da Literatura</b> .....	<b>25</b>
2.1 Plataformas microfluídicas para deteção de fitoplâncton .....	25
2.2 Citómetro microfluídico .....	26
2.3 Métodos de quantificação de células em dispositivos microfluídicos .....	26
2.3.1 Métodos magnéticos.....	27
2.3.2 Métodos óticos .....	28
2.3.3 Métodos elétricos .....	30
2.4 Conclusões .....	41
<b>3 Simulações Numéricas e Fabrico da Plataforma Microfluídica</b> .....	<b>43</b>
3.1 Constituição da plataforma microfluídica.....	44
3.2 Geometria e disposição dos elétrodos na plataforma microfluídica .....	45
3.3 Simulações numéricas .....	48

3.3.1	Simulação com dois elétrodos .....	48
3.3.2	Simulação com três elétrodos .....	52
3.3.3	Simulação com quatro elétrodos .....	54
3.4	Conclusões das simulações.....	56
3.5	Fabrico da plataforma microfluidica .....	57
3.5.1	Fabrico dos microelétrodos.....	57
3.5.2	Fabrico do canal microfluidico .....	62
3.5.3	Integração dos microeletrodos com o microcanal .....	64
<b>4</b>	<b>Eletrónica de Atuação e de Leitura para a Caracterização de Espécies .....</b>	<b>66</b>
4.1	Caracterização da impedância dos microelétrodos .....	66
4.2	Implementação da eletrónica em DC .....	72
4.3	Implementação da eletrónica em AC .....	72
4.3.1	Circuito de excitação.....	73
4.3.2	Circuito de amplificação.....	74
<b>5</b>	<b>Resultados Experimentais e Discussão .....</b>	<b>77</b>
5.1	Adaptação da plataforma microfluidica .....	78
5.2	Validação da plataforma microfluidica com deteção em DC.....	79
5.3	Validação da plataforma microfluidica com deteção em AC .....	81
5.4	Conclusão.....	84
<b>6</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>85</b>
6.1	Conclusões finais .....	85
6.2	Trabalho futuro .....	87
<b>7</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>88</b>
	<b>Anexo I –Principais características das espécies de fitoplâncton .....</b>	<b>93</b>
	<b>Anexo II – Campos elétricos e linhas de corrente formados pela passagem da partícula</b>	<b>97</b>
	<b>Anexo III – Simulações com mais partículas .....</b>	<b>103</b>

# LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Exemplo da implementação de um método de detecção magnético em dispositivos microfluídico (adaptado de [25]).	28
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática de contadores de dispersão <b>(a)</b> e atenuação da luz <b>(b)</b> (adaptado de [23]).	29
<b>Figura 3.</b> Exemplo da implementação de um método de detecção ótico em dispositivos microfluídicos (adaptado de [2]).	30
<b>Figura 4.</b> Ilustração de um contador capacitivo integrado em dispositivos microfluídicos (adaptado de [23]).	31
<b>Figura 5. (a)</b> Representação esquemático do método RPS. <b>(b)</b> Pulsos da corrente elétrica, causados pela passagem das partículas (adaptado de [39]).	32
<b>Figura 6.</b> Abordagens típicas de medição elétricas em AC. <b>(a)</b> Medições em AC com dois elétrodos. <b>(b)</b> Medições com três elétrodos em AC (adaptado de [21]).	33
<b>Figura 7. (a)</b> Detecção Típica por RPS numa plataforma microfluídica. <b>(b)</b> Distribuição das linhas do campo elétrico. <b>(c)</b> Esquemático de três elétrodos (adaptado de [21]).	34
<b>Figura 8.</b> Sinais gerados por uma partícula que passa pela zona de detecção do dispositivo em três alturas diferentes: próximo aos elétrodos (curva 1), pelo meio do canal (curva 2) e próximo do topo do canal (curva 3) (adaptado de [42]).	34
<b>Figura 9.</b> Modelo Gaussiano Bipolar usado para ajustar os sinais diferenciais (adaptado de [42]).	35
<b>Figura 10. (a), (b) e (c)</b> Comportamento da esfera de 6 $\mu\text{m}$ nas três posições do canal. <b>(d)</b> Comparação do diâmetro elétrico e do parâmetro de forma para a esfera de 6 $\mu\text{m}$ (adaptado de [42]).	37
<b>Figura 11.</b> Exemplo de um sistema microfluídico com RPS (adaptado de [36]).	37
<b>Figura 12.</b> Interferência da partícula no campo elétrico (adaptado de [36]).	38
<b>Figura 13.</b> Representação esquemática das propriedades elétricas envolvidas na medição por EIS (adaptado de [48]).	39
<b>Figura 14.</b> Esquemático da eletrônica implementada para leitura dos valores de impedância (adaptado de [48]).	40

<b>Figura 15. (a)</b> Representação esquemática da passagem de uma partícula sobre um canal microfluidico com três eletrodos e respetivo sinal de impedância medido. <b>(b)</b> Circuito eletrónico mostrando os componentes de excitação, amplificação e desmodulação (adaptado de [35]).....	41
<b>Figura 16.</b> Simplificação do Processo de Design.....	43
<b>Figura 17.</b> Ilustração esquemática da plataforma microfluidica que se pretende desenvolver.....	44
<b>Figura 18.</b> Ilustração dos elétrodos a implementar na zona de deteção do canal microfluidico. ....	45
<b>Figura 19.</b> Interface gráfica do <i>COMSOL Multiphysics</i> .....	46
<b>Figura 20.</b> Mudança da Impedância com a alteração da posição da partícula no canal <b>(a)</b> para elétrodos de 10/10 $\mu\text{m}$ e <b>(b)</b> para elétrodos 5/5 $\mu\text{m}$ (adaptado de [51]).....	46
<b>Figura 21.</b> Interface gráfica com dois elétrodos e a partícula de 6 $\mu\text{m}$ de raio, posicionada a 1 $\mu\text{m}$ de distância dos elétrodos. ....	49
<b>Figura 22.</b> Resultados da simulação da tensão gerada com dois elétrodos de: <b>(a)</b> 30/10 $\mu\text{m}$ com a partícula 6 $\mu\text{m}$ de raio a 1 $\mu\text{m}$ dos elétrodos; <b>(b)</b> 30/20 $\mu\text{m}$ com a partícula 6 $\mu\text{m}$ de raio a 2 $\mu\text{m}$ dos elétrodos; <b>(c)</b> 30/10 $\mu\text{m}$ com a partícula de 9 $\mu\text{m}$ de raio a 1 $\mu\text{m}$ dos elétrodos e <b>(d)</b> 30/20 $\mu\text{m}$ com a partícula de 9 $\mu\text{m}$ de raio a 2 $\mu\text{m}$ dos elétrodos.....	50
<b>Figura 23.</b> Resultados da simulação da densidade de corrente gerada com dois elétrodos de: <b>(a)</b> 30/10 $\mu\text{m}$ com a partícula 6 $\mu\text{m}$ a 1 $\mu\text{m}$ dos elétrodos; <b>(b)</b> 30/20 $\mu\text{m}$ com a partícula 6 $\mu\text{m}$ de raio a 2 $\mu\text{m}$ dos elétrodos; <b>(c)</b> 30/10 $\mu\text{m}$ com a partícula de 9 $\mu\text{m}$ de raio a 1 $\mu\text{m}$ dos elétrodos e <b>(d)</b> 30/20 $\mu\text{m}$ com a partícula de 9 $\mu\text{m}$ de raio a 2 $\mu\text{m}$ dos elétrodos. ....	50
<b>Figura 24.</b> Resultados da simulação da impedância gerada com dois elétrodos de: <b>(a)</b> 30/10 $\mu\text{m}$ com a partícula 6 $\mu\text{m}$ a 1 $\mu\text{m}$ dos elétrodos; <b>(b)</b> 30/20 $\mu\text{m}$ com a partícula 6 $\mu\text{m}$ de raio a 2 $\mu\text{m}$ dos elétrodos; <b>(c)</b> 30/10 $\mu\text{m}$ com a partícula de 9 $\mu\text{m}$ de raio a 1 $\mu\text{m}$ dos elétrodos e <b>(d)</b> 30/20 $\mu\text{m}$ com a partícula de 9 $\mu\text{m}$ de raio a 2 $\mu\text{m}$ dos elétrodos.....	51
<b>Figura 25.</b> Interface gráfica com três elétrodos e a partícula de 6 $\mu\text{m}$ de raio posicionada a 2 $\mu\text{m}$ dos elétrodos. ....	52
<b>Figura 26.</b> Resultados da simulação da tensão gerada com três elétrodos de: <b>(a)</b> 30/10 $\mu\text{m}$ com a partícula 6 $\mu\text{m}$ de raio a 2 $\mu\text{m}$ dos elétrodos; <b>(b)</b> 30/20 $\mu\text{m}$ com a partícula 6 $\mu\text{m}$ de raio a 2 $\mu\text{m}$ dos elétrodos; <b>(c)</b> 30/10 $\mu\text{m}$ com a partícula de 9 $\mu\text{m}$ de raio a 1 $\mu\text{m}$ dos elétrodos e <b>(d)</b> 30/20 $\mu\text{m}$ com a partícula de 9 $\mu\text{m}$ de raio a 1 $\mu\text{m}$ dos elétrodos.....	53
<b>Figura 27.</b> Resultados da simulação da densidade de corrente gerada com três elétrodos de: <b>(a)</b> 30/10 $\mu\text{m}$ com a partícula 6 $\mu\text{m}$ de raio a 2 $\mu\text{m}$ dos elétrodos; <b>(b)</b> 30/20 $\mu\text{m}$ com a partícula 6 $\mu\text{m}$ de	

raio a 2 $\mu\text{m}$ dos elétrodos; <b>(c)</b> 30/10 $\mu\text{m}$ com a partícula de 9 $\mu\text{m}$ de raio a 1 $\mu\text{m}$ dos elétrodos e <b>(d)</b> 30/20 $\mu\text{m}$ com a partícula de 9 $\mu\text{m}$ de raio a 1 $\mu\text{m}$ dos elétrodos. ....	53
<b>Figura 28.</b> Resultados da simulação da impedância gerada com três elétrodos de: <b>(a)</b> 30/10 $\mu\text{m}$ com a partícula 6 $\mu\text{m}$ de raio a 2 $\mu\text{m}$ dos elétrodos; <b>(b)</b> 30/20 $\mu\text{m}$ com a partícula 6 $\mu\text{m}$ de raio a 2 $\mu\text{m}$ dos elétrodos; <b>(c)</b> 30/10 $\mu\text{m}$ com a partícula de 9 $\mu\text{m}$ de raio a 1 $\mu\text{m}$ dos elétrodos e <b>(d)</b> 30/20 $\mu\text{m}$ com a partícula de 9 $\mu\text{m}$ de raio a 1 $\mu\text{m}$ dos elétrodos. ....	53
<b>Figura 29.</b> Interface gráfica com quatro elétrodos e a partícula de 6 $\mu\text{m}$ de raio, posicionada a 2 $\mu\text{m}$ dos elétrodos. ....	55
<b>Figura 30.</b> Resultados da simulação da tensão gerada com quatro elétrodos de: <b>(a)</b> 30/10 $\mu\text{m}$ com a partícula 6 $\mu\text{m}$ de raio a 2 $\mu\text{m}$ dos elétrodos; <b>(b)</b> 30/20 $\mu\text{m}$ com a partícula 9 $\mu\text{m}$ de raio a 1 $\mu\text{m}$ dos elétrodos. ....	55
<b>Figura 31.</b> Resultados da simulação da densidade de corrente gerada com quatro elétrodos de: <b>(a)</b> 30/10 $\mu\text{m}$ com a partícula 6 $\mu\text{m}$ de raio a 2 $\mu\text{m}$ dos elétrodos; <b>(b)</b> 30/20 $\mu\text{m}$ com a partícula 9 $\mu\text{m}$ de raio a 1 $\mu\text{m}$ dos elétrodos. ....	55
<b>Figura 32.</b> Resultados da simulação da impedância gerada com quatro elétrodos de: <b>(a)</b> 30/10 $\mu\text{m}$ com a partícula 6 $\mu\text{m}$ de raio a 2 $\mu\text{m}$ dos elétrodos; <b>(b)</b> 30/20 $\mu\text{m}$ com a partícula 9 $\mu\text{m}$ de raio a 1 $\mu\text{m}$ dos elétrodos. ....	55
<b>Figura 33.</b> Fotomáscaras utilizadas no fabrico da plataforma microfluídica para os <b>(a)</b> Elétrodos e para o <b>(b)</b> canal microfluídico. ....	59
<b>Figura 34.</b> Representação esquemática do processo de fotolitografia da resina fotossensível AZ 4562 utilizada no fabrico dos elétrodos. ....	60
<b>Figura 35.</b> Imagens obtidas do microscópio da padronização da resina fotossensível AZ 4562 antes de ocorrer a corrosão. ....	60
<b>Figura 36.</b> Esquemático do processo de corrosão química do AU. ....	61
<b>Figura 37.</b> Fotografia dos microelétrodos padronizados. ....	62
<b>Figura 38.</b> Representação esquemática do processo de fotolitografia da resina fotossensível SU-8 utilizada no fabrico do molde do canal microfluídico. ....	63
<b>Figura 39.</b> Representação esquemática do processo de preparação do PDMS. ....	64
<b>Figura 40.</b> Plataforma microfluídica fabricada <b>(a)</b> vista de cima e <b>(b)</b> vista ao microscópio. ....	65
<b>Figura 41.</b> Representação esquemática dos microelétrodos. ....	66
<b>Figura 42.</b> Circuito equivalente dos elétrodos. ....	67

<b>Figura 43.</b> Montagem experimental utilizada para caracterização dos valores de impedância. ....	68
<b>Figura 44.</b> Fotografias dos problemas verificados durante o teste prático: <b>(a)</b> danificação dos elétrodos e <b>(b)</b> obstrução do canal. ....	69
<b>Figura 45.</b> Plataforma microfluidica otimizada para realização dos testes experimentais. ....	69
<b>Figura 46.</b> Fotografia de microscopia ótica da partícula posicionada entre os elétrodos para realização da caracterização EIS. ....	70
<b>Figura 47.</b> Variação dos valores de impedância registados com GAMRY com e sem partículas na plataforma microfluidica. ....	70
<b>Figura 48.</b> Implementação DC na plataforma microfluidica. ....	72
<b>Figura 49.</b> Representação esquemática dos principais módulos eletrônicos necessários para as medições em AC. ....	73
<b>Figura 50.</b> Representação esquemático do circuito de excitação implementado. ....	74
<b>Figura 51.</b> Representação esquemática da ligação do circuito de amplificação para a configuração com <b>(a)</b> três e <b>(b)</b> quatro elétrodos. ....	74
<b>Figura 52.</b> Representação esquemático do amplificador de instrumentação implementado. ....	76
<b>Figura 53.</b> Esquemático da divisão dos Resultados Experimentais. ....	77
<b>Figura 54.</b> Representação esquemática da configuração utilizada na simulação da plataforma microfluidica adaptada. ....	78
<b>Figura 55.</b> Gráficos de <b>(a)</b> tensão, <b>(b)</b> de densidade de corrente e <b>(c)</b> impedância obtidos por simulação relativamente à plataforma adaptada. ....	79
<b>Figura 56.</b> Montagem experimental utilizada para as medições em DC. ....	79
<b>Figura 57.</b> Valores de tensão registados com a passagem de água do mar pela plataforma microfluidica. ....	80
<b>Figura 58.</b> Valores de tensão registados com a passagem das partículas de <b>(a)</b> 60 $\mu\text{m}$ e <b>(b)</b> 20 $\mu\text{m}$ pela plataforma microfluidica. ....	81
<b>Figura 59.</b> Montagem experimental utilizada para realização dos testes em AC. ....	81
<b>Figura 60.</b> Valores de tensão AC registados durante a passagem de água do mar na plataforma microfluidica. ....	82
<b>Figura 61.</b> Valores de tensão AC da passagem de partículas de 60 e 20 $\mu\text{m}$ na plataforma microfluidica. ....	82

**Figura 62.** Variações da tensão com a passagem das algas *Alexandrium Tamarense* e *Alexandrium Minutum* na plataforma microfluídica. .... 83

# LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Diferentes métodos de detecção implementados na citometria de fluxo microfluídica (adaptado de [23, 27]).....	27
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros utilizados nas simulações numéricas com dois elétrodos.....	48
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros utilizados nas simulações numéricas com três elétrodos. ....	52
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros utilizados nas simulações numéricas com quatro elétrodos. ....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

AC – *Alternating Current* (Corrente Alternada)  
ADC - *Analogue-to-Digital Converter*  
ADN - Ácido Desoxirribonucleico  
ARN - Ácido Ribonucleico  
Au – Ouro  
CAD – *Computer-aided Design*  
CCD – Charge - Coupled Device  
CMOS - Complementary Metal Oxide Semiconductor  
Cr – Crómio  
DC – *Direct Current* (Corrente Contínua)  
EIS - Espectroscopia de Impedância Elétrica  
GMR - Giant Magneto-Resistive  
HABs - *Harmful Algae Blooms*  
HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*  
IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera  
LOC - *Lab-on-a-chip*  
PCR - Polymerase Chain Reaction  
PDMS – Polidimetilsiloxano  
PIV - *Particle Image Velocimetry*  
PVD – *Physical vapor deposition*  
RC – Circuito Resistência – Condensador  
RPS – *Resistive Pulse Sensing*  
SU-8 - Éter glicídico de bisfenol A  
UV – Luz Ultra-Violeta

# 1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo apresenta-se o enquadramento do presente trabalho, onde se evidencia a necessidade de sensores para a quantificação de células de fitoplâncton. Para além disso descrevem-se de forma sucinta os objetivos do trabalho proposto bem como a motivação para os alcançar. Por fim, são apresentadas as principais contribuições e a organização desta dissertação.

## 1.1 Enquadramento

O fitoplâncton compreende um conjunto de organismos microscópicos aquáticos (tradicionalmente designados por algas) com um papel importante no ecossistema marinho, uma vez que são a base da cadeia alimentar marinha. Para além disso, são responsáveis por praticamente metade da produção de oxigénio ocorrida em todo o planeta sendo vital para manter o equilíbrio ambiental destes ecossistemas, contribuindo assim para que os organismos que nele habitam sobrevivam e se desenvolvam [1]. O fitoplâncton é composto por microrganismos unicelulares autotróficos com capacidade fotossintética que vivem em suspensão na coluna de água dos rios e oceanos, existindo numa ampla gama de tamanhos e com características variadas [2]. Devido à dependência da luz solar habitam na zona eufótica (zona superior da coluna de água), utilizando diversas estruturas ou mecanismos como flagelos, vacúolos de gás, aumento da relação área superfície/volume. O fitoplâncton abrange um conjunto de algas e cianobactérias diversificado do ponto de vista taxonómico, morfológico e fisiológico. A sua identificação taxonómica é complexa sendo baseada na morfologia celular, ornamentação, cor, reservas e pigmentos fotossintéticos. Existem milhares de espécies de fitoplâncton reconhecidas, mas apenas algumas dezenas possuem capacidade de produzir toxinas,

sendo o grupo das diatomáceas e dos dinoflagelados os de maior relevância. Estas espécies, sob determinadas condições ambientais podem levar a um crescimento excessivo e atingir elevadas densidades provocando um fenómeno designado por florescimento de algas nocivas (do inglês *Harmful Algae Blooms* - HABs). As toxinas produzidas por estes grupos podem acumular-se em certos organismos, como peixes e moluscos, representando um elevado risco para a saúde humana, especialmente pelo consumo de produtos contaminados derivados das atividades de aquacultura ou piscatória [3]. Para além disso, contribuem para perdas económicas significativas, visto que ao ocorrer estes tipos de distúrbios, as autoridades proíbem a captura de espécies marinhas para consumo humano, prejudicando os setores marinhos (por exemplo aquacultura moluscos e peixes). Este tipo de ocorrências também acarreta prejuízos significativos no turismo e nas atividades relacionadas com a zona costeira. Por este motivo, a identificação e quantificação do fitoplâncton é essencial para salvaguardar a saúde humana bem como garantir o bom funcionamento das atividades marinhas. Assim, as técnicas de monitorização de fitoplâncton são uma grande necessidade para o estudo dos ecossistemas marinhos, de forma a ser possível desenvolver estratégias para compreender, prevenir e mitigar os impactos ambientais e económicos destas ocorrências [4, 5].

Diversos métodos têm sido utilizados para monitorização de fitoplâncton, tais como técnicas baseadas em microscopia, técnicas moleculares, cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC do inglês *high performance liquid chromatography*) e citometria de fluxo.

### 1.1.1 Técnicas microscópicas

As técnicas microscópicas são os métodos mais utilizados para a identificação e enumeração de células de fitoplâncton, devido em grande parte, à sua simplicidade uma vez que esta técnica apenas requer um microscópio de alta qualidade. A quantificação de fitoplâncton através do uso do microscópio é feita pela contagem manual do número de células individuais de cada *táxon* de um determinado volume de amostra utilizando uma câmara de contagem colocada sob o microscópio. A identificação de espécies de fitoplâncton usando o microscópio é baseada em informações morfológicas e outros critérios visíveis, tais como: ornamentação, cor, reservas alimentares e pigmentos fotossintéticos, permitindo a sua identificação pelo taxonomista [3, 6].

As técnicas microscópicas podem ser complementadas pela utilização da fluorescência natural das espécies de fitoplâncton, utilização de marcadores de células ou dos seus organelos, bem como utilizando técnicas de análise de imagem para auxiliar a identificação das espécies de fitoplâncton. A

fluorescência natural, produzida a partir dos pigmentos fotossintéticos, permite identificar por exemplo clorofila a, peridina, fucoxantina ou ficoeritrinas utilizando filtros de excitação e emissão característicos de cada pigmento permitindo assim a sua distinção. Para realizar esta técnica é essencial a utilização de um microscópio de alta qualidade que esteja equipado com uma fonte de luz, um conjunto de filtros óticos e objetivas apropriadas para a fluorescência [7].

A análise manual das espécies de fitoplâncton através do microscópio é demorada e por isso, têm sido desenvolvidas técnicas automatizadas para análise de imagens utilizando padrões de reconhecimento que permitem a identificação automática de algumas espécies [7].

Uma das grandes limitações das técnicas de microscopia é a necessidade de taxonomistas com elevado grau de conhecimento e experiência na identificação das espécies, e por isso esta técnica é muito suscetível à ocorrência de erros provenientes da má interpretação humana. Para além disso, utiliza procedimentos demorados desde a recolha, preservação e transporte da amostra até ao laboratório, bem como exige longos tempos de análise. Esta demora pode ser uma grande desvantagem, especialmente quando são necessárias medidas preventivas para reduzir atempadamente o impacto dos HABs. A contagem microscópica normalmente requer um mínimo de 500 células de uma única amostra, o que se traduz num processo de contagem com duração de várias horas. Devido ao longo tempo de análise, é necessário que as amostras sejam preservadas para análise posterior, o que pode levar a ocorrência de artefactos ou perda de pigmentos que poderiam ser úteis na identificação de espécies. Esta técnica em termos de resolução não é muito adequada para espécies que tenham tamanho inferior a 3 µm. Para além disso, a utilização desta técnica está restrita apenas para utilização em laboratório [8, 9].

### 1.1.2 Técnicas moleculares

Devido a algumas dificuldades e limitações das técnicas de identificação morfológica foram desenvolvidos métodos alternativos para o estudo de fitoplâncton, tais como as técnicas moleculares. Estas técnicas apresentam potencial para análises mais rápidas e precisas, explorando as diferenças genéticas das espécies, em vez das diferenças morfológicas [7, 10].

Métodos de hibridação *in-situ* [utilização de oligonucleóticos de ácido desoxirribonucleico (ADN) ou de ácido ribonucleico (ARN)] e ensaios baseados em reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido abordagens moleculares utilizadas na identificação de espécies de fitoplâncton. Os oligonucleóticos e os *primers* de PCR são fragmentos curtos de ADN ou ARN sintéticos que são complementares ao ADN/ARN do fitoplâncton. A sequenciação molecular de células de fitoplâncton dá informações sobre as sequências

de ADN específicas de muitas espécies de todo o mundo, permitindo assim a conceção de sondas de oligonucleóticos e *primers* de PCR específicas e que permitem a identificação das espécies de fitoplâncton. Por norma as sondas de oligonucleóticos que hibridizam com ADN ou ARN complementar possuem marcadores fluorescentes, permitindo a identificação direta por microscopia de fluorescência. A especificidade dos *primers* utilizados em PCR permitem a amplificação de sequências de ADN/ARN específicas das células de fitoplâncton. Os fragmentos de ADN amplificados são quantificados, indicando assim a concentração de fitoplâncton de cada espécie [7].

As análises moleculares mostraram ser bastante precisas e permitem uma identificação ao nível da espécie, mas requerem equipamentos, pessoas e laboratórios especializados, e para além disso, exigem um conhecimento elevado da diversidade genética de fitoplâncton de uma certa região.

### 1.1.3 Técnicas de HPLC

A técnica de cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC) é utilizada na separação, identificação e quantificação de pigmentos fotossintéticos fornecendo informações relativamente à biomassa, composição e ao estado fisiológico do fitoplâncton. A técnica de HPLC não fornece informação taxonómica com a precisão da técnica microscópica, mas é mais rápida e produz resultados extremamente reprodutíveis. Para além disso, deteta grupos taxonómicos de fitoplâncton com dimensões reduzidas. Este método inicia-se com um processo de extração dos pigmentos fotossintéticos presentes no fitoplâncton seguido por um passo de filtração para remover os restantes detritos celulares. Os pigmentos extraídos são separados por cromatografia e identificados a partir dos espectros de absorção ou de fluorescência e dos respetivos tempos de retenção. A concentração de cada pigmento é calculada a partir de sinais obtidos pelos fotodetetores comparando com pigmentos *standards*. Esta técnica requer processos de calibração complexos que são feitos em duas fases. Na primeira fase é feita a otimização do ensaio e obtenção dos tempos de retenção de cada pigmento a ser analisado. Na segunda fase é feita a calibração da resposta do fotodetector (absorção e fluorescência) utilizando pigmentos *standards*. Estes processos de calibração são também limitados pelos pigmentos fotossintéticos *standards* que estão disponíveis comercialmente e para além disso só pode ser realizado em laboratórios com pessoal altamente qualificado [7, 10–12].

### 1.1.4 Citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo permite a quantificação e discriminação de células de fitoplâncton com elevada precisão de uma forma rápida e automática. Esta técnica baseia-se na medição dos sinais de fluorescência (natural ou induzida) e da dispersão da luz de uma célula de fitoplâncton em suspensão que passa individualmente através da zona de deteção (inclui fonte de luz normalmente composta por um ou vários lasers). As informações fornecidas por esta técnica (sinais de fluorescência e da luz dispersa), permitem indicar simultaneamente a composição intrínseca de pigmentos bem como o tamanho, forma e complexidade das células. Esta tecnologia é bastante robusta para identificar populações de fitoplâncton com medidas  $< 2 \mu\text{m}$ , que são muito difíceis de identificar por técnicas convencionais [2, 7].

Com o objetivo de obter instrumentos automáticos de classificação e identificação de fitoplâncton, os citómetros convencionais foram combinados com tecnologias de imagem para analisar características morfológicas, características *gray scale* (intensidade, transparência, informações de cor, etc) e características espectrais (área e largura do pico de fluorescência). Ao mesmo tempo, têm sido desenvolvidos *softwares* de análise de imagem para combinar toda a informação e identificar automaticamente as células de fitoplâncton. Alguns dispositivos de citometria de imagem, desenvolvidos para identificação *in-situ* de fitoplâncton, são os FlowCam<sup>TM</sup> (*Fluid Imaging Technologies*), CytoSense/CytoSub (CytoBuoy b.v., NL) e FlowCytobot (*McLane Research Laboratories*). No entanto estes dispositivos ainda são muito pesados e muito caros, o que limita bastante a sua utilização rotineira [13].

## 1.2 Motivação

A monitorização de fitoplâncton (abundância, composição e diversidade da comunidade) é essencial para proteção da saúde dos ecossistemas aquáticos, para garantir a segurança alimentar e para proteger a saúde humana. Apesar de existirem vários métodos para a identificação de fitoplâncton com elevada sensibilidade, estes ainda não permitem utilização em programas de monitorização rotineira devido ao seu elevado custo, elevado consumo de tempo e reagentes e de necessitarem de recursos humanos altamente treinados. Assim surgiu a ideia de criar versões miniaturizadas dos citómetros de fluxo com possibilidade de serem transportados em boias marinhas ou em veículos subaquáticos.

Embora tenham superado a lacuna de análises *in situ*, ainda são limitadas pela disponibilidade, tamanho, custo e complexidade dos equipamentos.

Nos últimos anos, os avanços verificados nas tecnologias de microfabricação [14] e microfluidica levaram ao desenvolvimento de plataformas *lab-on-a-chip* (LOC) sofisticadas, portáteis e baratas com reduzido consumo de reagentes e energia, e capazes de operar autonomamente em qualquer ambiente. Para além disso, podem facilmente integrar vários métodos de deteção, permitindo analisar um elevado número de amostras num reduzido período e sem necessidade de pessoal altamente especializado. As vantagens destas tecnologias podem ajudar a colmatar algumas das limitações mencionadas anteriormente e permitir desenvolver uma plataforma LOC portátil, precisa e pequena, para identificação e quantificação de fitoplâncton, capaz de operar autonomamente em áreas remotas e submersas por vários meses, fornecendo análise em tempo real dos ecossistemas. O desenvolvimento de um LOC baseado nas tecnologias da citometria de fluxo com microeletrónica de controlo e leitura, promete uma plataforma de monitorização de fitoplâncton com enorme impacto em várias áreas, especialmente na segurança alimentar, gestão sustentável, controlo da poluição e de qualidade da água, entre outros.

Estes avanços, levaram ao desenvolvimento de detetores à microescala integrados em citómetros microfluidicos que têm sido aplicados na contagem de células bem como na identificação de diferentes tipos de células sem necessidade de qualquer marcação. Apesar destes avanços, estas tecnologias ainda não fornecem plataformas baratas, portáteis, automatizadas e de fácil integração. Assim estas limitações motivaram o trabalho desta dissertação, que consiste no desenvolvimento de uma plataforma LOC portátil e eficaz para a quantificação de células de fitoplâncton, fornecendo um benefício considerável na análise em tempo real do ecossistema [15]. Esta funcionalidade irá futuramente ser integrada num citómetro microfluidico com múltiplas funcionalidades que vão desde a contagem com o sistema desenvolvido à análise ótica dos principais pigmentos fotossintéticos presentes no fitoplâncton. A combinação das informações fornecidas por ambas as tecnologias (elétricas e óticas) permitirão identificar fitoplâncton ao nível da espécie, com indicação da presença ou ausência de espécies tóxicas.

### 1.3 Objetivos

Esta dissertação tem como principal objetivo o desenvolvimento de um LOC para quantificar células de fitoplâncton, o qual será futuramente incluído num citómetro microfluidico para identificação de espécies de fitoplâncton. O dispositivo proposto será capaz de fornecer informações sobre o tamanho da célula de fitoplâncton a partir das medições elétricas, quando estas passam individualmente pela

zona de deteção no canal microfluídico. O princípio de medição baseia-se na tecnologia *Resistance Pulse Sensor* (RPS) utilizando microeléctrodos em filme fino. Para além disso, esta dissertação tem como objetivo a realização de simulações numéricas para encontrar as geometrias ótimas dos microcanais e dos microeléctrodos a serem integrados na plataforma microfluídica, de forma a obter a máxima sensibilidade para a gama de tamanho normalmente encontrada nas espécies de fitoplâncton (com comprimentos compreendidos entre os 2  $\mu\text{m}$  e os 160  $\mu\text{m}$  e larguras entre os 0,5  $\mu\text{m}$  e os 60  $\mu\text{m}$ ). Nesta dissertação também tem como objetivo implementar a eletrónica de atuação e leitura para o sistema de contagem a ser integrado no LOC.

## 1.4 Contribuições desta dissertação

Este trabalho pretende incrementar as funcionalidades dos sistemas de monitorização de fitoplâncton, especialmente na capacidade de quantificar células de tamanho reduzido com um dispositivo sensível e de baixo custo. Esta funcionalidade irá complementar as informações fornecidas pelos citómetros microfluídico e para além disso, podem funcionar como um sistema *on/off* de baixo consumo para ativar as tecnologias mais exigentes (aquisição de imagem ou medições óticas) e evitar que estejam continuamente ligadas.

## 1.5 Organização da dissertação

A presente dissertação encontra-se dividida da seguinte forma:

- Capítulo 1 resume os principais objetivos e motivações do presente trabalho bem como o seu enquadramento.
- Capítulo 2 apresenta um levantamento bibliográfico dos principais conceitos que envolvem o desenvolvimento desta dissertação, passando pela exploração dos métodos de contagem de células, com especial ênfase nos sistemas integrados em dispositivos microfluídicos.
- Capítulo 3 inclui as simulações numéricas desenvolvidas para encontrar a melhor configuração dos microeléctrodos bem como do canal microfluídico. Apresenta ainda o processo de fabrico detalhado de toda a plataforma microfluídica.
- Capítulo 4 descreve a eletrónica de atuação e leitura desenvolvida.

- Capítulo 5 descreve os testes experimentais para validação da plataforma, os resultados obtidos e sua discussão.
- Capítulo 6 apresenta as principais conclusões bem como algumas sugestões para o desenvolvimento de trabalho futuro.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo é feito um levantamento bibliográfico sobre as tecnologias de detecção de fitoplâncton integradas em dispositivos microfluídicos, evidenciando as suas principais vantagens. Os trabalhos encontrados na literatura serviram como prova de conceito para a proposta a desenvolver nesta dissertação, sendo que o principal ênfase foi dado à tecnologia RPS, a qual será integrada no trabalho desenvolvido nesta proposta.

### 2.1 Plataformas microfluídicas para detecção de fitoplâncton

A microfluidica é a tecnologia que processa ou manipula pequenas quantidades de fluidos (ordem dos nL aos  $\mu\text{L}$ ) em canais com dimensões micrométricas. A combinação desta tecnologia com a microeletrônica, mecânica, ótica, biotecnologia e outras áreas científicas têm permitido desenvolver plataformas sobre as quais um ou mais testes laboratoriais são completamente integradas num único chip com o tamanho de alguns centímetros quadrados [16].

As plataformas microfluídicas e os sistemas LOC podem fornecer inúmeros benefícios relativamente às tecnologias convencionais que normalmente só podem ser realizadas em laboratórios especializados. As principais vantagens incluem a miniaturização, integração de inúmeros ensaios com processamento e análise de amostra de forma automatizada e sem necessidade de pessoal altamente treinado [2, 16–21]. Para além disso, estes dispositivos apresentam um baixo consumo, o que os torna ferramentas excelentes para a monitorização *in-situ* e por longo termo.

As plataformas microfluídicas são obtidas a partir de tecnologias de fabricação bem estabelecidas e de baixo custo [22] e permitem a integração de diversos métodos de detecção [23].

As vantagens da tecnologia microfluídica, têm levado ao desenvolvimento de plataformas LOC baseadas em citômetros de fluxo [2], com a integração de diversas técnicas de detecção e contagem de partículas/células, tais como: RPS, contadores capacitivos, magnéticos, dispersão e atenuação da luz, fluorescência e velocimetria por imagem de micropartículas (Micro-PIV do inglês *Micro-Particle image velocimetry*) [23].

A combinação destes métodos com a tecnologia microfluídica tem mostrado um enorme impacto na oceanografia principalmente em análises realizadas através de citômetros de fluxo microfluídicos.

## 2.2 Citómetro microfluídico

A citometria de fluxo foi desenvolvida para análises de células individuais no final de 1960 e desde então tem sido amplamente utilizada para contar, caracterizar e classificar células. A citometria de fluxo tradicional utiliza tecnologia laser ou impedância para realizar a contagem e classificação de células suspensas num fluxo de fluido, obrigando-as a passar por uma zona de detecção ótica ou elétrica [24–26]. Com os grandes avanços da microfluídica, começou a introduzir-se este conceito na citometria de fluxo, chamada de citometria de fluxo microfluídica. Nestes sistemas, as células são obrigadas a circular em microcanais, compatíveis com o tamanho das mesmas, possibilitando a sua análise individual. Este género de citometria também integra múltiplos sistemas, tais como, bombeamento, amostragem, detecção, entre outros [25].

Apesar dos citômetros microfluídicos ainda não estarem tão bem estabelecidos e aperfeiçoados como os citômetros convencionais, os citômetros microfluídicos acarretam muitas vantagens tais como as dimensões reduzidas, custo inferior e a possibilidade de ser portátil, tornando as análises mais fáceis.

## 2.3 Métodos de quantificação de células em dispositivos microfluídicos

Existem diversos métodos de detecção que podem ser incorporados em citômetros de fluxo microfluídicos, dependendo do ensaio e do tipo de análise que se pretende fazer às partículas/células.

Na tabela 1, estão representados os métodos de detecção que atualmente são utilizados em protótipos deste género e que podem ser classificados em três categorias diferentes [26–28].

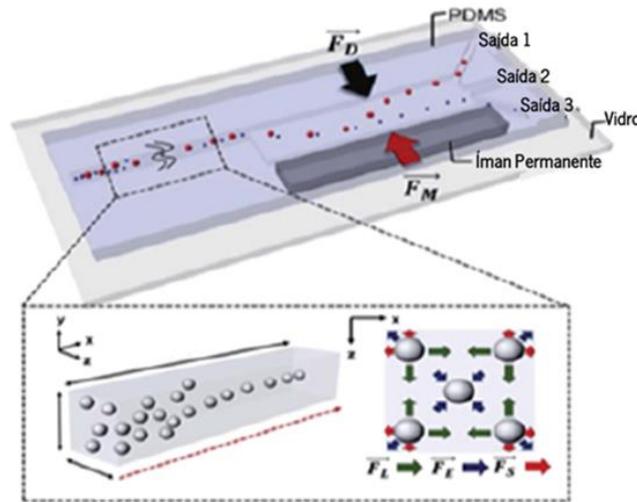
**Tabela 1.** Diferentes métodos de detecção implementados na citometria de fluxo microfluidica (adaptado de [23, 27])

<b>Método de detecção</b>		<b>Mecanismo</b>	<b>Aspetos importantes</b>
<b>Magnético</b>		Os campos magnéticos são perturbados quando uma partícula paramagnética flui entre os elétrodos.	Utilizam sensores <i>Giant Magneto-Resistive</i> (GMR).
<b>Ótico:</b>	<b>Fluorescência</b>	A luz de excitação atinge um fluorocromo presente na partícula, desencadeando emissão de fótons num comprimento de onda diferente, o qual pode ser detetado.	Capaz de multiplexagem com comprimentos de onda diferentes. As <i>waveguides</i> aumentam a precisão do sistema. Normalmente utilizam câmaras <i>Complementary Metal Oxide Semiconductor</i> (CMOS) ou <i>Charge - Coupled Device</i> (CCD), uma fonte de luz e algoritmos de leitura.
	<b>Dispersão e atenuação da luz</b>	Utilizado para detetar partículas grandes e muito concentradas.	Utilizam luz laser para iluminar as partículas.
	<b>Micro-PIV</b>	Deteta a velocidade das partículas no fluido.	Este dispositivo é composto por uma câmara digital e um laser de alta potência.
<b>Elétrico:</b>	<b>Impedância</b>	A corrente elétrica entre os elétrodos é perturbada quando uma partícula flui entres eles.	Estes dispositivos microfluidicos normalmente usam corrente alternada (AC do inglês <i>alternating current</i> ). Necessitam de Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIS).
	<b>Capacitivo</b>	Os contadores capacitivos são utilizados em soluções onde o líquido apresenta baixa condutividade elétrica, principalmente para detetar mudanças no conteúdo celular.	Estes dispositivos efetuam as suas medições em corrente AC.

### 2.3.1 Métodos magnéticos

Os métodos de detecção magnéticos dependem do movimento de partículas superparamagnéticas, que só apresentam magnetização na presença de um campo magnético externo [29]. Este método tem sido amplamente utilizado para separação de partículas presentes numa determinada mistura [25]. Neste tipo de detecção é utilizado um forte íman permanente (campo de

magnetização externo) sobre os microcanais, como representado na figura 1. O íman cria um campo magnético que se sobrepõe pelas partículas fazendo com que essas sejam atraídas ou repulsadas consoante o seu tamanho. Como as partículas maiores têm uma maior inércia são repulsadas para mais longe do íman (saída 1- figura 1), ao contrário daquilo que acontece com as partículas mais pequenas visto que tem uma inércia mais baixa, fazendo com estas sejam mais aproximadas do íman (saída 3 – figura 1) [25, 29].



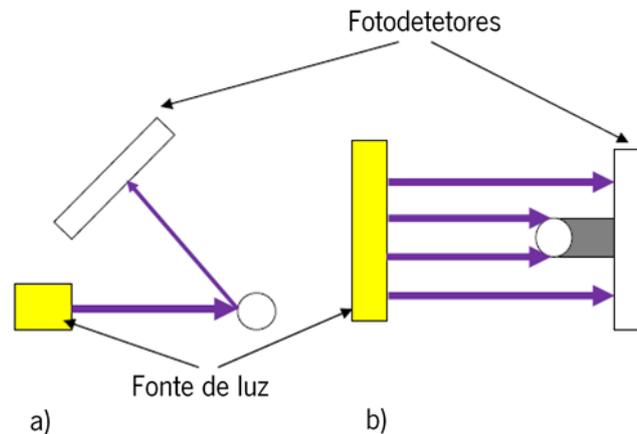
**Figura 1.** Exemplo da implementação de um método de detecção magnético em dispositivos microfluídico (adaptado de [25]).

Esta técnica não é utilizada com muita frequência, principalmente em citômetros de fluxo microfluídicos, porque exige equipamentos complexos e volumosos para efetuar as detecções magnéticas e apresenta algumas dificuldades na integração em dispositivos microfluídico. Para além disso, são necessário recursos humanos específicos para o manuseamento do material e as partículas precisam de pré-tratamento antes de serem colocadas na análise [25, 27].

## 2.3.2 Métodos óticos

### 2.3.2.1 Contadores de dispersão e atenuação de luz

A contagem de partículas a partir de métodos óticos pode ser feita a partir da atenuação da intensidade luminosa quando esta atravessa uma solução com partículas, sofrendo fenómenos de dispersão e absorção de luz. Estes métodos têm sido integrados em dispositivos microfluídicos utilizando uma fonte de luz (normalmente díodos laser) para iluminar individualmente as partículas que passam através do feixe provocando uma interação ótica (absorção e reflexão), a qual pode ser detetada por fotodetores (figura 2).

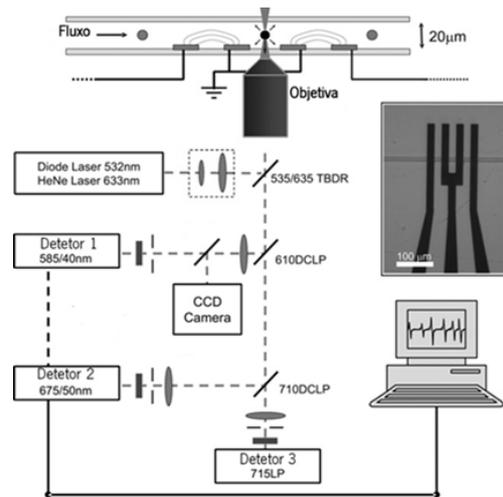


**Figura 2.** Representação esquemática de contadores de dispersão **(a)** e atenuação da luz **(b)** (adaptado de [23]).

As alterações provocadas pela atenuação e dispersão da luz pode ser utilizada para fornecer o tamanho e complexidade bem como o número de partículas a partir do número de pulsos [23]. Contudo estes métodos ainda apresentam baixa sensibilidade comparativamente com os métodos elétricos, especialmente porque dependem da área da partícula que interfere com o feixe ótico [23].

### 2.3.2.2 Contadores baseados em fluorescência

A contagem de partículas a partir dos métodos de fluorescência utilizam a capacidade das células alvo libertarem fótons de fluorescência num determinado comprimento de onda quando são submetidas a um laser monocromático que é usado para excitar essas células. Os fótons emitidos estão confinados a um comprimento de onda de energia mais baixa e diferente do comprimento de onda do fóton de excitação [25, 27, 30, 31]. Estes métodos têm sido integrados em dispositivos microfluídicos para deteção de fitoplâncton, uma vez que estes apresentam pigmentos fotossintéticos capazes de emitir fluorescência natural quando excitados com comprimentos de onda específicos. Na figura 3 está apresentado um exemplo desta tecnologia para fazer leitura em microcanais utilizando dois lasers com comprimentos de onda diferentes para fazer a excitação [2]. A intensidade de fluorescência é proporcional à concentração dos pigmentos. Apesar de este método ser bastante sensível, necessita que as partículas apresentem fluorescência natural ou que sejam marcadas com fluorocromos para permitir a sua quantificação. Estes requisitos obrigam a realizar procedimentos adicionais que podem limitar a sua utilização em sistemas de monitorização contínua. Para além disso, são mais complexos e caros quando comparados com os métodos de deteção elétrica.



**Figura 3.** Exemplo da implementação de um método de detecção ótica em dispositivos microfluídicos (adaptado de [2]).

### 2.3.2.3 Micro-PIV

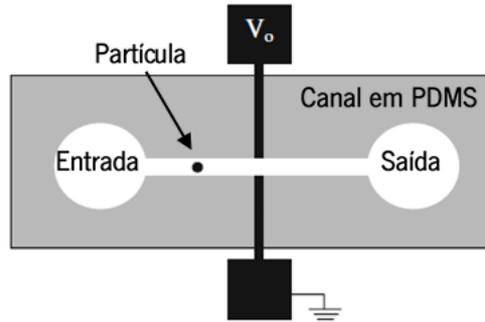
O micro-PIV é um método ótico que permite avaliar velocidades instantâneas e propriedades das partículas presentes num fluido. O movimento das partículas é obtido a partir de imagens sequenciais que captam as diferentes posições da partícula. De uma forma genérica, estes dispositivos compreendem uma câmara digital e um laser de alta potência. O laser atua como um flash fotográfico e a partícula no fluido dispersa a luz que é detetada pela câmara. Atualmente, o micro-PIV tem-se tornado um instrumento muito vulgar para medições em fluxo em numerosas aplicações. Apesar disso, exige processamento de imagens com trabalho computacional complexo e instrumentos de elevado custo e volumosos, o que limita a sua utilização para aplicações *in-situ* e em tempo real [23].

### 2.3.3 Métodos elétricos

Os componentes óticos são invariavelmente mais caros que os componentes eletrónicos e mais difíceis de integrar em plataformas miniaturizadas. Por esta razão, os métodos de detecção elétricos têm-se tornado mais atraentes em termos de miniaturização, simplicidade e em questões de eficiência *versus* custo [25]. Assim sendo, as deteções por método elétrico têm estado a desempenhar um papel importante nos citómetros de fluxo microfluídicos.

#### 2.3.3.1 Contadores capacitivos

Os contadores capacitivos baseiam-se na medição da capacitância AC quando uma partícula micro ou submicrométrica passa sobre a zona sensível (figura 4) [23].



**Figura 4.** Ilustração de um contador capacitivo integrado em dispositivos microfluidicos (adaptado de [23]).

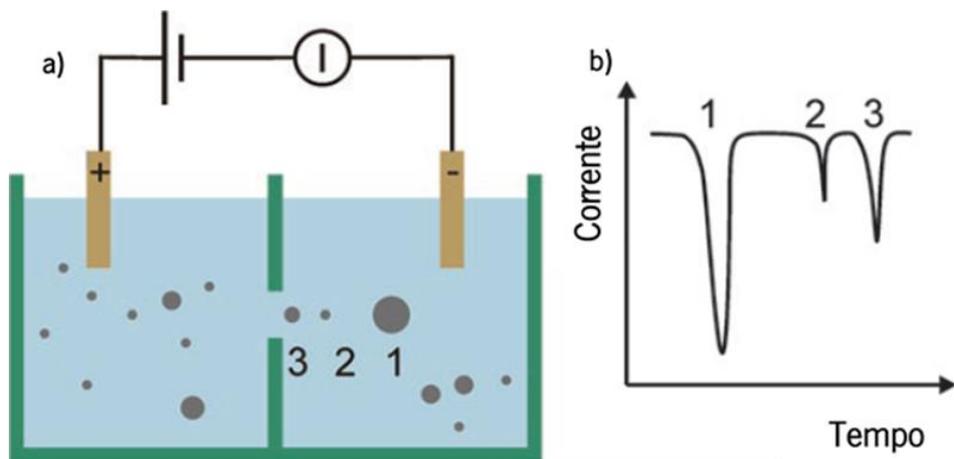
Este tipo de tecnologia é bastante útil para detetar partículas em soluções de baixa condutividade elétrica dado que a alteração da resistência elétrica provocada pela passagem de partícula em meios de baixa condutividade é difícil de detetar. Por outro lado, em meios com elevada condutividade, como o meio marinho, a medição de impedância é o método mais indicado [23].

### 2.3.3.2 Resistive pulse sensing (RPS)

RPS é o termo genérico dado à tecnologia que é utilizada na contagem e dimensionamento de partículas baseada no princípio de *Coulter*. Este princípio foi descoberto por *Wallace H. Coulter* e seu irmão no final da década de 1940, desenvolvendo uma tecnologia para contar e dimensionar partículas através da medição das variações de corrente elétrica. A tecnologia foi desenvolvida principalmente para contar células sanguíneas de uma forma rápida através da medição das mudanças na condutividade elétrica, à medida que as células suspensas num fluido condutor passam por um pequeno orifício [32], sendo esta a aplicação mais bem-sucedida e importante do princípio de *Coulter*. A técnica tem sido utilizada para diagnosticar uma variedade de doenças, sendo o método de referência para contagem de glóbulos vermelhos e leucócitos. O princípio de *Coulter* tem a capacidade de produzir um perfil detalhado das células do sangue dos pacientes com capacidade para discriminar e contar células com diâmetros de aproximadamente 6 a 10  $\mu\text{m}$  [33]. Para além disso, este método também se mostra como o método de laboratório mais confiável para a contagem de uma grande variedade de células: bactérias (< 1  $\mu\text{m}$  de tamanho), células de gordura (aproximadamente 400  $\mu\text{m}$ ), agregados de células vegetais (> aproximadamente 1200  $\mu\text{m}$ ) e células tronco (aproximadamente 900  $\mu\text{m}$ ) [33–35]. O sucesso desta tecnologia fez com que o princípio de *Coulter* fosse adaptado à micro e nanoescala em combinação com canais micro e nanofluidicos [36–38].

A técnica RPS, encontra-se amplamente na indústria [21], para efetuar a contagem e o dimensionamento de partículas. A deteção baseia-se na passagem de partículas através de um canal

onde se aplica uma tensão elétrica constante, como pode ser visualizado na figura 5 a). O movimento da partícula sobre os eletrodos, bloqueia o fluxo de corrente causando uma variação cuja intensidade é proporcional ao volume da partícula que atravessa o canal. As partículas que atravessam o canal são más condutoras, alterando as propriedades de condução elétrica. Se estas partículas forem menos condutoras que o líquido circundante (eletrolítico), a resistência elétrica aumenta, fazendo com que a intensidade de corrente elétrica diminua. O número de pulsos detetados durante a medição corresponde ao número de partículas e a amplitude do pulso é proporcional ao tamanho de partículas, como se pode comprovar pela figura 5 b) [33, 35, 39].

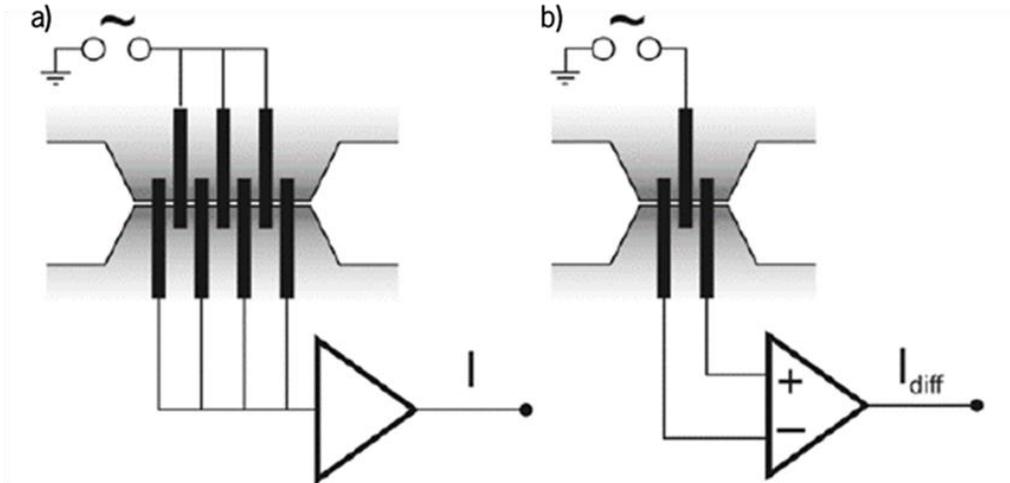


**Figura 5.** (a) Representação esquemática do método RPS. (b) Pulsos da corrente elétrica, causados pela passagem das partículas (adaptado de [39]).

A técnica RPS só é possível ser aplicada se forem cumpridos alguns requisitos, nomeadamente, as partículas devem ser suspensas num líquido condutor, o campo elétrico deve ser fisicamente restrito para que o movimento de partículas cause mudanças detetáveis na corrente e por último, as partículas devem estar suficientemente diluídas e distribuídas pelo canal, para que apenas uma partícula passe pela zona de deteção, impedindo a coincidência de pulsos elétricos [35, 39].

As primeiras experiências com RPS foram realizadas em corrente contínua (DC do inglês *direct current*) mas essa configuração foi recentemente substituída por AC de baixa frequência de forma a minimizar efeitos eletroquímicos adversos, nomeadamente a alteração do pH, geração de bolhas de gás por eletrólise e polarização de eletrodos. A polarização dos eletrodos pode provocar o aumento da resistência elétrica no canal provocando problemas ao nível da sensibilidade [36, 38]. Assim, a medição em AC melhora significativamente o método RPS, diminuindo a resistência de polarização dos eletrodos, e suprimindo todos os problemas mencionados nas medições em DC [36, 38].

O sistema de medição AC tem de ter no mínimo dois elétrodos, um elétrodo é responsável pela excitação, através de uma tensão AC, e o outro elétrodo é o de gravação, utilizado para medir as alterações de corrente. Com esta configuração é possível obter sinais unipolares (Figura 6 a)) [21]. Já numa configuração em que existe dois elétrodos de gravação e um elétrodo de excitação, ou seja três elétrodos, é possível obter sinais bipolares (Figura 6 b)) [21].

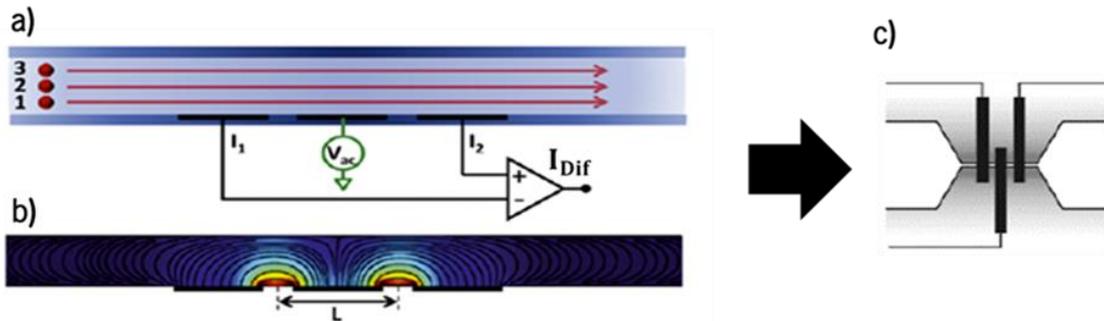


**Figura 6.** Abordagens típicas de medição elétricas em AC. **(a)** Medições em AC com dois elétrodos. **(b)** Medições com três elétrodos em AC (adaptado de [21]).

Os sinais bipolares são fornecidos por um amplificador diferencial que subtrai os sinais dos elétrodos. O sinal obtido é mais seguro na deteção de partículas, acontecendo menos deteções falsas, em comparação com o caso dos sinais unipolares. Se as partículas forem expostas a uma frequência AC baixa e média, a propriedade isolante da membrana celular e o comportamento resistivo, manifestam-se para frequências abaixo de 1 MHz, sendo possível obter informações sobre o tamanho e volume da célula [40]. Para frequências acima de 1 MHz, a corrente começa a penetrar na membrana da célula e a condutividade do citoplasma começa a dominar, sendo indicado para investigar a permeabilidade e espessura das membranas celulares, condutividade do citoplasma e organelos celulares, informações que normalmente não são obtidas pelo o método de deteção RPS tradicional [40, 41]. Assim sendo, a frequência deve ser cuidadosamente determinada, tendo em conta o design do chip e para que finalidade este servirá, uma vez que diferentes frequências geram diferentes informações.

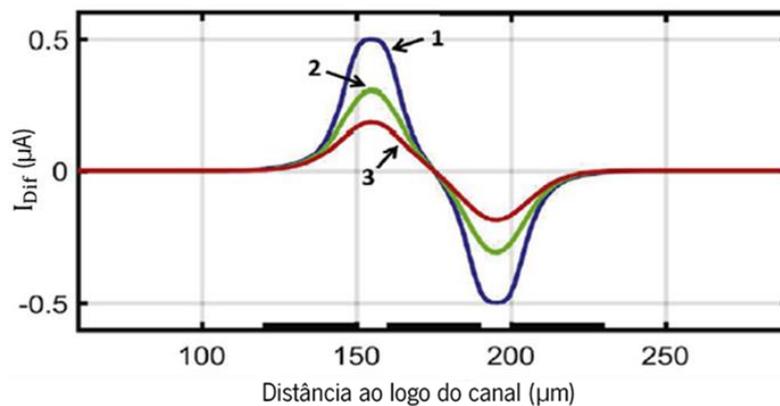
Os elétrodos utilizados nestes sistemas podem ser dispostos de várias formas no dispositivo microfluídico, nomeadamente em configurações coplanares ou paralelas em diferentes planos. As configurações de face paralela têm elétrodos na parte superior e inferior do canal, exigindo assim elétrodos em dois substratos separados e que a ligação seja alinhada [42]. Por outro lado, as configurações coplanares são atraentes, pois podem ser facilmente modelados para dimensões mais

pequenas, produzindo dispositivos miniaturizados e de baixo custo, para além de serem mais simples de fabricar [42]. O número de elétrodos e o tipo de tensão (AC/DC) que deve ser aplicada, também são parâmetros a considerar. Deste modo, a combinação de três elétrodos coplanares e a aplicação de uma tensão AC no elétrodo central com medição nos elétrodos laterais (Figura 7), apresenta-se como o sistema de medição mais robusto [36–38]. Dessa robustez faz parte a facilidade em discriminar os pulsos que representam a passagem de células e facilidade do fabrico dos elétrodos, sendo capaz de fornecer uma boa resposta.



**Figura 7.** (a) Detecção típica por RPS numa plataforma microfluídica. (b) Distribuição das linhas do campo elétrico. (c) Esquemático de três elétrodos (adaptado de [21]).

A passagem de uma partícula é registada por um par de picos opostos. A corrente diferencial ( $I_{Dif}$ ) atinge a sua variação máxima quando a partícula está aproximadamente a meio entre o elétrodo da esquerda e o elétrodo central (Figura 7 b), Figura 8), onde o campo elétrico é superior [42].



**Figura 8.** Sinais gerados por uma partícula que passa pela zona de detecção do dispositivo em três alturas diferentes: próximo aos elétrodos (curva 1), pelo meio do canal (curva 2) e próximo do topo do canal (curva 3) (adaptado de [42]).

A amplitude do sinal é uma medida influenciada pelo volume da partícula, no entanto, a intensidade do campo elétrico diminui com a distância das partículas aos elétrodos (Figura 8). Assim, partículas idênticas ao deslocarem-se próximas aos elétrodos (curva 1), no meio do canal (curva 2) ou

próximo do topo do canal (curva 3), produzem picos de amplitude mais altos, médios ou baixos, respetivamente (Figura 8) [42]. Para ajustar os sinais diferenciais foi utilizado um modelo gaussiano bipolar ( $s(t)$ ) (Figura 9), que permite extrair as amplitudes dos pulsos, obtendo o modelo:

$$s(t) = a[e^{g^+(t)} - e^{g^-(t)}], \quad (1)$$

Com,

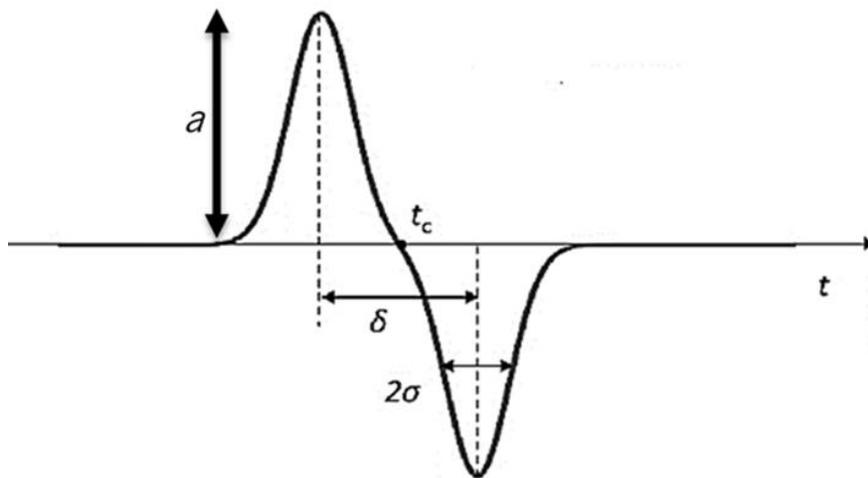
$$g_{\pm}(t) = \frac{-(t - (t_c \pm (\delta/2)))^2}{2\sigma^2} \quad (2)$$

Este modelo depende de alguns parâmetros: pulsos gaussianos,  $g(t)$ ; tempo central,  $t_c$ ; tempo de transição,  $\delta$ ; largura do pulso,  $\sigma$ ; e a amplitude do pico,  $a$  (Figura 9).

A raiz cúbica do valor de amplitude do pico, dá uma estimativa do diâmetro da partícula (D):

$$D = G^3 \sqrt{a} \quad (3)$$

onde  $G$  é o fator de ganho que depende da geometria do *chip*, da condutividade do *buffer* e da impedância dos elétrodos, no caso da figura 7 a) e figura 7 b) o  $G = 10.5 \mu\text{m}/\mu\text{A}^{1/3}$ . No entanto, a estimativa  $D$  (referida como “diâmetro elétrico”) sofre uma questão de dependência posicional, tornam-se maior para a curva 1 do que para as curvas 2 e 3 (Figura 7 a) e Figura 8) [42, 43].



**Figura 9.** Modelo Gaussiano Bipolar usado para ajustar os sinais diferenciais (adaptado de [42]).

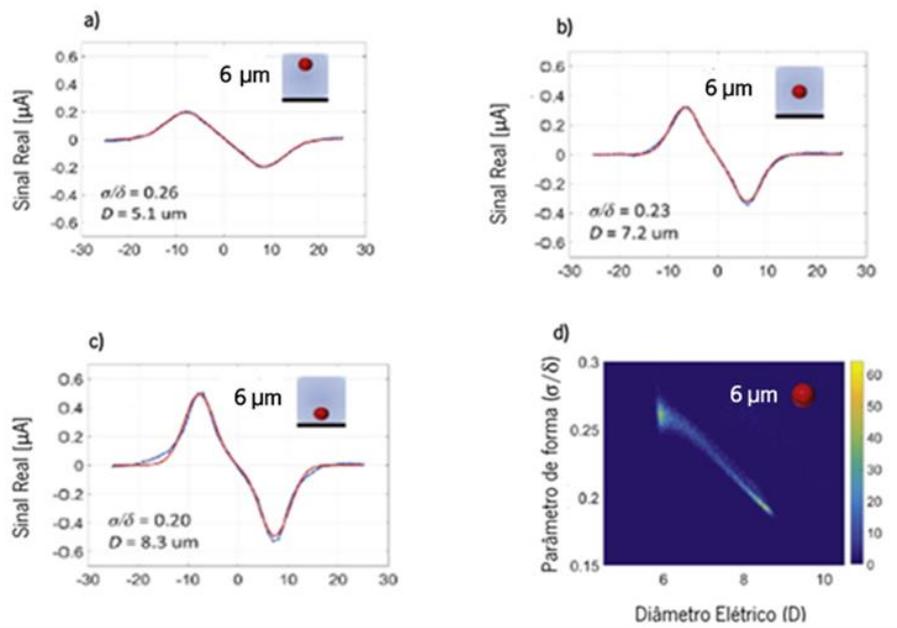
O tempo de transição  $\delta$ , pode ser usado para estimar a velocidade da partícula, ou também conhecida por “velocidade elétrica” [43]:

$$v = \frac{L}{\delta}, \quad (4)$$

onde L é a distância pico a pico dos sinais diferenciais (Figura 8), compreendendo o espaçamento de um elétrodo ao outro elétrodo (Figura 7 b)). As velocidades das partículas refletem a posição da partícula no canal, ou seja, uma partícula que viaja próxima aos elétrodos, vai-se mover muito mais lentamente do que uma partícula que viaje no centro. Isto acontece, porque a partícula ao viajar próxima dos elétrodos está mais sujeita à existência de atrito entre a partícula e a parede do canal onde se encontram os elétrodos, levando a uma diminuição da velocidade, situação que não acontece quando a partícula flui no meio do canal. As partículas que viajam próximas dos elétrodos produzem pulsos mais estreitos do que as partículas que viajam longe dos elétrodos. Isto sugere que o parâmetro de forma ( $\sigma/\delta$ ), ou seja, o controlo da largura do pulso ( $\sigma$ ) pelo tempo de transição ( $\delta$ ), pode levar à determinação exata da posição da partícula no canal [42]. O comportamento enunciado anteriormente é contrário em relação ao que acontece com o diâmetro da partícula (Figura 7 a), Figura 7 b) e Figura 8), isto porque quanto maior for a partícula menor vai ser a velocidade que ela vai ter dentro do canal, podendo ser um dos influenciadores desta [42].

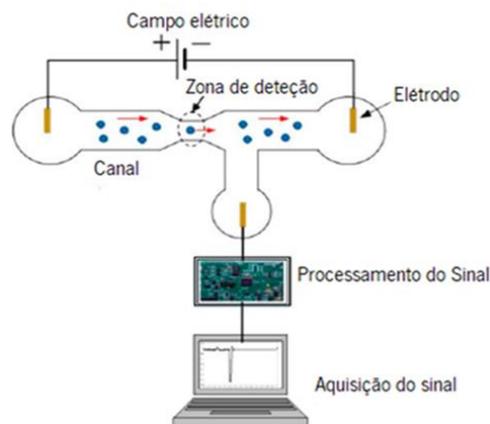
O trabalho realizado por Vito Errico *et al.* (2017) [42] permitiu demonstrar que a posição da partícula no canal pode ser determinada. Para isso, foi utilizada uma esfera de poliestireno com dimensões de 6  $\mu\text{m}$  suspensa numa solução salina. A esfera foi passando pela zona de deteção, para que fosse detetado o seu comportamento, tal como se encontra representado na figura 10 nas três posições do canal [no topo do canal (figura 10 a)), no meio do canal (figura 10 b)) e próximo dos elétrodos (figura 10 c))] [42].

Os eventos a), b) e c) representados na figura 10 para a esfera de 6  $\mu\text{m}$ , apresentam um diâmetro elétrico de 5,1, 7,2 e 8,3  $\mu\text{m}$  respetivamente, e o parâmetro de forma ( $\sigma/\delta$ ) é de 0,26, 0,23 e 0,20 respetivamente. Assim sendo, a posição da partícula no canal pode influenciar negativamente a determinação exata do tamanho da partícula. No gráfico da figura 10 d) é possível confirmar que a correta determinação das dimensões da partícula (para um diâmetro elétrico de 6  $\mu\text{m}$ ), implica que estas apresentem um parâmetro de forma entre os 0,25 e os 0,27, situação que é verificada quando a partícula passa mais próxima do topo do canal [evento a) com um parâmetro de forma de 0.26]. Quando a partícula passa na zona intermédia do canal ou na zona mais próxima aos elétrodos, apresenta um diâmetro elétrico de 7,2 e 8,3  $\mu\text{m}$  e o seu parâmetro de forma já deve ser 0,23 ou 0,2, respetivamente. A aplicação desta metodologia permite compensar os erros provenientes da distância da partícula aos elétrodos.



**Figura 10.** (a), (b) e (c) Comportamento da esfera de  $6 \mu\text{m}$  nas três posições do canal. (d) Comparação do diâmetro elétrico e do parâmetro de forma para a esfera de  $6 \mu\text{m}$  (adaptado de [42]).

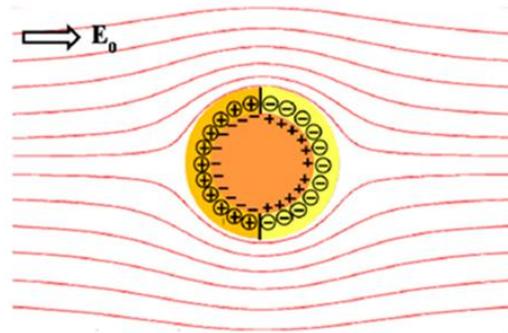
Um outro trabalho descrito por Yongxin Song *et al.* (2017) [36], mostra a influência da condutividade do meio na resposta do sensor, onde constatou que na presença de soluções iônicas com elevada condutividade são obtidos pulsos de amplitude maior quando comparado com soluções iônicas de baixa condutividade (figura 11) [36].



**Figura 11.** Exemplo de um sistema microfluídico com RPS (adaptado de [36]).

Para além disso, este estudo demonstrou que o comprimento e largura das partículas também influenciam o campo elétrico onde a partícula passa, originando pulsos resistivos maiores ou menores, dependendo da capacidade que a partícula tem para interromper o campo elétrico circundante [36]. A interferência que existe entre a partícula e o eletrólito vai influenciar a magnitude e a duração do sinal de

RPS detetado. Na figura 12 é evidenciada a interferência da partícula no campo elétrico a que esta é submetida [36].



**Figura 12.** Interferência da partícula no campo elétrico (adaptado de [36]).

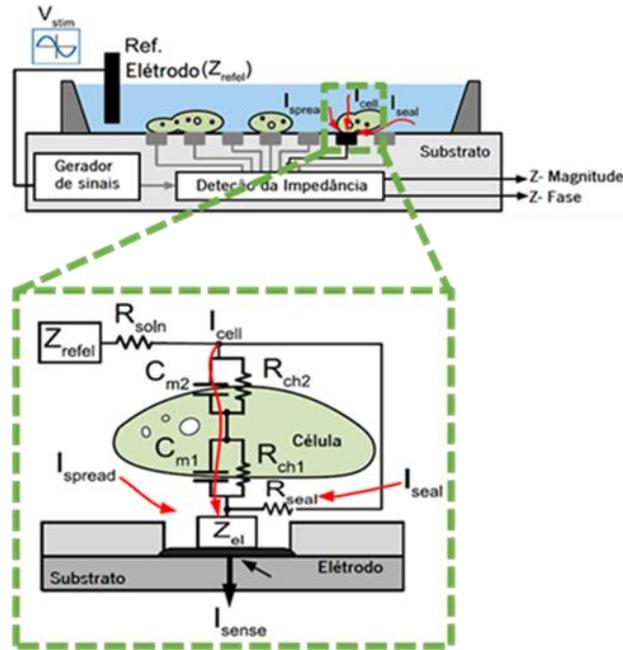
Com as informações apresentadas anteriormente, pode-se afirmar que a posição das partículas no canal, a sua geometria e a condutividade do meio são parâmetros a considerar para que a técnica RPS seja capaz de dar informações sobre o número de partículas ou células bem como do seu tamanho de uma forma precisa e confiável. Das técnicas descritas anteriormente, o RPS têm sido o mais utilizada em citômetros de fluxo microfluídicos devido a sua simplicidade de implementação e integração, custo reduzido, pequenas dimensões e não necessita de pessoas altamente qualificadas para o seu manuseamento. Assim sendo, devido às vantagens apresentadas anteriormente, nesta dissertação será integrado o método de detecção elétrico por RPS, levando a criação de um dispositivo RPS de excitação AC.

### 2.3.3.3 Espectroscopia de impedância elétrica

Recentemente, a técnica RPS têm sido implementada com a aplicação de tensão AC nos elétrodos, sendo normalmente designada de EIS (Espectroscopia de Impedância Elétrica).

Os princípios por detrás desta técnica são muito semelhantes ao RPS, distinguindo-se apenas na aplicação de tensões de excitação AC em múltiplas frequências para ser possível realizar a monitorização simultânea da impedância numa medição de alta resolução e de alta qualidade de sinal [41, 44, 45]. Esta técnica, apesar de ser mais complexa, é mais segura para efetuar as medições das propriedades das células, visto que a probabilidade de ocorrência de erros nas medições é mais baixa. Futuramente pretende-se combinar esta técnica com o dispositivo que será desenvolvido.

Na figura 13 está representada a forma como são realizadas as medições das propriedades eletrofisiológicas das células, quando estas passam pela zona de deteção.



**Figura 13.** Representação esquemática das propriedades elétricas envolvidas na medição por EIS (adaptado de [48]).

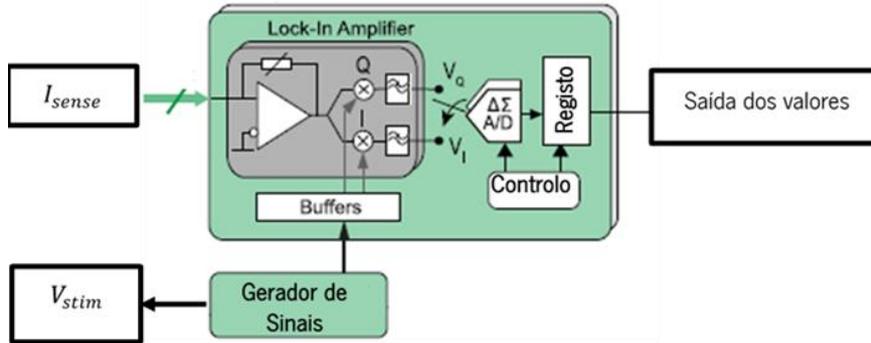
Tal como na técnica RPS, para efetuar a EIS, é necessário aplicar várias frequências de excitação AC a um par de eletrodos, o que faz com que a corrente flua entre eles. A mudança de corrente provocada pela passagem da célula ou partícula entre os eletrodos é medida e analisada para determinar as propriedades das células. As frequências que devem ser aplicadas são na gama dos kHz a MHz [46, 47].

Na figura 13,  $Z_{el}$ ,  $Z_{refel}$ , e  $Z_{soln}$  representam respetivamente, a impedância que existe entre o eletrodo e o eletrólito, a impedância do eletrodo de referência e a resistividade do eletrólito [48–50]. A impedância pode ser obtida através da razão entre a tensão aplicada aos eletrodos para estimulação,  $V_{stim}$ , e a corrente de deteção que flui através do eletrodo,  $I_{sense}$ , segundo a equação 5:

$$|Z| = \frac{|V_{stim}|}{|I_{sense}|} \quad (5)$$

A corrente de deteção,  $I_{sense}$ , é influenciada por três correntes diferentes,  $I_{cell}$ ,  $I_{seal}$  e  $I_{spread}$  (figura 13). A corrente  $I_{cell}$ , é a que passa através da célula até ao eletrodo. A impedância deste caminho pode ser modelada através da utilização de um paralelo entre um condensador e uma resistência de carga, localizada entre a superfície da membrana da célula ( $C_{m1}$  e  $R_{ch1}$ ) em série com outra combinação paralela ( $C_{m2}$  e  $R_{ch2}$ ), que faz a ligação para o resto da membrana celular que está em contacto com solução. A corrente  $I_{seal}$ , é a corrente que passa entre o espaço livre entre a célula e o eletrodo. Quando

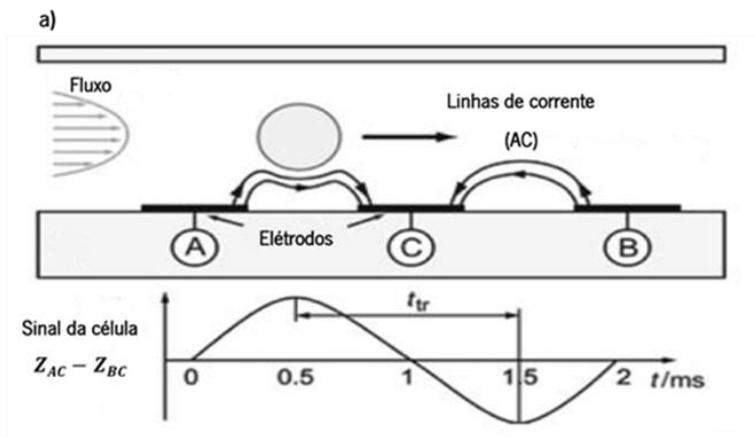
a célula se encontra sobre a superfície do elétrodo esta corrente diminui, e todas as correntes de deteção passam pela célula. Por fim, a corrente  $I_{spread}$ , é a corrente que se espalha através do eletrólito a partir do elétrodo de referência até á área do elétrodo de medição que não é coberta pela célula. Se a célula cobrir completamente o elétrodo está corrente vai tender para zero [48, 50].

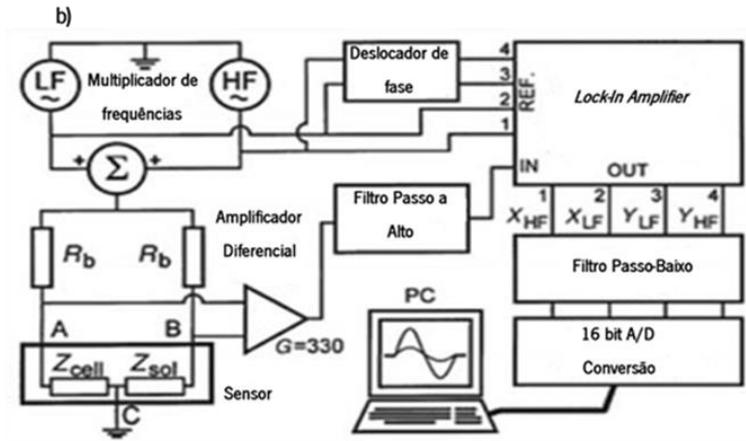


**Figura 14.** Esquemático da eletrónica implementada para leitura dos valores de impedância (adaptado de [48]).

Na figura 14 está representada a eletrónica que foi implementada para efetuar a medição dos valores da impedância em magnitude e fase. Estes são obtidas recorrendo a um *Lock-in amplifier*, dado que conseguem detetar impedâncias numa gama de frequências de 1Hz a 1 MHz, em simultâneo. O sinal de corrente,  $I_{sense}$ , obtido é convertido em tensão através de um amplificador de transimpedância e misturado, com recurso ao *Lock-in amplifier*, com sinais de referência aplicados pelo gerador de sinais. No final, o sinal é filtrado usando um filtro passa baixo para desmodular o sinal e retirar todas as componentes do sinal que tem ordem superior [47, 49].

O trabalho desenvolvido por Tao Sun *et al* (2010) [35] (figura 15) demonstrou com sucesso a aplicação da tecnologia EIS para determinar o tamanho de células dentro de canais microfluídicos [34, 35].





**Figura 15. (a)** Representação esquemática da passagem de uma partícula sobre um canal microfluídico com três eletrodos e respetivo sinal de impedância medido. **(b)** Circuito eletrônico mostrando os componentes de excitação, amplificação e desmodulação (adaptado de [35]).

A montagem experimental para medição da impedância bem como a passagem da partícula dentro do canal microfluídico estão apresentados na figura 15 [35]. A excitação é feita nos elétrodos recorrendo a aplicação de várias tensões AC e a junção de várias frequências diferentes, recorrendo a um multiplicador de frequências. Após a aplicação do estimulador é necessário a extração e amplificação dos valores de tensão recolhidos pelos elétrodos. Por fim, o sinal é desmodulado, recorrendo ao uso de um *Lock-in Amplifier*, onde vai ser feita a comparação do sinal obtido com o sinal que foi aplicado inicialmente, cruzando dois sinais para limpar as grandezas de ordem superior, terminando com a filtragem do sinal obtido para que os valores possam ser lidos e registados recorrendo a um microcontrolador. Ao contrário do estudo mostrada nas figuras 13 e 14, que medem a alteração da corrente, aqui são medidas as alterações que a tensão sofre quando as partículas atravessam os elétrodos. Essas variações são muito pequenas, justificando a utilização de um amplificador diferencial de elevado ganho [figura 15 b)] durante a amplificação.

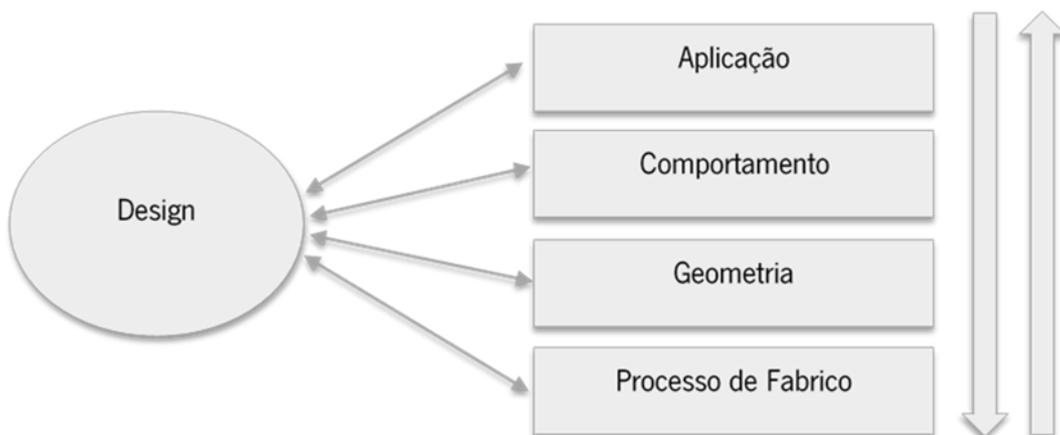
## 2.4 Conclusões

Neste capítulo foram apresentadas as principais tecnologias para contagem de células em dispositivos microfluídicos, as quais serviram de base para a realização desta dissertação. Os citómetros de fluxo microfluídico mostraram um elevado potencial para análise individual de células permitindo fornecer dispositivos baratos, portáteis e confiáveis. Por outro lado, as técnicas de medição elétrica, especialmente o RPS, permitem quantificar com elevada sensibilidade o número de células bem como analisar as suas propriedades morfológicas, nomeadamente o seu tamanho e forma. Para além disso,

esta tecnologia apresenta como vantagens quantificação livre de marcação, facilidade de miniaturização e integração em dispositivos microfluídico sem necessidade de instrumentos periféricos complexos para além dos circuitos elétricos simples. A plataforma a desenvolver será utilizada em ambientes marinhos, no qual as células estão envolvidas por uma solução salina com elevada condutividade, facilitando a aplicação da técnica RPS. Assim, o sistema a desenvolver será baseado em citômetros microfluídicos com sistema de deteção elétrico integrado baseado no princípio de RPS como uma alternativa aos sistemas óticos mais caros e mais complexos [27, 28].

### 3 SIMULAÇÕES NUMÉRICAS E FABRICO DA PLATAFORMA MICROFLUÍDICA

Neste capítulo é apresentado o processo de otimização e fabrico dos microelétrodos e do microcanal, que combinados vão dar origem à plataforma microfluídica. De forma a encontrar a melhor disposição dos elétrodos no microcanal, foram estudadas inicialmente as melhores geometrias através de simulações numéricas utilizando o *software COMSOL Multiphysics*. O processo de design é o fator crucial para o sucesso e bom funcionamento de todo o dispositivo. O processo de design pode ser facilmente simplificado e classificado através de quatro categorias fundamentais: aplicação, comportamento, geometria e processo de fabrico.



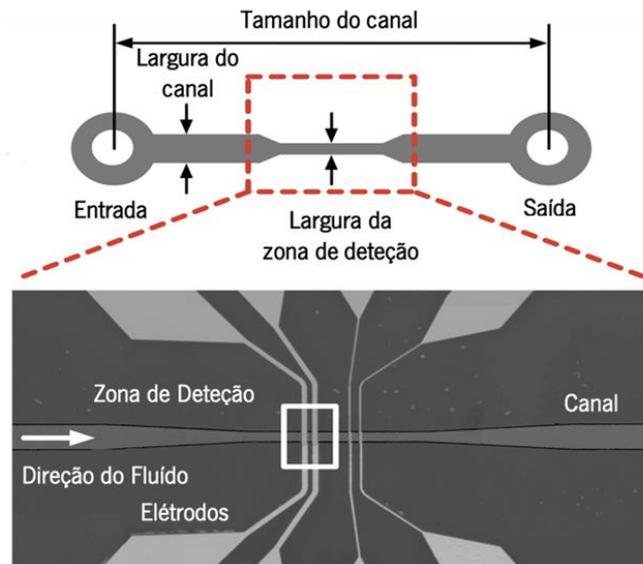
**Figura 16.** Simplificação do Processo de Design.

A aplicação refere-se ao objetivo final que se pretende obter na conclusão desta dissertação, conhecendo-se desde o início qual seria o ambiente ou em que situações o dispositivo seria utilizado. Para que seja possível obter a aplicação pretendida, é necessário estudar o comportamento físico para

saber exatamente o que pode provocar a falha e o sucesso do dispositivo, assim sendo, para melhorar o comportamento do dispositivo é necessário descobrir e estudar a geometria adequada para a plataforma microfluídica que posteriormente será fabricada através dos processos de fabrico adequados, que também vão ser descritos ao longo deste capítulo. Finalizando a análise, foram colocadas duas setas ao lado da figura 16, as quais representam a ligação de todas as categorias. A seta que vai desde aplicação ao processo de fabricação, indica que o mais prudente a fazer é estudar todo o sistema antes de realizar a fabricação, ou seja, a realização de simulações 2D do sistema vão ajudar a perceber quais as necessidades do sistema, ajudando assim na poupança e rentabilidade dos recursos. A outra seta que vai desde os processos de fabrico até aplicação, refere-se à validação/verificação de todo o sistema, com a realização de testes práticos em laboratório.

### 3.1 Constituição da plataforma microfluídica

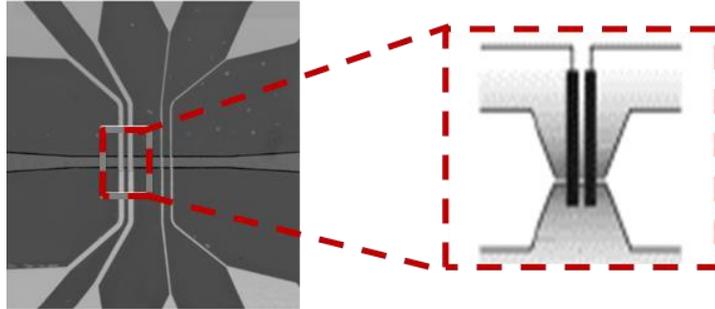
Na figura 17 está ilustrado o que se pretende implementar na plataforma microfluídica.



**Figura 17.** Ilustração esquemática da plataforma microfluídica que se pretende desenvolver.

Esta plataforma é constituída por um canal microfluídico, com dimensões apropriadas para o tamanho das células a analisar, e pelo sistema de quantificação. Relativamente ao microcanal foi necessário estudar o tamanho e a largura adequada para garantir que as partículas passam individualmente e de forma focada sobre a zona de detecção, garantindo que as partículas passam o mais próximo possível dos eléctrodos, para que sejam sempre detetadas. O fator mais importante e a ter em conta no canal é a zona de detecção, que pode ou não ser de tamanho diferente do resto do canal. A zona

de deteção é a parte do canal onde vão ser colocados os eléttodos para efetuar a deteção de partículas. Aqui o importante é garantir que os eléttodos estão a uma distância adequada para efetuar as medições necessárias após a sua deteção. Isto porque, muitas vezes a deteção é possível, mas não conseguimos efetuar medições porque a distância entre o canal e os eléttodos é tão grande que os valores acabam por sair manipulados, pois não é possível saber se aquela medição é só de uma partícula ou se resulta da passagem de várias partículas ao mesmo tempo. As medições vão incluir leitura dos valores de tensão, para ser possível obter informações sobre a partícula/célula.



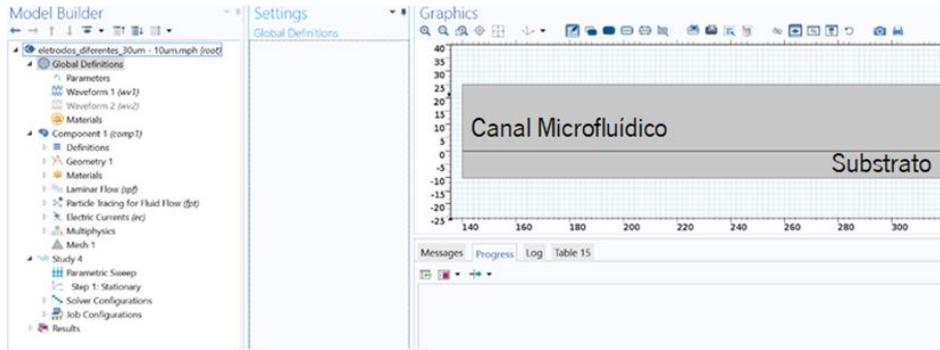
**Figura 18.** Ilustração dos eléttodos a implementar na zona de deteção do canal microfluídico.

Na figura 18 estão representados a forma como se pretende implementar os eléttodos na zona de deteção. É necessário fazer um estudo prévio de como os eléttodos devem ser implementados e qual a influência da sua largura e espaçamento na resposta elétrica obtida com a passagem das partículas. Para além disso, o número de eléttodos também serão estudados por simulação de forma a perceber qual a melhor configuração para caracterizar mais detalhadamente as propriedades das partículas.

### 3.2 Geometria e disposição dos eléttodos na plataforma microfluídica

A melhor geometria e disposição dos eléttodos na plataforma microfluídica foram avaliadas através de simulações utilizando o *software COMSOL Multiphysics*. Este *software* consiste numa ferramenta integrada, na qual a análise é baseada em métodos de elementos finitos. Integra uma interface gráfica simples, que permite a modelação e simulação de fenómenos de multifísica, em problemas estacionários ou transientes numa, duas ou três dimensões.

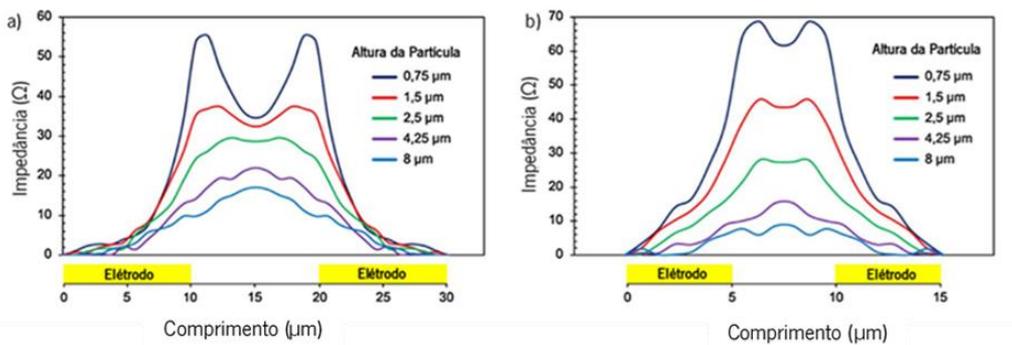
Na figura 19 está representada a interface em 2D inicial do canal microfluídico e do substrato onde são colocados os eléttodos.



**Figura 19.** Interface gráfica do *COMSOL Multiphysics*.

A principal razão para a realização das simulações, foi perceber e estudar o comportamento dos principais intervenientes no sistema, sendo estes, o fluido condutor que passa dentro do canal microfluidico, as partículas que são transportadas pelo fluido e os elétrodos. Para além disso, a simulação permitiu avaliar a resposta tendo em conta a influência de todos os intervenientes. Para facilitar a visualização das propriedades elétricas durante o percurso da partícula, foi definida a interface em vista de perfil, tal como mostra a figura 19. Desta forma, é possível visualizar o percurso da partícula ao longo do canal, a sua distância aos elétrodos, a distribuição do campo elétrico bem como as interrupções que a partícula provoca no campo elétrico.

Na figura 20 a) e b), estão representados os resultados que foram obtidos no estudo referenciado [51]. Estes resultados serviram como base de apoio aquilo que seria obtido nas simulações realizadas e descritas ao longo deste capítulo.



**Figura 20.** Mudança da Impedância com a alteração da posição da partícula no canal **(a)** para elétrodos de 10/10  $\mu\text{m}$  e **(b)** para elétrodos 5/5  $\mu\text{m}$  (adaptado de [51]).

Numa breve análise, é notável que os maiores picos de impedância são obtidos quando o campo elétrico formado entre os elétrodos, é maior. O campo elétrico é sempre maior nas extremidades internas dos elétrodos e menor no espaço livre onde não existem elétrodos. Na figura 20 a) e b) estão presentes fatores que influenciam as alterações de impedância nomeadamente: o tamanho e espaçamentos entre

os eléctrodos e ainda a posição da partícula no canal. É visível que estes fatores alteram as formas das curvas, e consequentemente alteram a forma de deteção.

A principal vantagem da utilização do *COMSOL Multiphysics* é justificada pela facilidade de implementação de vários fenómenos, conseguindo sempre aproximar o modelo daquilo que se pretende desenvolver. A simulação realizada iniciou-se com a seleção da melhor geometria dos microeléctrodos e do canal bem como pela definição dos materiais para cada parte da estrutura. Os materiais definidos na simulação foram: polidimetilsiloxano (PDMS) para o canal microfluidico, vidro para o substrato e filme fino de crómio/ouro (Cr/Au) para os eléctrodos, dado que são os materiais utilizados na microfabricação do dispositivo. Para além disso, foi ainda adicionado ao canal microfluidico água salgada, fazendo-se assim uma aproximação daquilo que se pretende ter na prática, visto que as partículas/espécies vão estar em ambiente marinho. Para isso, foi definido no *COMSOL Multiphysics* a condutividade elétrica do fluido de 5,3 S/m [52], correspondendo a condutividade típica da água do mar para uma concentração de sal de aproximadamente 35g/L [53]. A condutividade elétrica pode sofrer alterações devido ao número de iões dissolvidos e com a mobilidade destes bem como com variações de temperatura. Apesar disso, considerou-se que a concentração de sal se mantém constante e que não existe variações de temperaturas relevantes. Também foi alterada a permeabilidade relativa para 80% [51], tornando a solução altamente condutora. Na simulação foram ainda incluídos os microeléctrodos de ouro com espessura de 120 nm e as partículas de poliestireno com raios de 6 e 9  $\mu\text{m}$ , para assim ser possível o estudo do comportamento global do sistema. As simulações foram realizadas com dois, três e quatro eléctrodos. Para efetuar estas simulações tiveram de ser definidas físicas que nos ajudassem a registar os resultados. Os módulos de física simulados foram o *Laminar Flow*, que basicamente define os limites por onde vai circular o fluido a uma velocidade constante de 10  $\mu\text{m/s}$ , e a *Electric Currents* que é utilizada para definir todo o potencial eléctrico que existia ao longo da estrutura.

De forma a minimizar os problemas inerentes à corrente contínua (polarização dos eléctrodos, acumulação de iões, formação de capacidade entre os eléctrodos e o meio que podem levar à rutura dos eléctrodos), foi aplicada uma tensão AC. Para além disso, a frequência bem como o valor de tensão elétrica aplicada são dois fatores muito importantes no funcionamento do dispositivo. Normalmente para soluções com baixa condutividade utilizam-se baixas frequências, entre os 100 Hz e os 10 kHz, e para altas condutividades utilizam-se frequências mais elevadas, entre 1 kHz e 1MHz. Desta forma, na definição da física dos eléctrodos foi atribuída uma onda sinusoidal de tensão AC de 1,5V a uma frequência de 80 kHz. Em relação às partículas, o *COMSOL Multiphysics* disponibiliza na definição das físicas, a possibilidade de colocar partículas a passar no fluido. Essa física foi aplicada, mas os resultados obtidos

não foram os melhores. A solução encontrada para este problema foi o desenho da própria partícula, definindo-se a sua geometria (esfera), com uma membrana isolante de condutividade elétrica de  $2 \mu\text{S}/\text{m}$  com uma permeabilidade relativa de 5 % e um interior com uma condutividade elétrica de  $0,0015 \mu\text{S}/\text{m}$  e permeabilidade relativa de 2,55 %, de forma a fazer-se uma aproximação às partículas utilizadas na prática [51].

### 3.3 Simulações numéricas

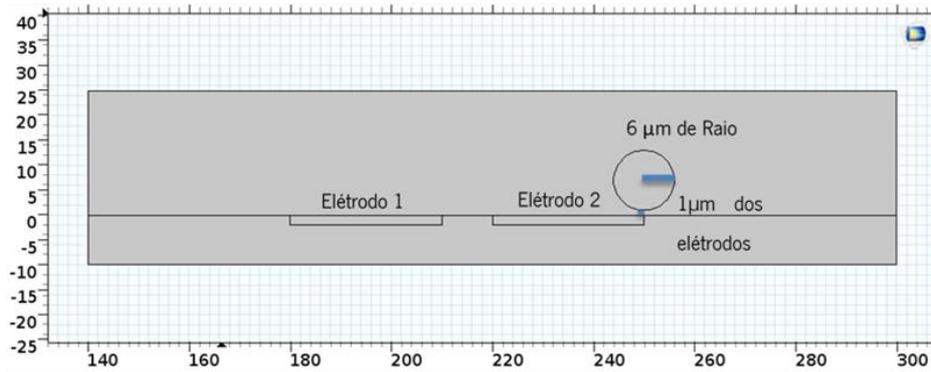
De acordo com o que foi mencionado anteriormente, foram realizadas simulações para estudar os fatores que influenciam a interação de uma partícula com os elétrodos nomeadamente, o espaçamento entre os elétrodos bem como a sua largura, tamanho e posição da partícula no canal. O espaçamento escolhido para colocar entre os elétrodos foi de 10 e 20  $\mu\text{m}$ , a largura foi de 20 e 30  $\mu\text{m}$ , o tamanho da partícula variou entre 6 e 9  $\mu\text{m}$  de raio (tamanho aproximado à maioria das células de algas) e a posição da partícula foi de 1 e 2  $\mu\text{m}$  em relação aos elétrodos. Foram realizadas várias simulações, mas apenas foram apresentadas as com melhores resultados.

#### 3.3.1 Simulação com dois elétrodos

Na tabela 2 estão representados os parâmetros que foram estudados por simulação para a configuração com dois elétrodos. As que apresentaram o melhor desempenho encontram-se destacadas a vermelho.

**Tabela 2.** Parâmetros utilizados nas simulações numéricas com dois elétrodos.

Parâmetros	Dois Elétrodos			
<b>Partícula de 6 <math>\mu\text{m}</math> de raio</b>	Dimensões dos Elétrodos (largura/espacamento)			
	30/10 $\mu\text{m}$	30/10 $\mu\text{m}$	30/20 $\mu\text{m}$	30/20 $\mu\text{m}$
	Posição da Partícula			
	1 $\mu\text{m}$	2 $\mu\text{m}$	1 $\mu\text{m}$	2 $\mu\text{m}$
<b>Partícula de 9 <math>\mu\text{m}</math> de raio</b>	Dimensões dos Elétrodos (largura/espacamento)			
	30/10 $\mu\text{m}$	30/10 $\mu\text{m}$	30/20 $\mu\text{m}$	30/20 $\mu\text{m}$
	Posição da Partícula			
	1 $\mu\text{m}$	2 $\mu\text{m}$	1 $\mu\text{m}$	2 $\mu\text{m}$

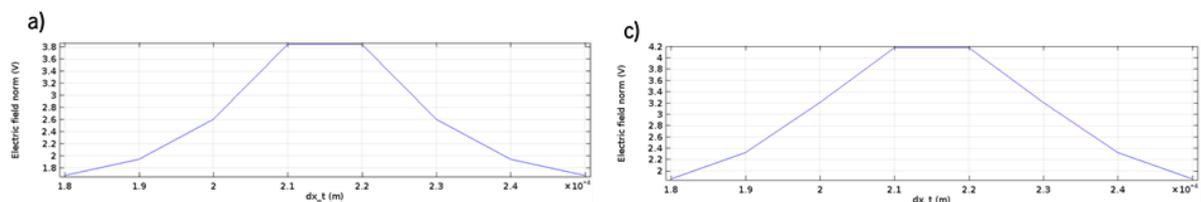


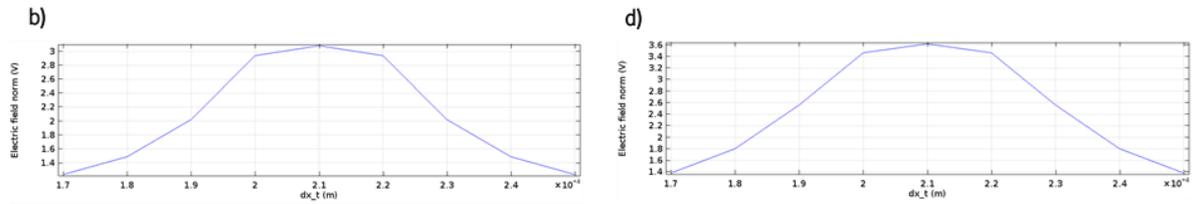
**Figura 21.** Interface gráfica com dois eléctrodos e a partícula de 6 µm de raio, posicionada a 1 µm de distância dos eléctrodos.

As simulações iniciaram-se com dois eléctrodos onde um dos eléctrodos foi alimentado com uma tensão AC de 1,5V e outro foi definido como *ground*. Na figura 21 está representada a interface gráfica com uma das configurações simuladas que inclui dois eléctrodos com 30 µm de largura e um espaçamento de 10 µm. É importante frisar que o canal microfluidico tem uma altura de 25 µm (comum em todas as simulações), a partícula tem um raio de 6 µm e está a passar no canal microfluidico a uma distância de 1 µm dos eléctrodos.

Após a definição das físicas necessárias, que neste caso foi colocar o fluido a passar no canal microfluidico com a velocidade constante (10 µm/s) (*Laminar Flow*) e colocar potencial nos eléctrodos (*Electric Currents*), foram feitos estudos estacionários onde se interligaram as físicas, de forma conseguir-se estudar o comportamento de toda a plataforma microfluidica, depois de lhe serem atribuídas condições semelhantes as que irão ocorrer num ambiente real. O *COMSOL Multiphysics* disponibiliza ferramentas poderosas de visualização e pós-processamento apresentando os resultados de uma forma interativa, ou seja, é possível visualizar praticamente qualquer variável de interesse relacionada com os resultados da simulação. Estes recursos de visualização incluem, por exemplo, a geração de gráficos que se torna muito interessante para o caso, visto que o que se pretende visualizar são as variações de tensão, corrente e impedância, que acontecem quando a partícula atravessa o líquido condutor e passa sobre os eléctrodos.

Na figura 22 estão representados os gráficos da tensão obtidos pela simulação quando a partícula que flui no canal microfluidico passa pelos dois eléctrodos.

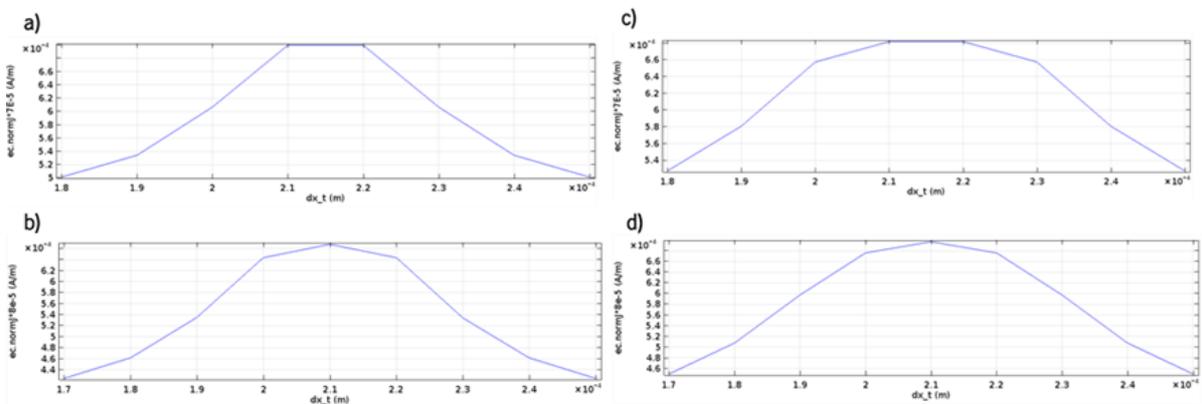




**Figura 22.** Resultados da simulação da tensão gerada com dois elétrodos de: **(a)** 30/10 µm com a partícula 6 µm de raio a 1 µm dos elétrodos; **(b)** 30/20 µm com a partícula 6 µm de raio a 2 µm dos elétrodos; **(c)** 30/10 µm com a partícula de 9 µm de raio a 1 µm dos elétrodos e **(d)** 30/20 µm com a partícula de 9 µm de raio a 2 µm dos elétrodos.

No gráfico da figura 22 a) apenas é verificado um único pulso de tensão, devendo-se à diferença de potencial que existe entre os elétrodos, um deles com uma tensão AC de 1,5V (figura 21 - Eléctrodo 1) e o outro com *ground* (figura 21 - Eléctrodo 2). Inicialmente há um aumento da tensão, passando depois para um momento de tensão constante visto que a partícula se encontra na região do espaçamento de 10 µm entre os elétrodos, por fim a tensão começa a diminuir uma vez que a partícula se está a aproximar do eléctrodo que representa o *ground* (0 V). No gráfico da figura 22 b), esta estabilização não é tão evidente porque o espaçamento entre os elétrodos é maior (20 µm) apesar da partícula passar sobre os elétrodos a uma distância de 2 µm. Com o aumento do tamanho da partícula verifica-se um aumento dos valores de tensão, figura 22 a) e c), algo que já era esperado. Por outro lado, com o aumento do espaçamento entre os elétrodos os valores de tensão diminuem, figura 22 b) e 22 d), podendo haver aqui um indício de que o aumento do espaçamento pode prejudicar a discriminação de partículas com esta gama de tamanhos. Para além disso, analisando os gráficos de tensão é possível concluir que pulsos com uma largura de base maior são obtidos quando os elétrodos estão mais espaçados bem como partículas maiores provocam maiores amplitude na tensão.

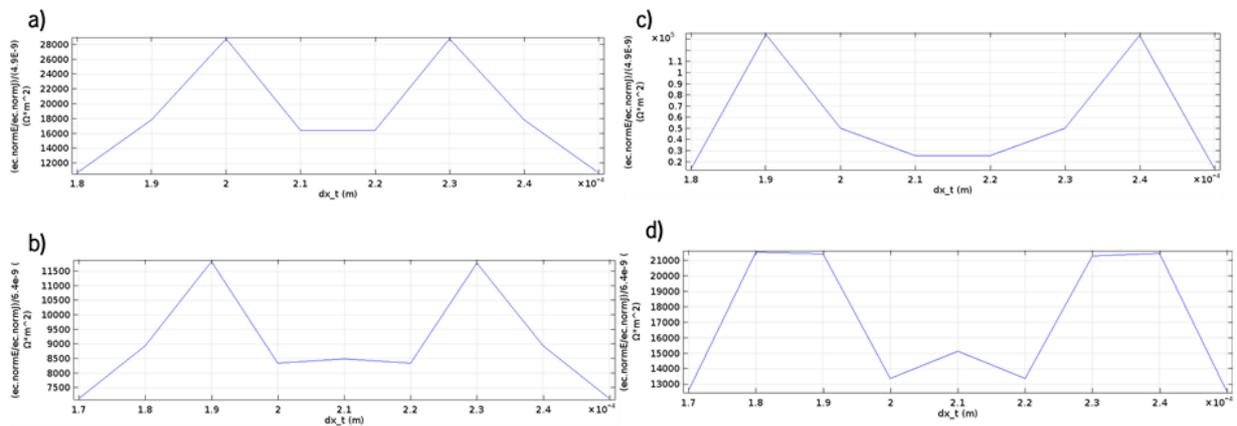
Na figura 23 estão representados os gráficos da corrente obtidos pela simulação para as mesmas condições apresentados no estudo anterior.



**Figura 23.** Resultados da simulação da densidade de corrente gerada com dois elétrodos de: **(a)** 30/10 µm com a partícula 6 µm a 1 µm dos elétrodos; **(b)** 30/20 µm com a partícula 6 µm de raio a 2 µm dos elétrodos; **(c)** 30/10 µm com a partícula de 9 µm de raio a 1 µm dos elétrodos e **(d)** 30/20 µm com a partícula de 9 µm de raio a 2 µm dos elétrodos.

Os gráficos de corrente são muito semelhantes aos que foram obtidos na tensão. Tal como nas anteriores o pico da figura 23 b) é mais largo que o da figura 23 a) influenciado pelo aumento do espaçamento entre os elérodos. Ao aumentar a dimensão da partícula (figura 23 c)), a corrente diminui em relação aos anteriores, algo normal visto que se aumentou a partícula para 9  $\mu\text{m}$  de raio. Tal como aconteceu nos gráficos da tensão, os valores de corrente no gráfico da figura 23 d) aumentaram ligeiramente, em comparação aos da figura 23 c), mas como se aumentou o espaçamento entre os elérodos, o campo elétrico aumentou, e a partícula interferiu de uma forma mais significativa no campo elétrico, por isso é que houve um ligeiro aumento, tal como já tinha acontecido nos gráficos de tensão.

Na figura 24 estão exibidos os gráficos da impedância para esta mesma simulação, sendo determinados pela razão entre a tensão e a corrente, figuras 22 e 23.



**Figura 24.** Resultados da simulação da impedância gerada com dois elérodos de: **(a)** 30/10  $\mu\text{m}$  com a partícula 6  $\mu\text{m}$  a 1  $\mu\text{m}$  dos elérodos; **(b)** 30/20  $\mu\text{m}$  com a partícula 6  $\mu\text{m}$  de raio a 2  $\mu\text{m}$  dos elérodos; **(c)** 30/10  $\mu\text{m}$  com a partícula de 9  $\mu\text{m}$  de raio a 1  $\mu\text{m}$  dos elérodos e **(d)** 30/20  $\mu\text{m}$  com a partícula de 9  $\mu\text{m}$  de raio a 2  $\mu\text{m}$  dos elérodos.

No caso da figura 24 b), acontece um comportamento muito parecido com o da figura 24 a), mas os valores de impedância diminuem ligeiramente, o que vai de encontro aos gráficos da tensão e corrente representados. Ao aumentar a dimensão da partícula a impedância aumentou, figura 24 c) e figura 24 d), devendo-se ao facto de a partícula ser maior e interferir com uma maior área do campo elétrico, em comparação com os das figuras 24 a) e 24 b).

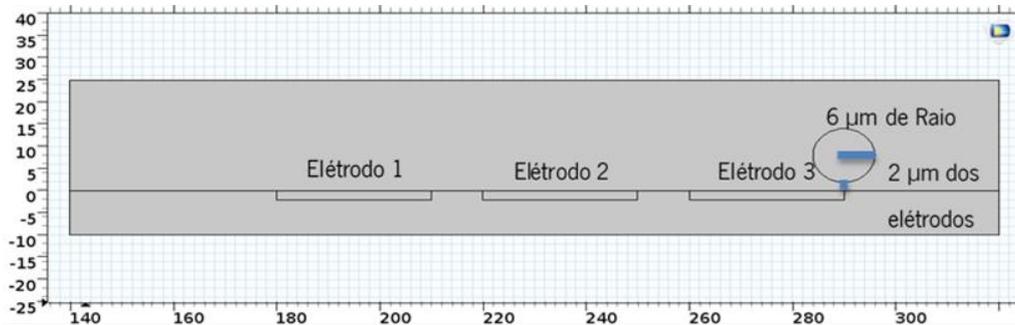
Concluiu-se assim a partir desta simulação, que ocorre um pulso de corrente e um de tensão e dois pulsos de impedância por cada par de elérodos (um por cada eléetrodo). Comparando estes resultados com aqueles que foram previamente estudados [51]), verifica-se alguma convergência (figura 20).

### 3.3.2 Simulação com três elétrodos

Numa segunda fase, foram aplicados três elétrodos para perceber se os sinais detetados tornavam a discriminação mais fácil. Tal como no subcapítulo anterior, apenas foram selecionadas as simulações que tiverem os melhores resultados, as quais estão destacadas na tabela 3.

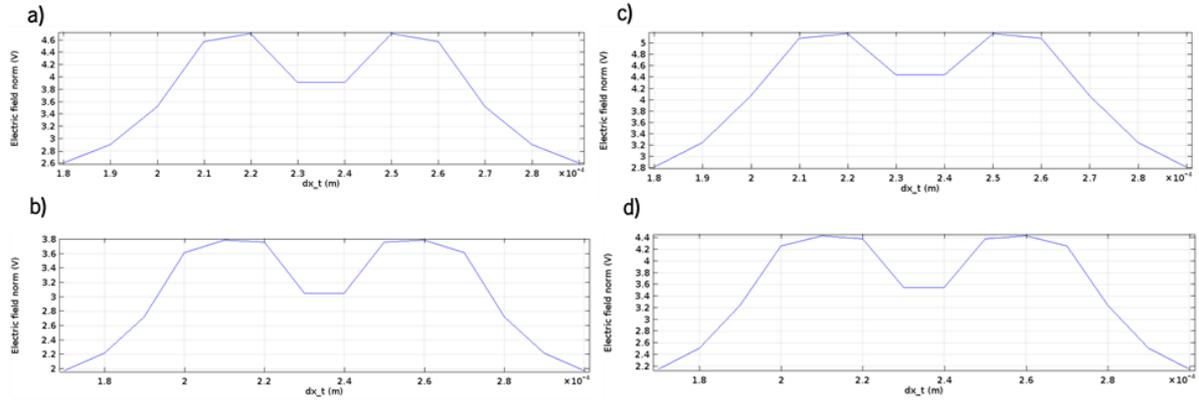
**Tabela 3.** Parâmetros utilizados nas simulações numéricas com três elétrodos.

Parâmetros	Três Elétrodos			
<b>Partícula de 6 µm de raio</b>	Dimensões dos Elétrodos (largura/espacamento)			
	30/10 µm	30/10 µm	30/20 µm	30/20 µm
	Posição da Partícula			
	1 µm	2 µm	1 µm	2 µm
<b>Partícula de 9 µm de raio</b>	Dimensões dos Elétrodos (largura/espacamento)			
	30/10 µm	30/10 µm	30/20 µm	30/20 µm
	Posição da Partícula			
	1 µm	2 µm	1 µm	2 µm

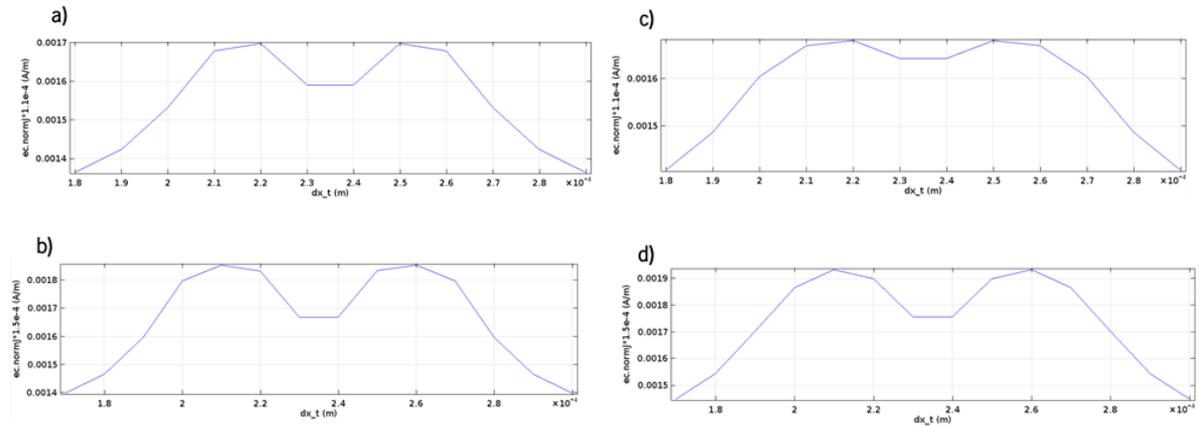


**Figura 25.** Interface gráfica com três elétrodos e a partícula de 6 µm de raio posicionada a 2 µm dos elétrodos.

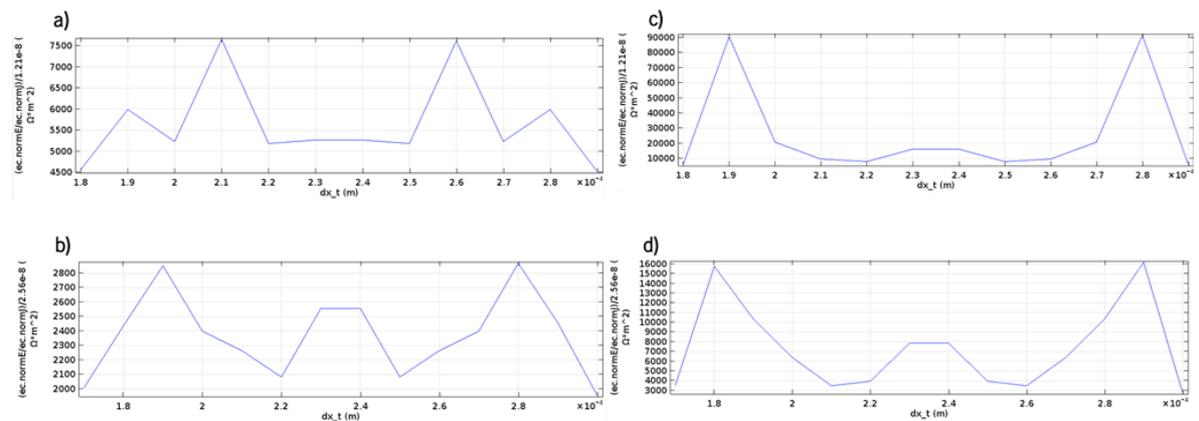
Na figura 25, está representado a interface gráfica realizada para uma das simulações com três elétrodos, onde os elétrodos têm um tamanho de 30 µm com um espaçamento entre eles de 10 µm. Nos elétrodos das extremidades foi aplicada uma tensão AC de 1,5V e o eléctrodo central foi definido como *ground*. Nas figuras seguintes estão apresentados os gráficos de tensão, corrente e impedância, respetivamente, gerados pela passagem da partícula.



**Figura 26.** Resultados da simulação da tensão gerada com três elétrodos de: **(a)** 30/10  $\mu\text{m}$  com a partícula 6  $\mu\text{m}$  de raio a 2  $\mu\text{m}$  dos elétrodos; **(b)** 30/20  $\mu\text{m}$  com a partícula 6  $\mu\text{m}$  de raio a 2  $\mu\text{m}$  dos elétrodos; **(c)** 30/10  $\mu\text{m}$  com a partícula de 9  $\mu\text{m}$  de raio a 1  $\mu\text{m}$  dos elétrodos e **(d)** 30/20  $\mu\text{m}$  com a partícula de 9  $\mu\text{m}$  de raio a 1  $\mu\text{m}$  dos elétrodos.



**Figura 27.** Resultados da simulação da densidade de corrente gerada com três elétrodos de: **(a)** 30/10  $\mu\text{m}$  com a partícula 6  $\mu\text{m}$  de raio a 2  $\mu\text{m}$  dos elétrodos; **(b)** 30/20  $\mu\text{m}$  com a partícula 6  $\mu\text{m}$  de raio a 2  $\mu\text{m}$  dos elétrodos; **(c)** 30/10  $\mu\text{m}$  com a partícula de 9  $\mu\text{m}$  de raio a 1  $\mu\text{m}$  dos elétrodos e **(d)** 30/20  $\mu\text{m}$  com a partícula de 9  $\mu\text{m}$  de raio a 1  $\mu\text{m}$  dos elétrodos.



**Figura 28.** Resultados da simulação da impedância gerada com três elétrodos de: **(a)** 30/10  $\mu\text{m}$  com a partícula 6  $\mu\text{m}$  de raio a 2  $\mu\text{m}$  dos elétrodos; **(b)** 30/20  $\mu\text{m}$  com a partícula 6  $\mu\text{m}$  de raio a 2  $\mu\text{m}$  dos elétrodos; **(c)** 30/10  $\mu\text{m}$  com a partícula de 9  $\mu\text{m}$  de raio a 1  $\mu\text{m}$  dos elétrodos e **(d)** 30/20  $\mu\text{m}$  com a partícula de 9  $\mu\text{m}$  de raio a 1  $\mu\text{m}$  dos elétrodos.

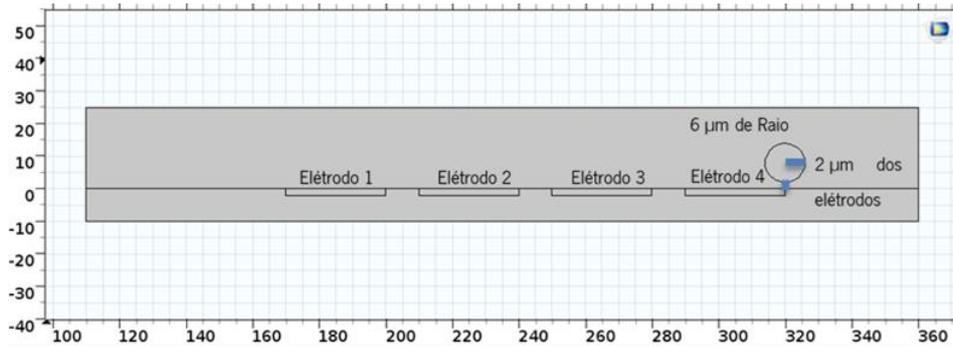
Como era de esperar nos gráficos da tensão e nos gráficos de corrente representados nas figuras 26 e 27, são obtidos 2 pulsos, ou seja, 1 pulso por cada par de elérodos (um pulso do Eléetrodo 1 para o Eléetrodo 2 e outro pulso do Eléetrodo 2 para o Eléetrodo 3 – figura 25). Na figura 28 estão representados os gráficos da impedância, no qual se verificam a ocorrência de três pulsos. Ao fazermos uma comparação dos valores de tensão e de corrente obtidos com aqueles que foram obtidos nas simulações com dois elérodos, é notável um aumento dos valores de tensão e de corrente. Apesar disso, estas simulações apresentaram um comportamento semelhante ao de dois elérodos, nomeadamente, o aumento da dimensão da partícula provoca um aumento da tensão e, diminuição da corrente e consequentemente o aumento da impedância. Para além disso, confirmou-se que o aumento do espaçamento entre os elérodos continua a prejudicar a determinação do tamanho da partícula visto que os valores de impedância tendem a diminuir.

### 3.3.3 Simulação com quatro elérodos

Por fim foram realizadas simulações com uma configuração de quatro elérodos para perceber qual era o impacto destas no sistema. Tal como nos subcapítulos anteriores, foram seleccionadas as simulações que tiverem os melhores resultados, as quais se encontram destacadas na tabela 4.

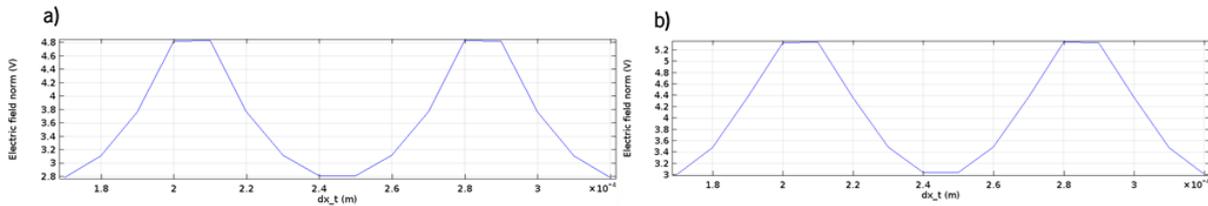
**Tabela 4.** Parâmetros utilizados nas simulações numéricas com quatro elérodos.

<b>Parâmetros</b>	<b>Quatro Elérodos</b>			
<b>Partícula de 6 µm de raio</b>	Dimensões dos Elérodos (largura/espacamento)			
	30/10 µm	30/10 µm	30/20 µm	30/20 µm
	Posição da Partícula			
	1 µm	2 µm	1 µm	2 µm
<b>Partícula de 9 µm de raio</b>	Dimensões dos Elérodos (largura/espacamento)			
	30/10 µm	30/10 µm	30/20 µm	30/20 µm
	Posição da Partícula			
	1 µm	2 µm	1 µm	2 µm

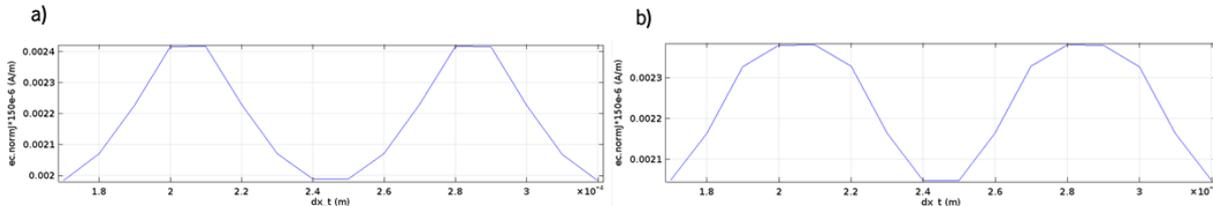


**Figura 29.** Interface gráfica com quatro eletrodos e a partícula de 6 μm de raio, posicionada a 2 μm dos eletrodos.

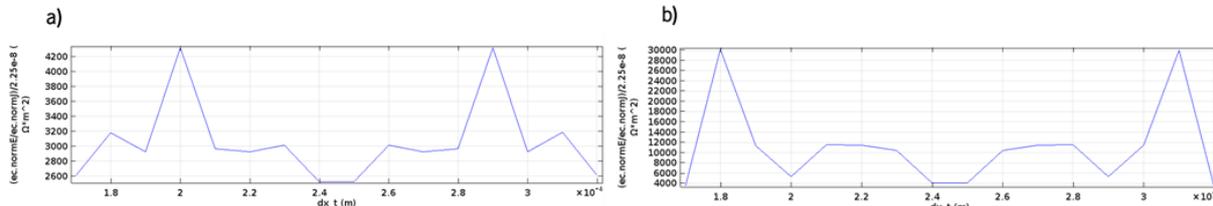
Na figura 29, está representado a interface gráfica realizada para uma das simulações com quatro eletrodos, onde os eletrodos têm um tamanho de 30 μm com um espaçamento de 10 μm. Nos dois eletrodos das extremidades (1 e 4) foi aplicada uma tensão AC de 1,5V e nos eletrodos centrais (2 e 3) foram definidos como *ground*. Os resultados desta simulação estão apresentados nas figuras 30, 31 e 32.



**Figura 30.** Resultados da simulação da tensão gerada com quatro eletrodos de: **(a)** 30/10 μm com a partícula 6 μm de raio a 2 μm dos eletrodos; **(b)** 30/20 μm com a partícula 9 μm de raio a 1 μm dos eletrodos.



**Figura 31.** Resultados da simulação da densidade de corrente gerada com quatro eletrodos de: **(a)** 30/10 μm com a partícula 6 μm de raio a 2 μm dos eletrodos; **(b)** 30/20 μm com a partícula 9 μm de raio a 1 μm dos eletrodos.



**Figura 32.** Resultados da simulação da impedância gerada com quatro eletrodos de: **(a)** 30/10 μm com a partícula 6 μm de raio a 2 μm dos eletrodos; **(b)** 30/20 μm com a partícula 9 μm de raio a 1 μm dos eletrodos.

Ao comparar os gráficos de tensão e corrente obtidos com três eletrodos com o que foi obtido nesta simulação da figura 30 e 31 percebemos que existem 2 pulsos, mas existe um afundamento dos valores muito superior quando a partícula se encontra a passar pelos dois eletrodos (Eléttrodo 2 e Eléttrodo

3) carregados com *ground*. Apesar disso, as simulações voltaram a apresentar um aumento dos valores de tensão e de corrente, em relação as outras simulações, isto porque foi acrescentado mais um eletrodo, o que alargou o campo elétrico gerado, levando ao aumento dos valores.

As curvas de tensão, corrente e da impedância estavam de acordo com o previsto, confirmando-se um aumento da tensão, uma diminuição da corrente e um aumento do valor de impedância com o aumento do tamanho da partícula. Para além disso, foi ainda verificado que espaçamento entre os eletrodos apresentam uma influência considerável na impedância, evidenciando apenas dois pulsos dado que o centro apresenta um potencial próximo do *ground*.

### 3.4 Conclusões das simulações

Nas seções anteriores foram estudadas por simulação diversas geometrias dos microelectrodos para perceber qual a configuração que fornecia os melhores resultados. Os principais parâmetros estudados incluíram o tamanho dos microelectrodos e o seu espaçamento bem como o raio da partícula e a altura a que esta passa sobre os eletrodos. O estudo do espaçamento permitiu evidenciar que quanto maior o espaçamento, mais elevado seria o campo elétrico formado, o que permitia abranger uma maior área dentro do microcanal. Quando a partícula passa sobre os eletrodos mais espaçados, os valores de tensão foram mais baixos e os valores de corrente mais elevados, uma vez que a partícula interrompe durante mais tempo o campo elétrico e conseqüentemente a impedância diminui ligeiramente.

Neste capítulo estudou-se também a influência do tamanho da partícula, utilizando partículas com raio de 6 e 9  $\mu\text{m}$  e foi possível concluir que os valores de impedância aumentam com o aumento do tamanho da partícula, confirmando assim a possibilidade de utilizar esta tecnologia para discriminar partículas de diferentes tamanhos. Os valores de impedância só não aumentaram quando era aumentado o espaçamento entre os eletrodos, concluindo-se que o espaçamento entre os eletrodos deve ser mínimo, para garantir um bom dimensionamento das partículas.

Os resultados das simulações também permitiram confirmar que as partículas devem passar o mais próximo dos eletrodos de forma a perturbar o campo elétrico de uma forma mais perceptível e não induzir erros na indicação do tamanho. A nível prático, será muito importante garantir que a altura dos microcanais deverá ser compatível com o tamanho das partículas a detetar. Abordagens alternativas de focagem de partículas poderão ser utilizadas apesar de aumentarem a complexidade do sistema. Soluções de focagem acústica poderão ser integradas nas plataformas microfluidicas para garantir esta funcionalidade [54].

A partir das simulações realizadas, foi possível indicar que as configurações com melhor desempenho foram as de três e quatro elétrodos. Em termos de amplitude, os pulsos verificados nas duas configurações são semelhantes, no entanto, a distinção de dois pulsos de tensão é mais evidente na configuração de quatro elétrodos uma vez que apresenta dois elétrodos *ground*. A utilização de apenas um eletrodo *ground* na configuração com três elétrodos origina dois pulsos com uma região central sobreposta e de difícil distinção. Para o fabrico da plataforma microfluídica avançou-se com a configuração de quatro elétrodos porque permitia realizar testes com todas as configurações e perceber qual a que teria melhor desempenho na prática.

No capítulo anexos, Anexos II estão apresentados os campos elétricos formados pela passagem das partículas com as condições simuladas neste capítulo. Para além disso, também inclui no Anexo III, um estudo de simulação para comparar a resposta dos elétrodos utilizando três tamanhos diferentes de partículas, onde comprovam mais uma vez que a impedância aumenta com o tamanho das partículas e diminui com o aumento do espaçamento entre os elétrodos.

## 3.5 Fabrico da plataforma microfluídica

A plataforma microfluídica foi fabricada a partir de tecnologias de microfabricação, a qual surgiu no final dos anos 90 devido à necessidade de estruturas pequenas que, juntamente com a microeletrónica produzissem dispositivos para várias aplicações, como é o caso dos microssensores [14, 55, 56]. A plataforma microfluídica desenvolvida nesta dissertação foi obtida a partir de dois processos distintos. Inicialmente foram fabricados microelétrodos de ouro depositados sobre substratos de vidro e padronizados por técnicas fotolitográficas e de corrosão química. A segunda etapa consistiu no fabrico do canal microfluídico a partir de técnicas de litografia suave utilizando moldes em SU-8 obtidos por fotolitografia UV. A plataforma final foi obtida através do fecho das duas partes utilizando um plasma de oxigénio. De seguida serão apresentadas de forma detalhada todas as etapas do processo de fabrico.

### 3.5.1 Fabrico dos microelétrodos

#### 3.5.1.1 Deposição do filme fino de ouro

O fabrico dos microelétrodos inicia-se com a deposição de filmes finos de ouro (Au) recorrendo à técnica de deposição física de vapor (PVD do inglês *physical vapor deposition*) por *sputtering*. Esta técnica consiste no bombardeamento de um material sólido (alvo) por átomos ou iões inertes com

elevada energia que ao embaterem na superfície levam a remoção de alguns átomos superficiais do alvo que são ejetados em todas as direções, depositando-se em todos os obstáculos que encontram, nomeadamente nos substratos a revestir. Esta técnica utiliza uma atmosfera controlada, sendo realizada numa câmara de vácuo. A principal vantagem da utilização desta técnica é a obtenção de filmes finos com boa uniformidade e com baixa contaminação, permitindo também uma boa adesão do material ao substrato. Para além disso, permite uma boa reprodutibilidade. Com o intuito de melhorar a adesão do ouro ao vidro, foi depositada uma camada de adesão de crómio (Cr) com 15 nm de espessura a uma taxa de 1 nm/s e uma pressão de trabalho de 0,36 Pa, seguido pela deposição de um filme de Au com 120 nm de espessura a uma taxa de 2,2 nm/s utilizando uma pressão de trabalho de 0,38 Pa. A condutividade das amostras foi medida através do método de *Van der Pauw* utilizando quatro contactos elétricos distintos nas extremidades da amostra. A condutividade média do filme de Cr/Au foi de  $2,53 \times 10^7 \Omega/m$ .

Após a obtenção do filme fino, realizou-se a padronização dos elérodos utilizando processos fotolitográficos para padronização da resina fotossensível utilizada para proteger as zonas de interesse (padrão desejado) durante o processo de corrosão química em solução aquosa.

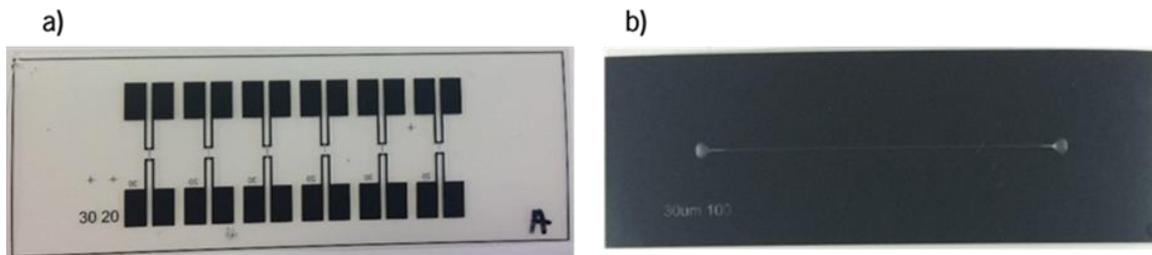
#### 3.5.1.2 Padronização dos microeléctrodos

O processo de fotolitografia inicia-se com o fabrico e a criação de uma fotomáscara que contém o padrão que se pretende transferir, previamente desenhado a partir de um software CAD. Estas máscaras podem ser obtidas através da gravação a laser, dando origem a mascaras metálicas ou através da impressão em fotolito. O fotolito apresenta um processo de fabrico muito mais simples e muito mais barato. Este tipo de processo de fabricação de fotolitos utiliza uma máquina tipográfica de imagem que, através de um laser, grava a imagem que se pretende numa película fotográfica com regiões transparentes e a preto. As zonas que foram mantidas a preto atingem uma densidade suficiente para evitar a penetração da luz UV durante o processo de fabrico dos elérodos e do canal microfluídico [55, 57, 58].

Após a obtenção da fotomáscara, é realizada a deposição por *spin coating* de uma resina fotossensível sobre um substrato. Este processo consiste na colocação da resina fotossensível sobre o substrato, que em seguida vai ser sujeito a uma rotação a elevada velocidade, que vai retirar a camada em excesso devido a força centrífuga, ficando apenas uma camada fina. A espessura que a resina fotossensível vai adquirir depende da velocidade e tempo de rotação que é utilizada. Seguidamente

coloca-se o substrato numa *hot plate* para evaporar o solvente e solidificar a resina fotossensível. Finalmente, o substrato é exposto a luz UV (reticulação fotoquímica) utilizando a fotomáscara, permitindo transferir o padrão para a resina fotossensível (figura 33) [55, 57, 58].

Em relação as resinas fotossensíveis, podem ser positivas ou negativas. Quando se utiliza uma resina fotossensível positiva (por exemplo a AZ 4562 que vai ser utilizada no fabrico dos eléctodos), as zonas transparentes da máscara vão ser expostas, fazendo com se dissolvam na solução de relevação. Por outro lado, quando se usa uma resina fotossensível negativa (por exemplo o SU-8 que vai ser utilizado como molde no fabrico do canal microfluidico em PDMS), a exposição UV faz com que as partes que foram expostas permaneçam durante o processo de revelação. Depois da exposição UV, o substrato será imerso numa solução de relevação para deixar o padrão pretendido [55, 57, 58].

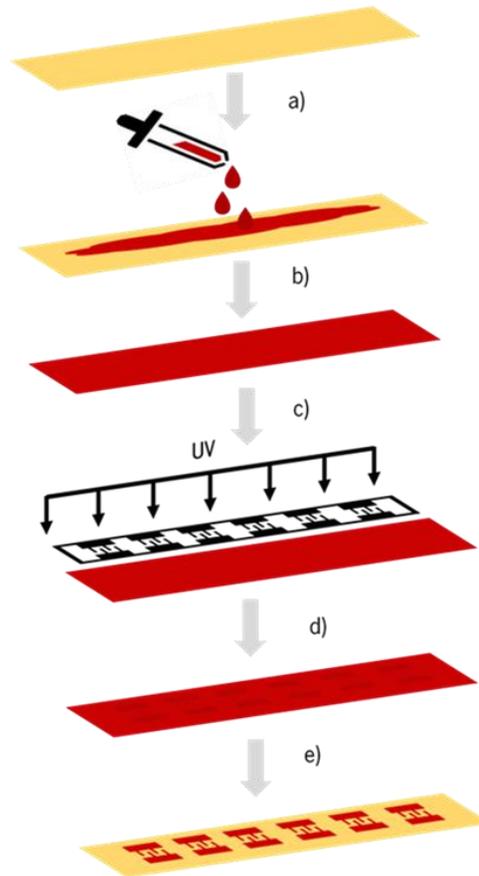


**Figura 33.** Fotomáscaras utilizadas no fabrico da plataforma microfluidica para os **(a)** Eléctodos e para o **(b)** canal microfluidico.

O processo de padronização dos microeléctodos inclui os seguintes passos:

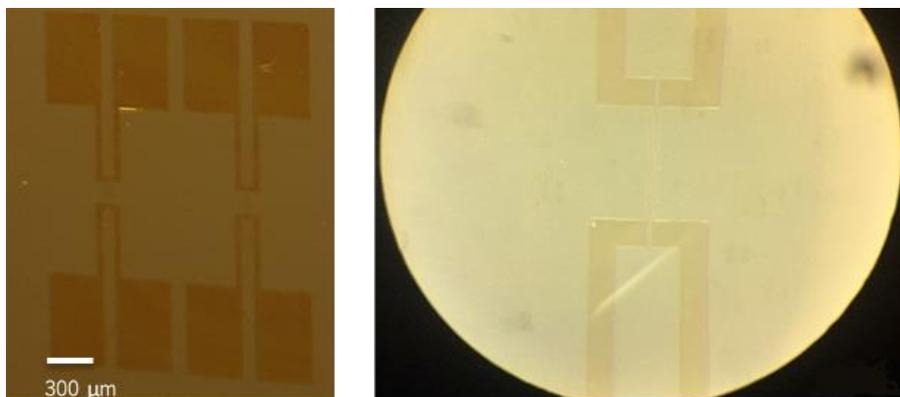
- a) Colocação da resina fotossensível, AZ 4562, sobre o filme de Au. Este processo é realizado através da colocação de várias gotas sobre o filme fino, com o auxílio de uma pipeta descartável (figura 34 a));
- b) Neste passo efetua-se a deposição da resina fotossensível sobre o filme de ouro por *spin-coating* a uma velocidade de 6000 rpm durante 20 s, utilizando o *spin-coater* (*Polos 200, ATP GmbH, Bienenbüttel, Alemanha*). Em seguida realiza-se a cura da resina fotossensível numa *hot plate* (*Präzitherm type PZ28-2, 1100 W Harry Gestigkeit GmbH, Alemanha*) a uma temperatura de 100°C durante 10 minutos seguido de um arrefecimento até à temperatura ambiente ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ ) durante 10 minutos (figura 34 b));
- c) Seguidamente realiza-se a exposição a radiação UV (365 nm) durante 1 minuto utilizando máscaras de fotolito que contém o padrão dos eléctodos que pretendemos. A exposição foi realizada recorrendo ao equipamento *MaskAligner* (*Karl Suss MJB3*) utilizando o modo *soft contact* (figura 34 c) e d));

- d) Por fim é feita a revelação da resina fotossensível utilizando um revelador AZ351-B diluído em água destilada numa proporção de 1:4. A revelação é feita por agitação magnética durante 10 minutos, sendo de seguida lavada com água destilada e seca com fluxo de azoto (figura 34 e)).



**Figura 34.** Representação esquemática do processo de fotolitografia da resina fotossensível AZ 4562 utilizada no fabrico dos elétrodos.

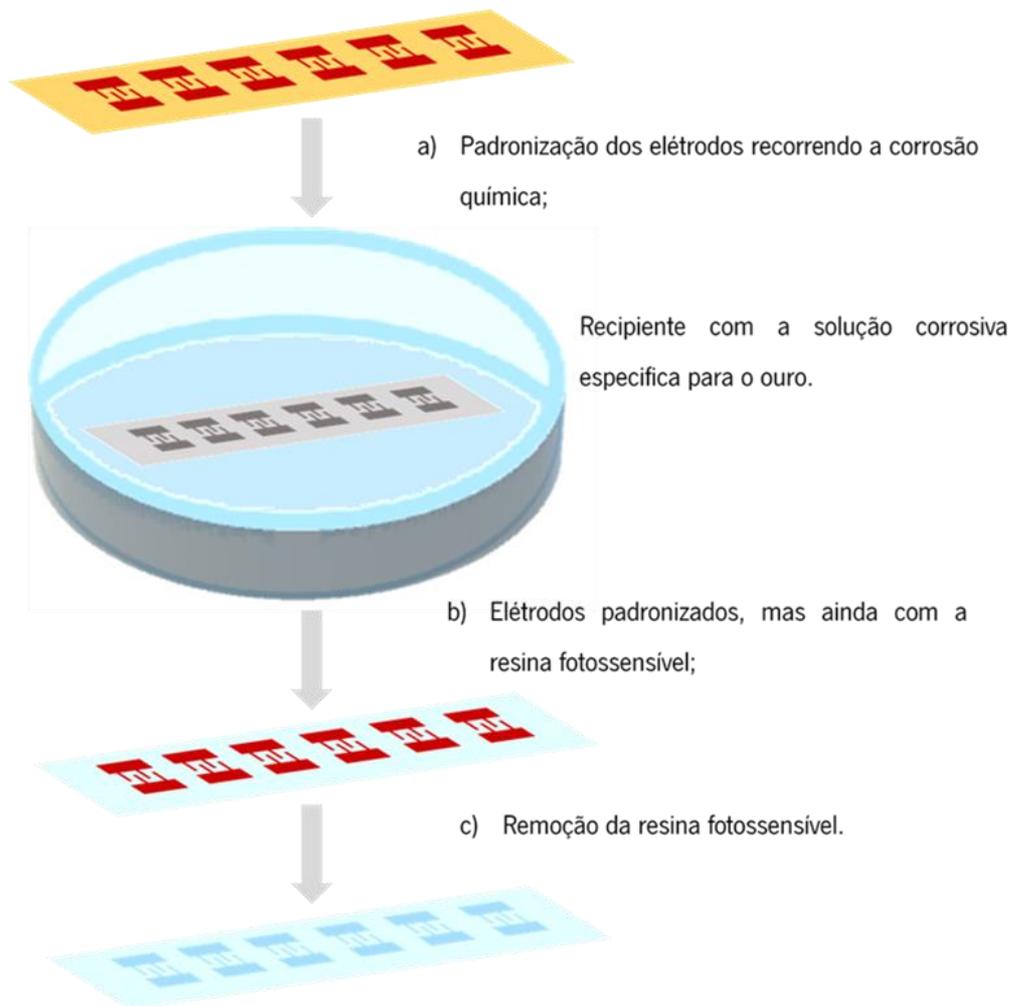
Após a padronização da resina fotossensível AZ 4562 sobre o filme de Au, é realizado a etapa de corrosão química para remover o filme das partes expostas, ou seja, das zonas onde não contém a resina fotossensível.



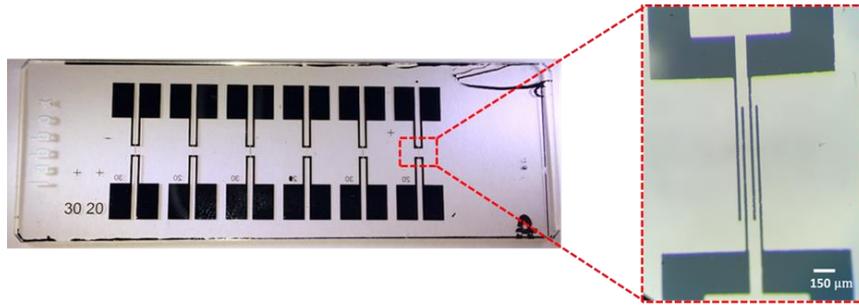
**Figura 35.** Imagens obtidas do microscópio da padronização da resina fotossensível AZ 4562 antes de ocorrer a corrosão.

Na corrosão química foi utilizado um corrosivo químico específico e com boa seletividade para a remover o Au/Cr nas áreas corretas. Para que existisse uma maior interação da solução de corrosão com a amostra, foi utilizada agitação mecânica.

Na corrosão química, colocou-se a amostra numa solução corrosiva específica para o Au (*Gold Etchant TFA, Transene*), durante aproximadamente 15 s. Após este tempo e de visualizar que todas as áreas pretendidas foram removidas, retiram-se a amostra, e lava-se em água destilada. Para finalizar a padronização do filme, é necessário remover a resina fotossensível. Para isso mergulhou-se a amostra numa solução química de AZ100, para remover durante alguns segundos. Por fim limpa-se a estrutura com água destilada para remover resíduos indesejados e seca-se com fluxo de azoto (figura 36). O aspeto final encontra-se representado na figura abaixo (figura 37) [55, 56].



**Figura 36.** Esquemático do processo de corrosão química do AU.



**Figura 37.** Fotografia dos microelétrodos padronizados.

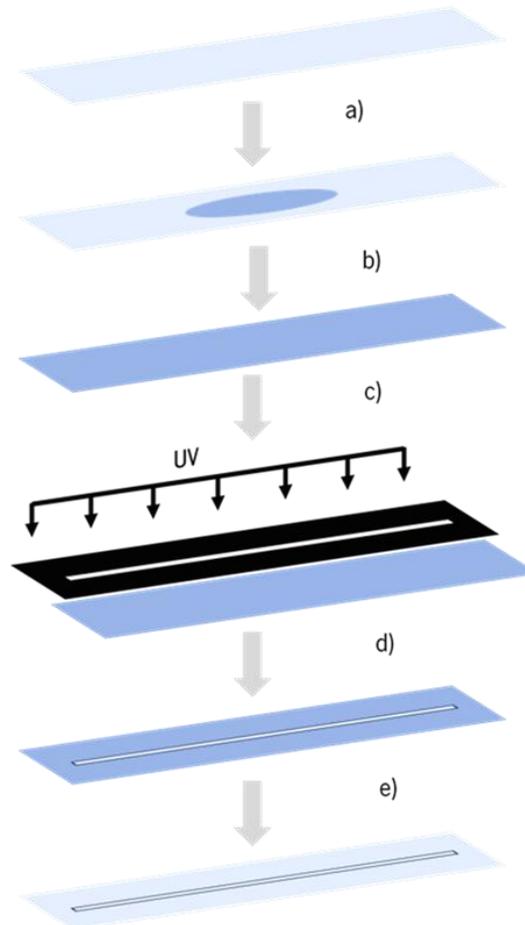
### 3.5.2 Fabrico do canal microfluidico

A segunda parte do fabrico da plataforma microfluidica consiste no fabrico de um canal microfluidico. Este processo inicia-se com o fabrico do molde em SU-8 por fotolitografia UV que será utilizado para padronizar o canal no PDMS por técnicas de litografia suave.

Na figura 38 está representado de forma esquemática o processo de fabrico do molde em SU-8 que inclui os seguintes passos:

- a) Colocação de 1 g de SU-8 25 sobre uma lâmina de vidro. Após a pesagem, realiza-se a deposição da resina fotossensível, SU-8, por *spin coating* a 3000 rpm durante 30 s (figura 38 a));
- b) Seguidamente efetuou-se o passo de pré-aquecimento na *hot plate* que é realizado em dois ciclos: o primeiro ciclo foi de 5 minutos a 65°C e o segundo ciclo foi de 10 minutos a 95°C. O primeiro ciclo garante a evaporação do solvente, criando um revestimento uniforme com uma boa adesão ao substrato. Já o segundo ciclo é responsável por densificar o SU-8. A transição entre os ciclos de ser feita progressivamente, para minimizar a tensão criada no SU-8 e conseguir garantir a evaporação total do solvente. Tal cuidado também vai conseguir evitar a ocorrência de encolhimento e fissuras após a exposição UV. Se a mudança entre ciclos for feita de uma forma rápida, pode ocorrer a evaporação incompleta do solvente, levando a formação de um filme mais denso na superfície do SU-8 que impede a evaporação do solvente nas zonas interiores (figura 38 b));
- c) De seguida colocou-se o substrato com a máscara de fotolito alinhada e expôs-se a radiação UV. O SU-8 é uma resina fotossensível negativa, ficando assim as zonas transparente marcadas, originando a estrutura final. A exposição à radiação UV (365 nm) foi feita durante 2 minutos para padronizar o SU-8 (figura 38 c));
- d) Seguidamente realizou-se o pós-aquecimento na *hot plate*, com um ciclo de 5 minutos a 65°C e outro durante 10 minutos a 95°C (figura 38 d));

- e) Para finalizar introduziu-se a estrutura numa solução de revelação de SU-8 durante 10 minutos para remover o SU-8 não exposto. Por fim lavou-se com água destilada e secou-se com fluxo de azoto (figura 38 e)).

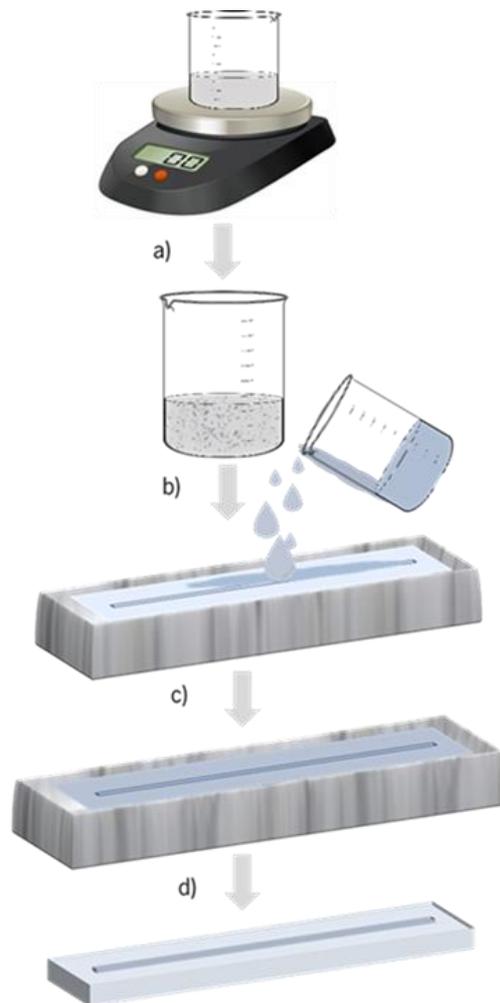


**Figura 38.** Representação esquemática do processo de fotolitografia da resina fotossensível SU-8 utilizada no fabrico do molde do canal microfluidico.

Após a obtenção do molde necessário para o fabrico do canal microfluidico procedeu-se à preparação do PDMS (figura 39) [56], conforme descrito de seguida:

- a) Iniciou-se com a pesagem dos dois componentes do PDMS (base do pré-polímero e agente de cura) na proporção de 10:1 a partir do kit comercial (*Sylgard 184, dow corning*). Para isso, pesou-se 2 g de agente de cura e 20 g da base do pré-polímero. As quantidades devem ser calculadas, tendo em conta o molde e a espessura que se deseja. Começou-se por misturar a solução o que leva ao aparecimento de uma enorme quantidade de bolhas de ar na mistura. Foi então necessário realizar a desgaseificação num sistema de vácuo, de forma a retirar todas a bolhas, obtendo-se uma solução transparente (figura 39 a));

- b) Depois de se obter a mistura sem bolhas, verte-se a solução sobre o molde. É importante que o derramamento do material seja feito no centro do molde e a baixa altitude, evitando novamente o aparecimento de bolhas de ar (figura 39 b));
- c) Seguidamente realizou-se o processo de cura do PDMS numa *hot plate* durante 30 minutos a 100°C (figura 39 c));
- d) Por fim retirou-se da *hot plate*, cortou-se o PDMS ao redor do molde e destacou-se a estrutura em PDMS que contém o canal microfluidico. Por fim, efetuaram-se os orifícios de entrada e saída com o auxílio de uma ferramenta de perfuração (figura 39 d)).

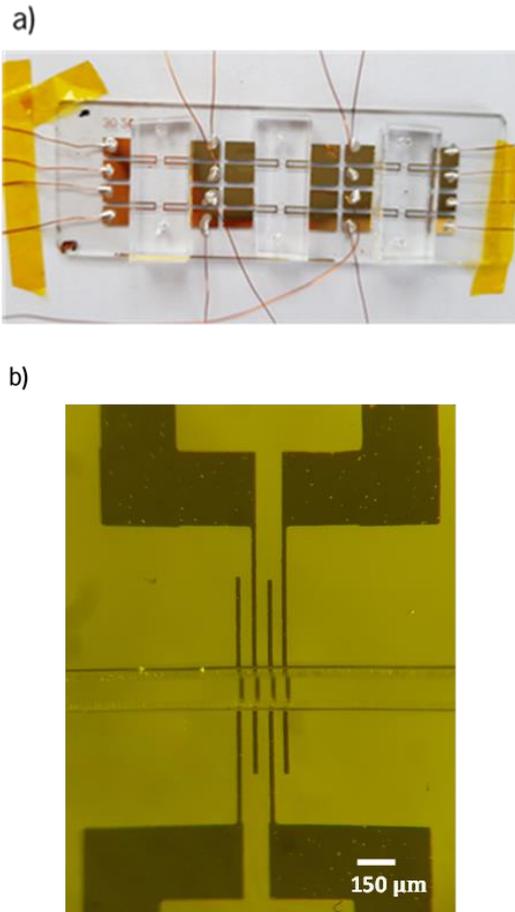


**Figura 39.** Representação esquemática do processo de preparação do PDMS.

### 3.5.3 Integração dos microeletrodos com o microcanal

O processo final do fabrico da plataforma microfluidica inclui a ligação da lâmina de vidro com os elétrodos à estrutura em PDMS com os microcanais. O processo de ligação foi feito recorrendo a um

processo de plasma de oxigénio durante 30s utilizando o equipamento 100 W Plasma *Systems* ZEPTO, *Diener electronic*. Após este período, as duas superfícies expostas são colocadas em contacto fazendo uma ligação irreversível (figura 40).



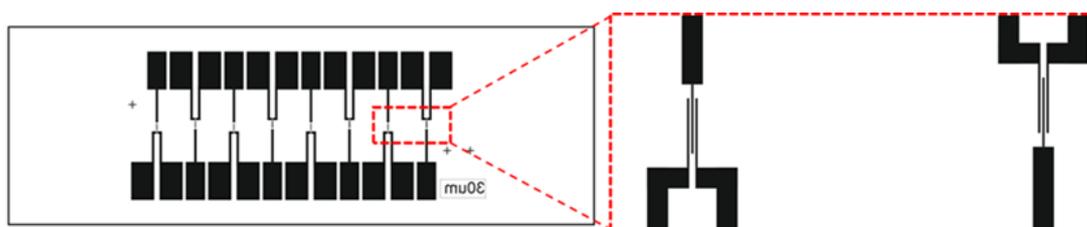
**Figura 40.** Plataforma microfluidica fabricada **(a)** vista de cima e **(b)** vista ao microscópio.

## 4 ELETRÔNICA DE ATUAÇÃO E DE LEITURA PARA A CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES

Neste capítulo é descrita a eletrônica necessária para que os eletrodos sejam capazes de efetuar as medições elétricas e determinar as características das células/partículas. A eletrônica foi validada inicialmente nos programas de simulação (PSIM). De forma a validar o princípio de medição, os testes práticos iniciaram-se com um teste simples em DC para verificar se existia a detecção de partículas. Após esta validação com sucesso, avançou-se para a caracterização em AC que, apesar de ser mais complexa quer na implementação quer na leitura, produz sinais mais confiáveis na detecção, para além de evitar os problemas de polarização e degradação dos eletrodos verificados em DC.

### 4.1 Caracterização da impedância dos microeletrodos

Os microeletrodos (exemplo representado na figura 41) são os elementos fundamentais da plataforma microfluidica para realizar as medições elétricas necessárias para a caracterização das células/partículas.



**Figura 41.** Representação esquemática dos microeletrodos.

Tal com já foi referido anteriormente, os elétrodos foram integrados com o canal microfluídico, onde vão circular as células/partículas dissolvidas numa solução salina com uma concentração de 35 g/L. Esta solução é fundamental para a aquisição dos valores de tensão, corrente e impedância.

Quando se coloca um eletrodo imerso numa solução com substâncias iónicas (ou seja, num eletrólito), as reações de oxidação-redução que vão acontecer entre o eletrodo e o eletrólito, modificam as concentrações destas substâncias nas zonas próximas dos elétrodos. Embora a neutralidade das cargas na solução se mantenha, o eletrólito que rodeia o eletrodo vai adquirir um potencial eléctrico diferente devido as diferentes concentrações iónicas. Assim sendo, na interface eletrodo – eletrólito estabelece-se uma diferença de potencial designada por potencial de dupla camada ou também conhecido por *half-cell potencial*. Esta diferença de potencial depende do metal que constitui o eletrodo, da concentração de iões que existe na solução e da temperatura. A diferença de potencial é afetada quando existe uma corrente a fluir entre o eletrodo e o eletrólito.

As diferenças de potencial provocadas pelas diferentes correntes e tensões que ocorrem entre o eletrodo e o eletrólito, variam com a frequência dos sinais de excitação e na maior parte das vezes não são lineares. Desta forma, é possível determinar os valores de impedância da interface eletrodo-eletrólito-elétrodo recorrendo à utilização das técnicas de EIS. Esta técnica consiste em colocar o eletrólito (solução salina com células/partículas) a fluir entre os elétrodos, aplicar um estímulo eléctrico e verificar a resposta resultante. Normalmente esse estímulo é uma tensão alternada do tipo sinusoidal e mede-se as partes reais e imaginárias da impedância complexa em função da frequência de excitação. Os gráficos da parte real e da parte imaginária da impedância em função da frequência compõem o espectro da impedância do eletrodo e do eletrólito que estamos a medir. Os valores de impedância medidos neste tipo de tecnologia permitem concluir que os elétrodos podem ser representados por um circuito RC em série, como o que está presente na figura 42, visto que a partir do valor de impedância podemos saber o valor da resistência e do condensador.



**Figura 42.** Circuito equivalente dos elétrodos.

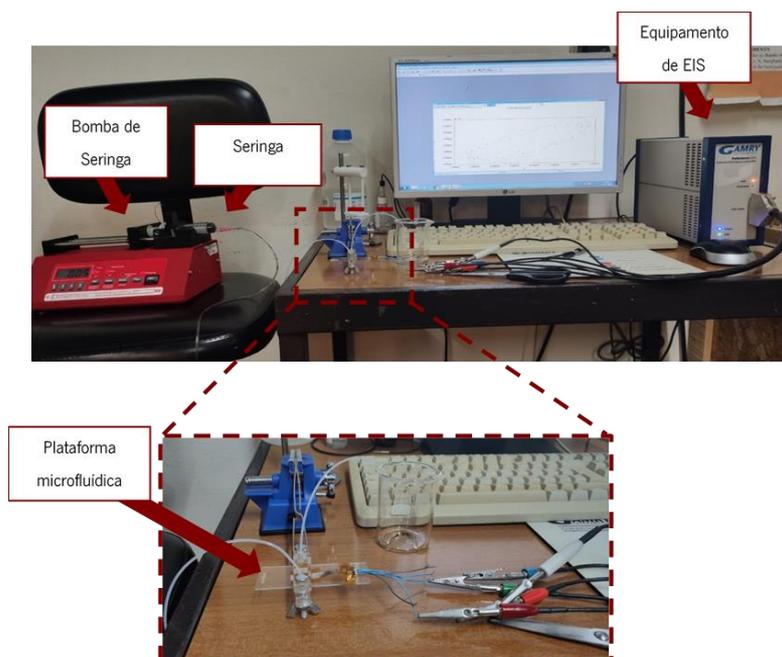
A impedância,  $Z$ , determina-se pela seguinte equação, onde  $X_L$  representa a reactância indutiva e  $X_C$  representa a reactância capacitiva:

$$Z = R + (X_L - X_C) \quad (6)$$

Visto que não existe uma indutância, a equação da impedância pode ser simplificada a:

$$Z = R - X_C \quad (7)$$

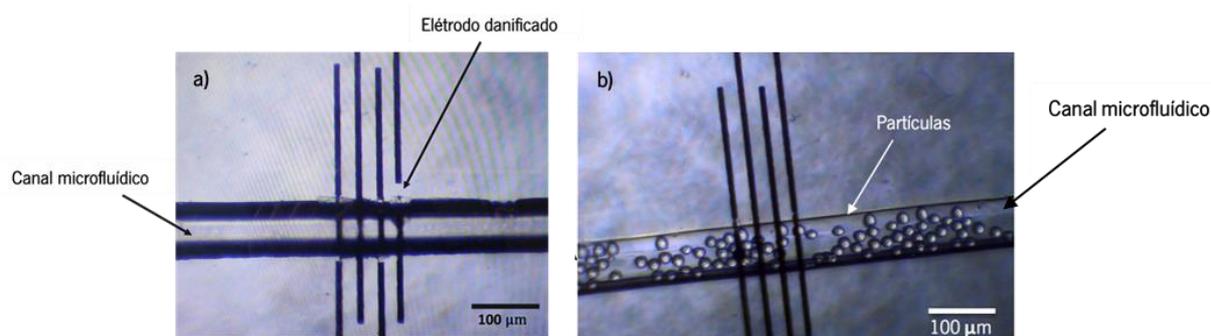
Os valores de impedância dos elétrodos dentro da plataforma microfluidica foram medidos experimentalmente por EIS utilizando o equipamento *Gamry Reference 600TM potentiostat/galvanostat*. A montagem experimental utilizada para realizar esta caracterização está apresentada na figura 43 e inclui um sistema de bombeamento para introduzir as soluções na plataforma microfluidica e o sistema de medição de impedância.



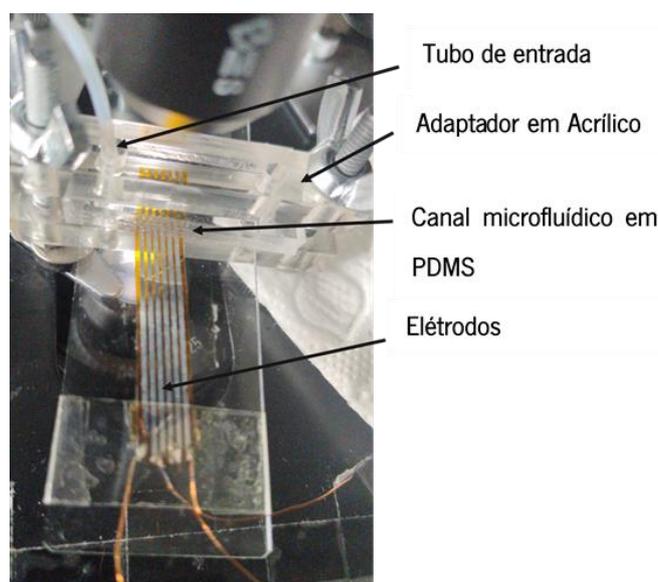
**Figura 43.** Montagem experimental utilizada para caracterização dos valores de impedância.

As configurações simuladas no capítulo 3 foram fabricadas, mas os testes experimentais apresentaram vários problemas que impediram a caracterização destas estruturas. Na maioria dos testes, ocorria a degradação do elétrodo positivo devido à corrente aplicada (figura 44 a). Para além disso, o canal microfluidico ficava obstruído ao fim de algum tempo de teste (figura 44 b). As plataformas fabricadas eram fechadas de forma permanente por plasma de oxigénio e sempre que ocorria alguns destes problemas, a plataforma tornava-se obsoleta. Apesar de ser terem fabricado diversas plataformas microfluidicas com esta configuração, o seu teste foi muito difícil. Desta forma, percebeu-se que os parâmetros utilizados na simulação numérica, nomeadamente a aplicação de uma onda sinusoidal de tensão AC de 1,5V entre os elétrodos a uma frequência de 80 kHz, eram incompatíveis com o teste prático, uma vez que a corrente extremamente elevada levava ao rompimento dos elétrodos. O *COMSOL* não permite a análise do limite do elétrodo, apresentando sempre os valores teóricos de tensão e corrente em condições ideais e, por isso não era possível prever a degradação que se verificou experimentalmente.

Para superar estes problemas e conseguir validar a tecnologia, fizeram-se algumas adaptações, nomeadamente, a utilização de canais e elétrodos de dimensões maiores, fabricou-se um adaptador em acrílico de forma a pressionar o canal microfluídico sobre os elétrodos e aplicou-se tensões mais baixas. Para além disso, este adaptador permitiu que sempre que ocorresse a degradação do elétrodo ou obstrução do canal, fosse possível abrir e limpar, permitindo a sua reutilização. Assim, a caracterização EIS foi realizada apenas para esta plataforma (figura 45).



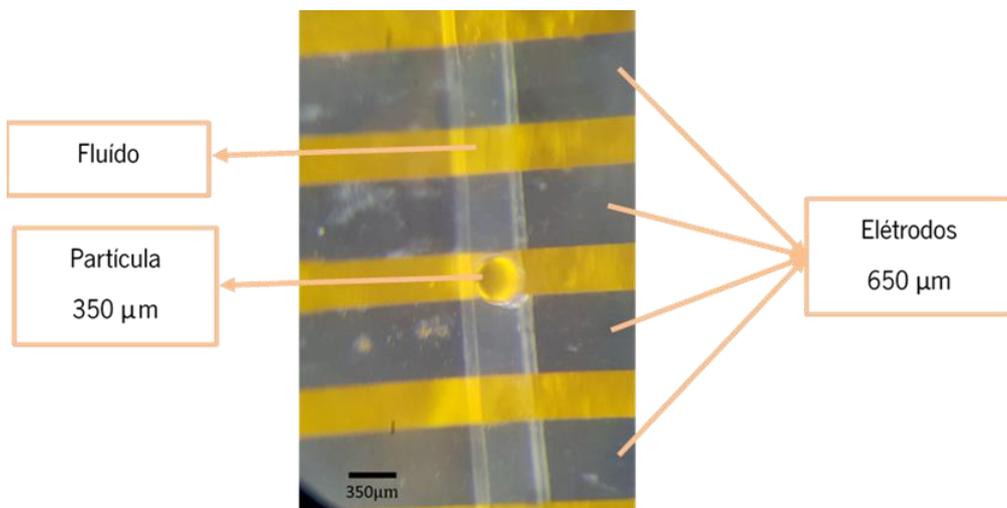
**Figura 44.** Fotografias dos problemas verificados durante o teste prático: **(a)** danificação dos elétrodos e **(b)** obstrução do canal.



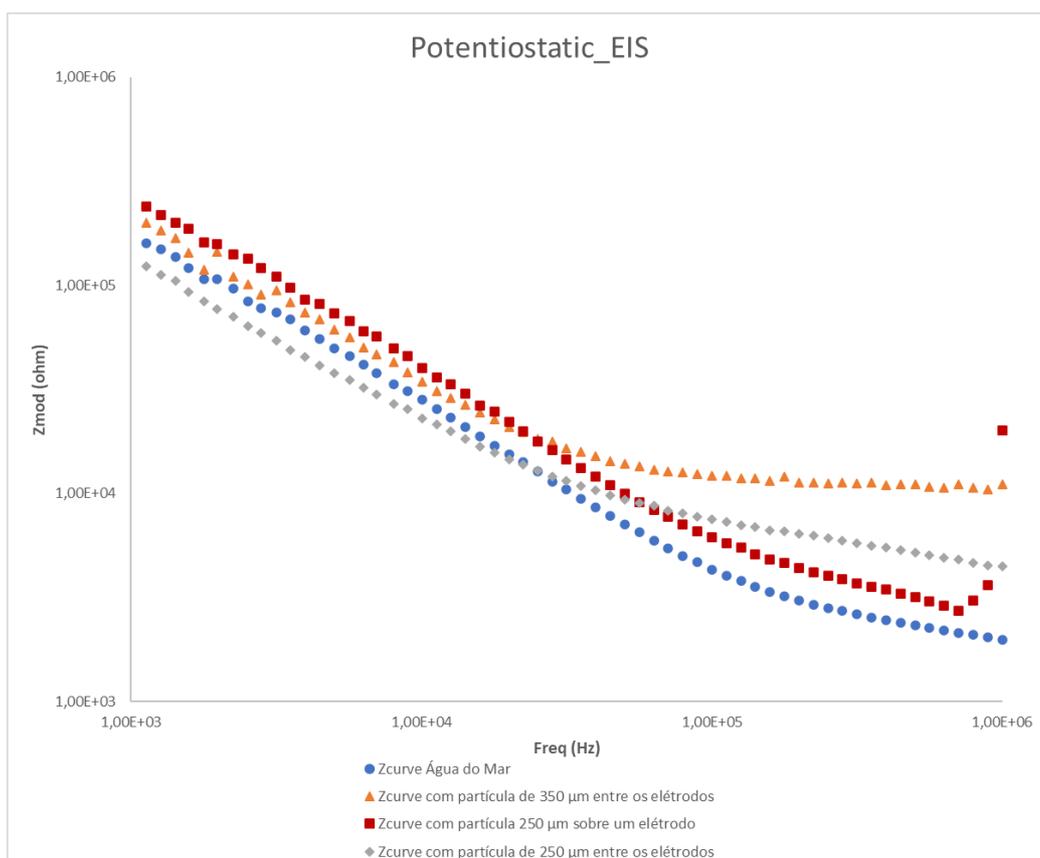
**Figura 45.** Plataforma microfluídica otimizada para realização dos testes experimentais.

Os valores de impedância foram medidos com água do mar e água do mar com uma partícula entre os elétrodos. As medições foram efetuadas para dois tamanhos de partículas (250 e 350 μm). Na figura 46 está apresentada uma das situações medidas, onde se verifica que a partícula de 350 μm de diâmetro ocupa a posição entre os elétrodos. Os resultados foram analisados pelo *software Gamry Echem*

*Analyst*, o qual permitiu visualizar os gráficos de impedância em função da frequência, presentes na figura 47.



**Figura 46.** Fotografia de microscópio ótica da partícula posicionada entre os eléctrodos para realização da caracterização EIS.



**Figura 47.** Variação dos valores de impedância registados com GAMRY com e sem partículas na plataforma microfluidica.

Pela análise dos gráficos, verifica-se que a impedância torna-se praticamente constante para frequências acima de 100 kHz e por isso foi escolhida a frequência de excitação de 300 kHz. A curva

laranja representa a impedância dos elétrodos para uma partícula de 350  $\mu\text{m}$  com um  $Z = 1,1 \times 10^4 \Omega$  ( $f=300 \text{ kHz}$ ), a cinzento está representada a impedância dos elétrodos para uma partícula mais pequena (250  $\mu\text{m}$ ) com um  $Z = 5,79 \times 10^3 \Omega$ , a vermelho está representada a impedância dos elétrodos para uma partícula de 250  $\mu\text{m}$  em cima de um eléctrodo com um  $Z = 3,72 \times 10^3 \Omega$  e a azul está representada a impedância nos elétrodos para a água do mar com um  $Z = 2,63 \times 10^3 \Omega$ . É de notar que quando há partículas sobre os elétrodos, a impedância é muito maior em relação à impedância da água do mar sem partículas. Também é observável que quanto maior o tamanho da partícula maior é o valor de impedância, tal como se encontra representado na curva laranja e cinzenta. A curva vermelha representa uma interferência menor no campo elétrico, uma vez que a partícula encontra-se por cima do eléctrodo e como consequência, o valor de valor de impedância é mais próximo do valor de impedância da água do mar. Assim, para a realização dos cálculos para determinar o valor da resistência e do condensador que representa os elétrodos, foi utilizado o maior valor de impedância medido correspondente à partícula maior,  $1,1 \times 10^4 \Omega$ , ou seja:

$$Z = R - X_C \quad (8)$$

Assumindo  $R = 11,5 \text{ k}\Omega$ ,

$$1,1 \times 10^4 = 11,5 \times 10^3 - X_C$$

$$X_C = 500 \Omega$$

Visto que,

$$X_C = \frac{1}{2\pi f C} \quad (9)$$

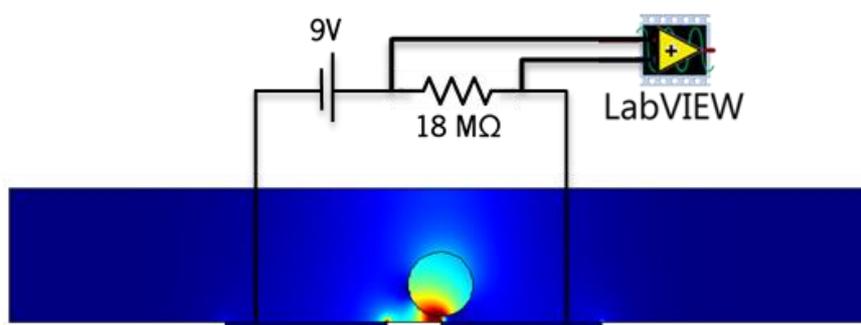
$$C = \frac{1}{2\pi * 300k * 500}$$

$$C \approx 1 \text{ nF}$$

Os cálculos apresentados anteriormente, permitiram conhecer os valores da resistência e do condensador que representam os elétrodos. Esta caracterização foi importante para definir os parâmetros essenciais na implementação do circuito de excitação AC (secção 4.2.1).

## 4.2 Implementação da eletrônica em DC

O princípio de medição da tecnologia RPS em canais microfluidico foi inicialmente validado em DC, de forma a compreender melhor o funcionamento desta tecnologia. A implementação foi baseada na configuração básica do princípio de *Coulter* [59], a qual foi adaptada para o canal microfluidico (figura 48). Para isso, aplicou-se uma tensão de 9 V com recurso a uma pilha e colocou-se uma resistência em série de 18 M $\Omega$ , de forma a permitir que apenas uma corrente de 0,1  $\mu$ A passe pelos elétrodos evitando que se danifiquem. A nível prático, foi observado que correntes superiores (por exemplo 100  $\mu$ A) degradam rapidamente o microeléctrodo com potencial positivo. A pilha foi utilizada para evitar o ruído proveniente da fonte de alimentação, especialmente fontes ligadas à rede elétrica, o qual poderia comprometer os resultados das medições. As alterações da tensão foram medidas na resistência (devido a uma maior variação de tensão) com recurso a um multímetro (*Agilent 34401A*) e os valores ao longo do tempo foram registados através de um *software* implementado em *LabVIEW*.



**Figura 48.** Implementação DC na plataforma microfluidica.

## 4.3 Implementação da eletrônica em AC

Após validação dos resultados em DC passou-se para a implementação em AC. Na figura 49. estão apresentados os principais módulos eletrônicos necessários para este tipo de deteção que incluem: circuitos de excitação, amplificação e finalmente aquisição do sinal. A excitação é necessária para estimular os elétrodos aplicando um sinal AC inicial. Este sinal vai sofrer perturbações com a passagem do fluido e particulas/células, produzindo sinais de baixa amplitude, os quais são difíceis de detetar diretamente. Desta forma, é necessário implementar um amplificador para tornar os sinais detetáveis. Os valores foram adquiridos por um osciloscópio digital.

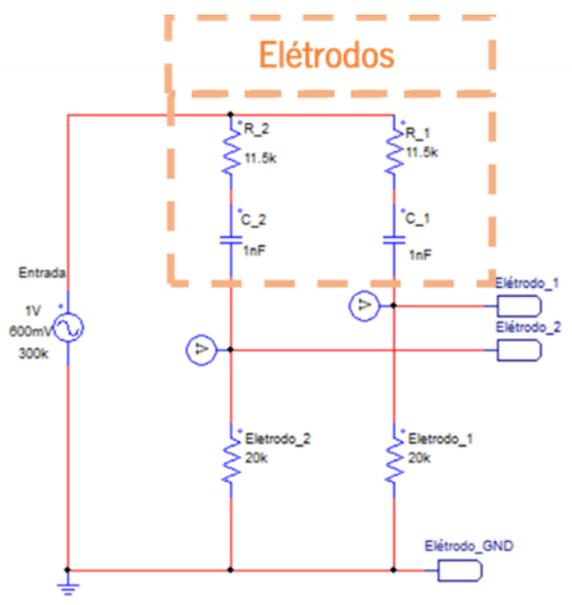


**Figura 49.** Representação esquemática dos principais módulos eletrônicos necessários para as medições em AC.

### 4.3.1 Circuito de excitação

O circuito de excitação é utilizado como um estimulador dos elétrodos. Para isso, aplicou-se um sinal AC de 1 V a uma frequência de 300 kHz com um *offset* de 600 mV, como já tinha sido referido anteriormente. Estes valores foram escolhidos de forma a evitar os efeitos de polarização. Para além disso, quando se aplica uma corrente elétrica nos elétrodos, pode haver uma acumulação de iões, levando a formação de uma capacidade entre os elétrodos e o meio havendo o risco de existir o mesmo potencial ao longo de toda a solução (onde existe elétrodos e onde não existe), podendo levar a saturação dos elétrodos. Os valores escolhidos permitem eliminar estes efeitos uma vez que é a frequência de 300 kHz que os valores de impedância dos elétrodos atingem o regime permanente (figura 47), sendo aqui o ponto ótimo de funcionamento e ao utilizar 1 V de tensão com um *offset* em 600 mV para a impedância que os elétrodos tem (equação 9), vai fazer com que a corrente no circuito seja de 45,5  $\mu\text{A}$ , permitindo assim uma relação estável entre elétrodo e eletrólito.

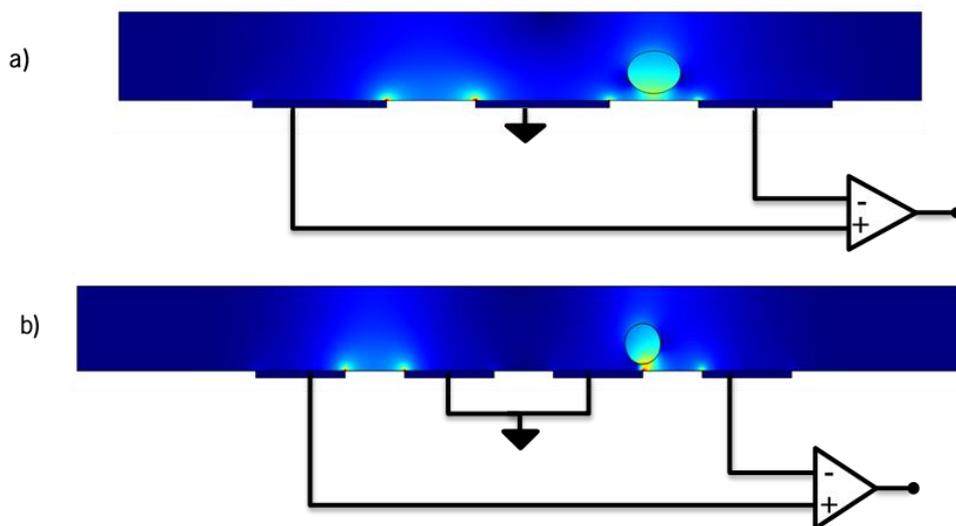
Na figura 50 está representado o circuito de excitação obtido por simulação com o *software PSIM*, onde mostra a tensão de entrada que é aplicada, os elétrodos e duas resistências ajustáveis (potenciômetros). Essas resistências têm de ser da mesma ordem de grandeza da impedância dos elétrodos, de forma a que estas resistências permitam ajustar o valor de tensão nos elétrodos. Para impedir que os elétrodos saturem ou polarizem e para que o valores de saída sejam mais fáceis de detetar, ajusta-se o valor de tensão nos potenciômetros para o valor intermédio da tensão de entrada, sendo esse ajuste aproximado de 150 mV, fazendo com que a corrente nos elétrodos seja de 13,6  $\mu\text{A}$  (equação 9).



**Figura 50.** Representação esquemático do circuito de excitação implementado.

### 4.3.2 Circuito de amplificação

O circuito de amplificação é sem dúvida um circuito com enorme importância no trabalho que se pretende desenvolver, pois a amplitude da maioria dos sinais obtidos, especialmente a partir de partículas de menores dimensões, não são suficientes para que haja uma leitura direta para processamento dos sinais. A operação de amplificação recorre a um tipo específico de circuito linear, normalmente um amplificador operacional devido a sua simplicidade e compatibilidade com qualquer circuito eletrônico.



**Figura 51.** Representação esquemática da ligação do circuito de amplificação para a configuração com **(a)** três e **(b)** quatro eléctrodos.

Os circuitos de amplificação serão implementados conforme é visualizado na figura 51, onde os elétrodos exteriores serão utilizados para ler os valores enquanto que os elétrodos centrais funcionam como referência, ligados à terra (GND ou *Ground*). O amplificador utilizado foi um amplificador de instrumentação, que resulta na junção de três amplificadores operacionais. Para isso, foi escolhido o *Lm741*, mais propriamente o seu circuito integrado *Lm324*. Estes géneros de circuitos caracterizam-se por possuírem elevada resistência de entrada, baixa resistência de saída, elevado grau de rejeição da tensão de modo comum e não inversora da tensão de saída, a qual é uma versão amplificada da diferença das tensões de entrada. Com estes circuitos é possível obter um ganho diferencial finito, preciso e muito estável. O ganho para o circuito deve ser preferencialmente baixo para impedir a amplificação excessiva de componentes indesejadas incluídas no sinal. Por outro lado, não deve ser demasiado baixo pois a amplificação pode não ser suficiente para conseguir detetar o sinal. Sendo assim apontou-se por um ganho de 100.

A equação de saída do amplificador de instrumentação é a seguinte:

$$V_0 = \left(\frac{R_2}{R_1}\right) \times \left(1 + \frac{2R_3}{R}\right) \times (Eléttrodo\_2 - Eléttrodo\_1) \quad (10)$$

Ou seja,

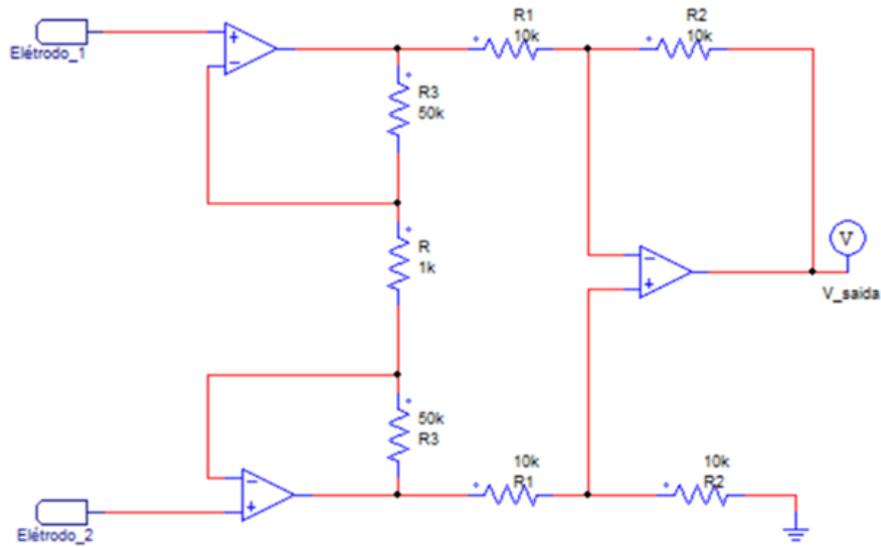
$$G = \left(\frac{R_2}{R_1}\right) \times \left(1 + \frac{2R_3}{R}\right)$$

Substituído  $G = 100$ ,  $R_2 = 10 \text{ k}\Omega$ ,  $R_1 = 10 \text{ k}\Omega$  e  $R = 1 \text{ k}\Omega$ ,

$$100 = \left(\frac{10k}{10k}\right) \times \left(1 + \frac{2R_3}{1k}\right)$$

$$R_3 \approx 51 \text{ k}\Omega$$

Após efetuados os cálculos, projetou-se o circuito de amplificação representado na figura 52.

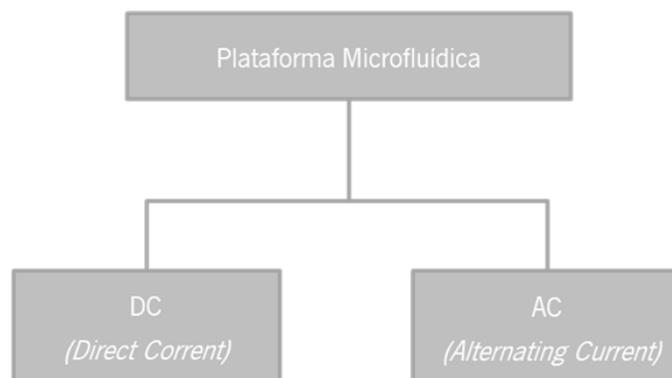


**Figura 52.** Representação esquemático do amplificador de instrumentação implementado.

A junção dos circuitos representados nas figuras 50 e 52, permitem realizar as medições na plataforma microfluídica de forma a detetar a passagem de partículas. Os valores detetados foram adquiridos e apresentados recorrendo a um osciloscópio digital.

## 5 RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados experimentais, que foram realizados para validação da plataforma microfluidica com os elétrodos integrados bem como da sua eletrónica de atuação e leitura. A fase de resultados foi dividida em duas fases, como está representado na figura 53.



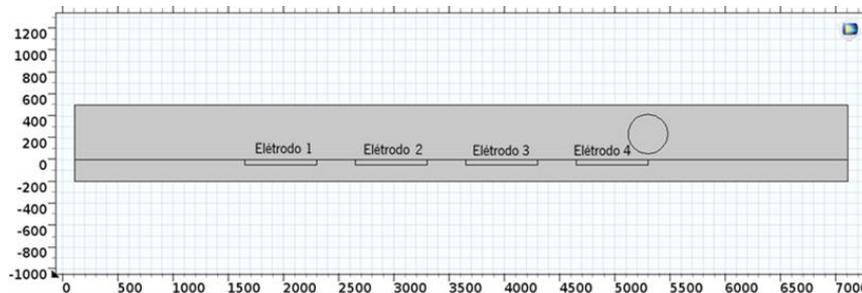
**Figura 53.** Esquemático da divisão dos Resultados Experimentais.

Tal como foi mencionado anteriormente, a plataforma foi inicialmente validada através de medições DC e posteriormente foi implementada em AC. As medições incluíram, numa primeira fase, a passagem apenas de água do mar para avaliar as variações obtidas e definir os valores de referência (sem partículas). De seguida, foram preparadas soluções de água do mar e partículas com tamanhos de 20 e 60  $\mu\text{m}$ . Estas soluções foram introduzidas nos microcanais com o auxílio de uma bomba de seringa e registados os valores de tensão com a eletrónica desenvolvida. Tal como mencionado no capítulo 4, os testes práticos da plataforma microfluidica com os elétrodos simulados no capítulo 3 não forneceram bons resultados, uma vez que se verificaram alguns problemas, nomeadamente os elétrodos começaram-se a danificar devido à tensão aplicada ser muito alta, as partículas não eram detetadas para

aquele valor de frequência e o canal microfluídico ficava obstruído muito facilmente e por isso foi simulada e fabricada uma nova configuração, tal como mostra a seção seguinte.

## 5.1 Adaptação da plataforma microfluídica

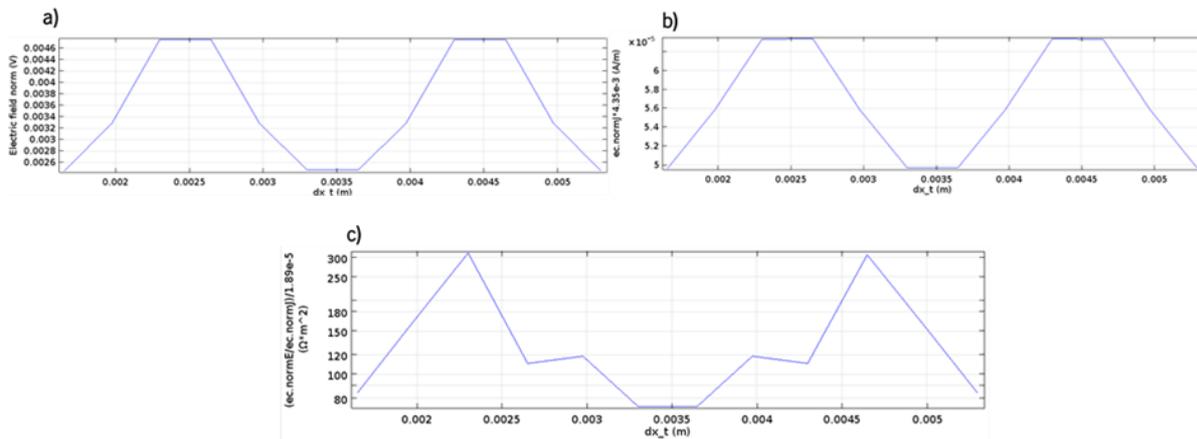
De forma a ultrapassar os problemas mencionados anteriormente e conseguir validar a tecnologia apresentada, adaptou-se a plataforma microfluídica aumentando o tamanho do canal, a largura e espaçamento dos elétrodos bem como o tamanho das partículas. Colocaram-se elétrodos com uma largura de 650  $\mu\text{m}$  espaçados de 350  $\mu\text{m}$  num canal microfluídico de 500  $\mu\text{m}$  de altura e largura, como está representado na figura 54.



**Figura 54.** Representação esquemática da configuração utilizada na simulação da plataforma microfluídica adaptada.

De forma a evitar que os elétrodos se danificassem tão rapidamente aplicou-se uma tensão AC mais baixa, acertando-se para o valor de tensão que os elétrodos devem apresentar durante o ajuste, 150 mV a uma frequência de 300 kHz (valores encontrados na seção 4.1). Na figura 55 estão apresentados os resultados da nova simulação em *COMSOL*, nomeadamente os gráficos de tensão, corrente e impedância gerados pela passagem da partícula sob os elétrodos. De maneira a aproximar o modelo o mais possível da realidade, definiu-se uma partícula de 175  $\mu\text{m}$  de raio a passar pelos elétrodos.

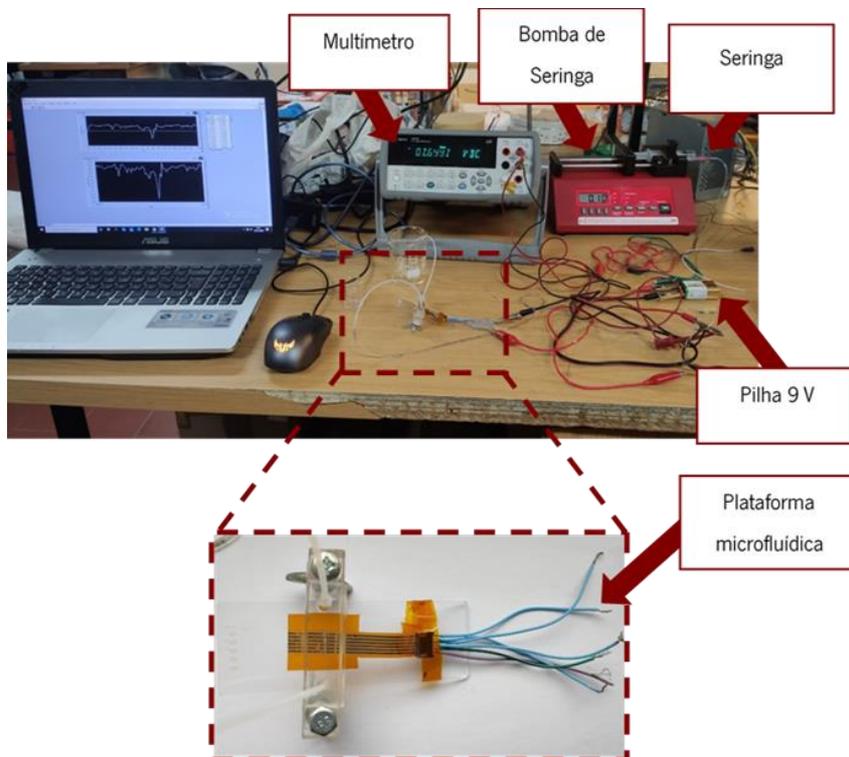
Ao observar os gráficos da figura 55, é possível visualizar um comportamento semelhante aos simulados no capítulo 3. Tal como era de prever os valores de tensão, corrente e de impedância diminuíram uma vez que foi utilizada uma tensão de excitação significativamente menor. Para além disso, esta diminuição também resultou do aumento do tamanho e do espaçamento dos elétrodos. Apesar disso, esta plataforma microfluídica mostrou ser muito mais sensível na deteção de partículas na prática, em comparação com as projetadas anteriormente. A aplicação de uma tensão mais baixa aos elétrodos permitiu avanços significativos na prática uma vez que não degradava os elétrodos.



**Figura 55.** Gráficos de (a) tensão, (b) de densidade de corrente e (c) impedância obtidos por simulação relativamente à plataforma adaptada.

## 5.2 Validação da plataforma microfluidica com detecção em DC

Os testes para detecção em DC foram realizados utilizando a montagem experimental apresentada na figura 56.



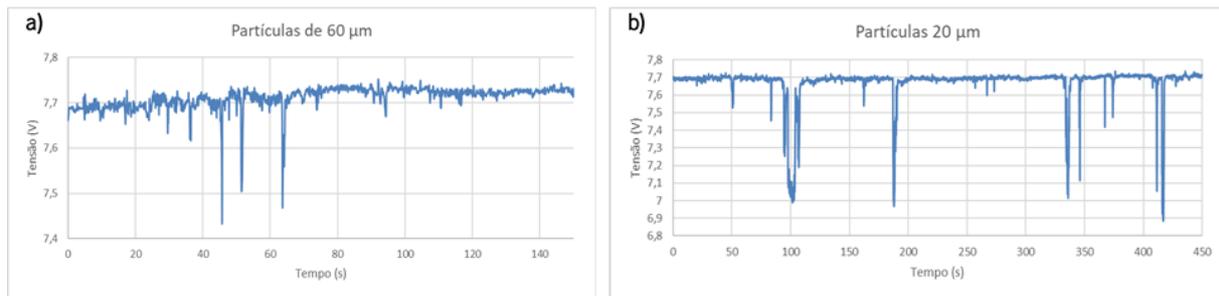
**Figura 56.** Montagem experimental utilizada para as medições em DC.

Os resultados dos testes em DC para a água do mar e para partículas de 20 e 60  $\mu\text{m}$  estão apresentados na figura 57 e 58, respetivamente. Como as partículas eram mais pequenas que o canal

microfluídico (dimensão de 500  $\mu\text{m}$  em altura e largura), inseriu-se dentro do canal uma partícula estática (cerca de 350  $\mu\text{m}$ ) de forma a forçar a passagem das partículas mais pequenas junto dos elétrodos, produzindo alterações na tensão mais perceptíveis. Os sinais de tensão obtidos com a água do mar (figura 57) a fluir dentro da plataforma microfluidica apresentam uma tendência constante sem apresentar picos significativos. Por outro lado, nos testes com as partículas de 60  $\mu\text{m}$  (figura 58 a)), a tensão na resistência em série com os elétrodos apresenta um comportamento mais ou menos constante por volta dos 7,7V e quando é detetada a passagem da partícula, a tensão desce para os 7,45 V (variação máxima de 0,3 V). No caso das partículas de 20  $\mu\text{m}$  (figura 58 b)), a tensão desceu dos 7,7 V para os 7 V (variação máxima de 0,7 V). Os valores foram medidos na resistência porque sofre uma maior variação sendo que uma maior variação da tensão na resistência corresponde a uma menor variação nos elétrodos, ou seja, quanto menor a partícula, menor a variação nos elétrodos e consequentemente maior variação na resistência. Assim, comparando as variações da tensão e os gráficos obtidos é visível que as partículas de 20  $\mu\text{m}$  provocam uma maior variação de tensão na resistência do que as partículas de 60  $\mu\text{m}$ . Portanto, estes resultados vão de encontro aquilo que foi referido anteriormente nesta dissertação relativamente à técnica RPS, validando com sucesso os testes em DC realizados com a plataforma microfluidica. Apesar desta validação, durante os testes práticos foram ocorrendo problemas nomeadamente a danificação dos elétrodos quando se aplicava uma corrente de 100  $\mu\text{A}$ . Rapidamente se visualizava a remoção do material do elétrodo positivo e por isso foi-se reduzindo a corrente até um valor de 0,1  $\mu\text{A}$ , onde se confirmou que o elétrodo permanecia estável e permitia realizar as medições.



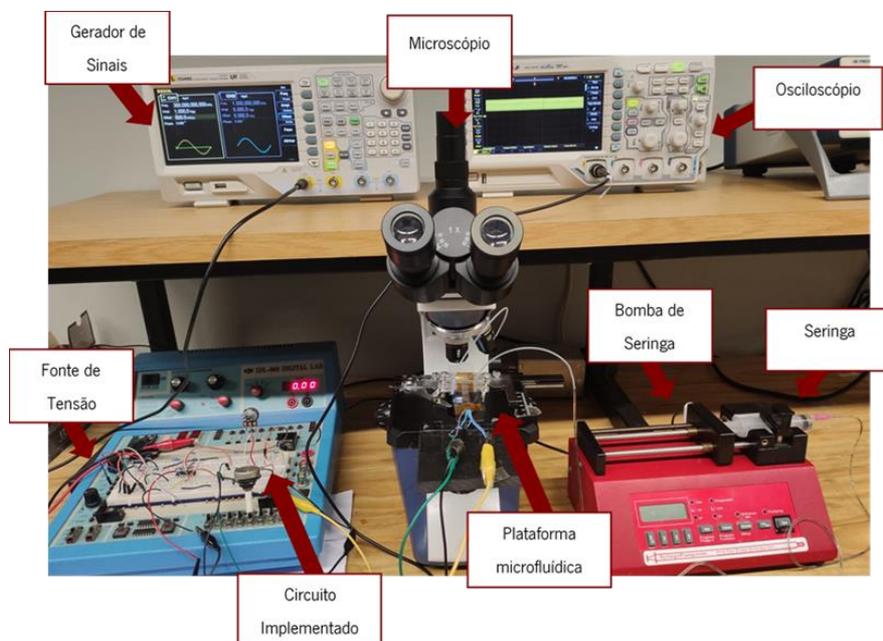
**Figura 57.** Valores de tensão registados com a passagem de água do mar pela plataforma microfluidica.



**Figura 58.** Valores de tensão registados com a passagem das partículas de **(a)** 60  $\mu\text{m}$  e **(b)** 20  $\mu\text{m}$  pela plataforma microfluidica.

### 5.3 Validação da plataforma microfluidica com deteção em AC

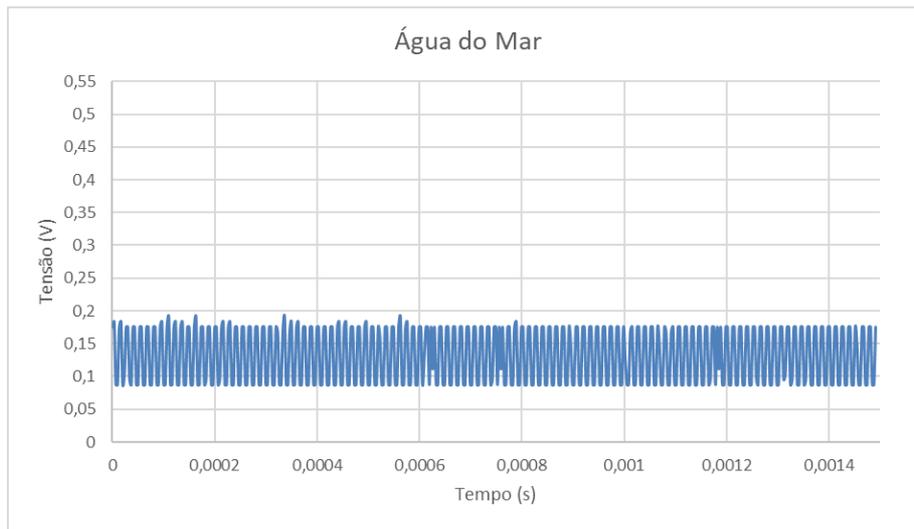
Após a validação em DC, avançou-se para os testes em AC com a utilização da eletrónica projetada no capítulo 4. Na figura 59 está apresentada a montagem experimental utilizada neste teste, a qual compreende um gerador de sinais que nos permite modular a onda de excitação, uma fonte de tensão para alimentar o circuito para excitação, circuito de leitura dos sinais dos elétrodos, a plataforma microfluidica onde fluem as partículas, um sistema de bombeamento, um microscópio para confirmar a passagem de partículas e um osciloscópio para apresentação dos sinais.



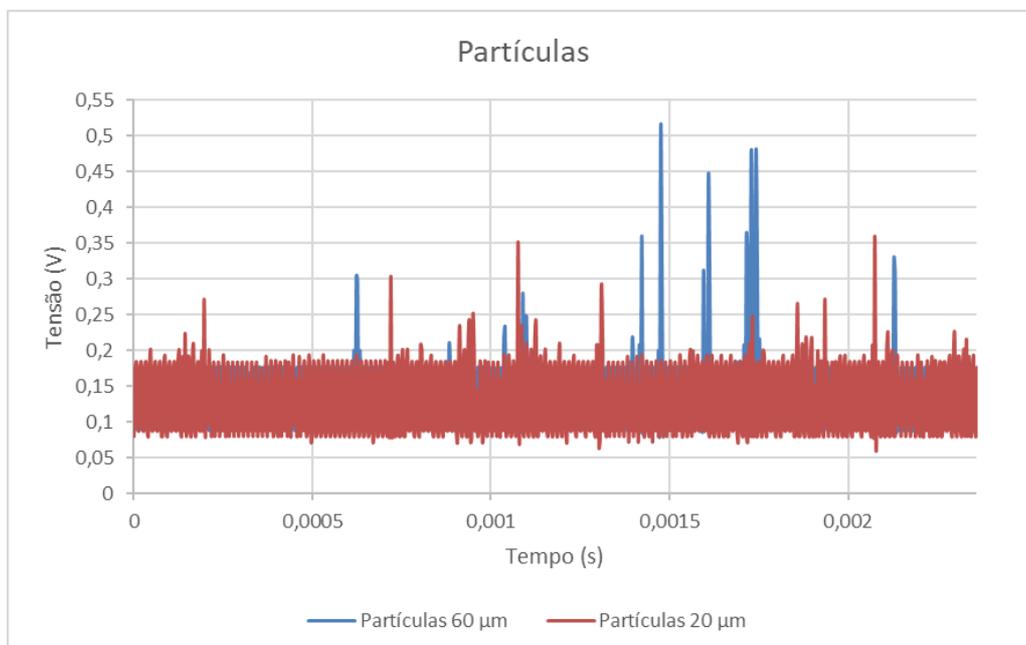
**Figura 59.** Montagem experimental utilizada para realização dos testes em AC.

Tal como foi feito nas deteções em DC, realizou-se em primeiro lugar a deteção da água do mar para ser possível perceber qual era a resposta que as partículas provocavam na tensão durante a sua

passagem pela plataforma microfluidica. Para isso, colocou-se água do mar a fluir dentro da plataforma microfluidica com a ajuda da bomba de seringa com um caudal de 0.10 ml/min. Os valores de tensão correspondentes à água do mar estão apresentados no gráfico da figura 60. Após este teste, procedeu-se à introdução de água do mar com partículas de 20 e 60  $\mu\text{m}$  e registaram-se os valores de tensão (figura 61). Tal como nas deteções em DC, manteve-se a partícula de 350  $\mu\text{m}$  dentro do canal, de forma a provocar uma obstrução na zona dos elétrodos, para que as partículas passem mais próximas da superfície dos elétrodos.



**Figura 60.** Valores de tensão AC registados durante a passagem de água do mar na plataforma microfluidica.

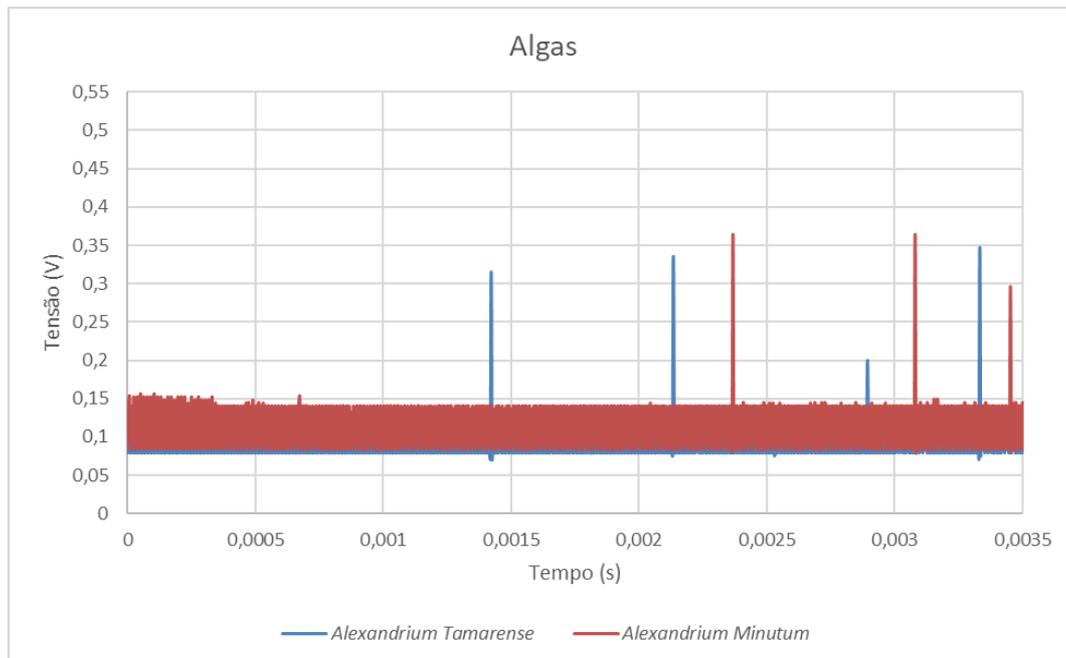


**Figura 61.** Valores de tensão AC da passagem de partículas de 60 e 20  $\mu\text{m}$  na plataforma microfluidica.

Tal como nas deteções em DC, os valores de tensão para a água do mar (figura 60), tendem a ser muito mais constantes (entre 0,1 e 0,2 V) do que os valores de tensão da água do mar com partículas. No gráfico da figura 61 são notórias pequenas variações de tensão, para além da linha base de tensão que é formada pela água do mar.

Na figura 61 a azul estão representadas as variações de tensão resultantes da passagem das partículas de 60  $\mu\text{m}$ . A maior parte destas variações ocorrem até aos 0,3 V e 0,5 V, onde a maioria é superior a 0,4 V. Na figura 61 a vermelho estão representadas as variações da tensão para as partículas de 20  $\mu\text{m}$ , onde os seus maiores picos de tensão são até aos 0,4 V, onde a maior parte destes ocorre entre os 0,2 V e os 0,3 V. Assim, é possível afirmar que a plataforma microfluidica consegue detetar a passagem de partículas e para além disso permite discriminar diferentes tamanhos.

Foi ainda realizado um teste com algas de fitoplâncton tóxico utilizando as espécies *Alexandrium Tamarensis* e *Alexandrium Minutum*.



**Figura 62.** Variações da tensão com a passagem das algas *Alexandrium Tamarensis* e *Alexandrium Minutum* na plataforma microfluidica.

Os dados da figura 62 apresentam as variações da tensão provocadas pela passagem das células de fitoplâncton. Tal como era de prever, a contagem mostrou um número muito reduzido de células devido à baixa concentração da cultura, uma vez que a sua cultura em laboratório é muito difícil e o seu crescimento é muito lento, e com variações semelhantes às das partículas de 20  $\mu\text{m}$ .

Na *Alexandrium Tamarensis* (representado a azul na figura 62) as variações rodam os 0,3 e os 0,35 V e na *Alexandrium Minutum* (representada a vermelho na figura ) as variações rodam os 0,35 e

0,36 V. Estes valores são semelhantes porque estes dois tipos de algas tem tamanhos semelhantes, sendo a *Alexandrium Minutum* ligeiramente maior com um comprimento compreendido entre os 28  $\mu\text{m}$  e os 35  $\mu\text{m}$  e uma largura entre os 20  $\mu\text{m}$  e os 30  $\mu\text{m}$ , e a *Alexandrium Tamarense* com um comprimento entre os 22  $\mu\text{m}$  e os 51  $\mu\text{m}$  e uma largura entre os 17  $\mu\text{m}$  e os 44  $\mu\text{m}$ , como se pode comprovar pelo o anexo I. Apesar das variações da tensão serem baixas, consegue-se verificar a geração de pulsos de diferentes amplitudes com a a passagem de células com tamanho diferente pela zona de deteção.

## 5.4 Conclusão

O intuito deste capítulo foi validar o comportamento da plataforma microfluídica utilizando a eletrónica implementada no capítulo 4. Os testes realizados permitiram confirmar a viabilidade da tecnologia RPS integrada em canais microfluídica para contagem e discriminação de células por tamanhos. Apesar da deteção DC e AC terem sido capazes de indicar a passagem de partículas, a deteção AC mostrou uma melhor sensibilidade para além de evitar os problemas de polarização direta. A deteção só foi conseguida em ambos os casos, quando se utilizou a abordagem da partícula estática para estrangular o canal na zona sobre os elétrodos. Desta forma, a altura e largura do canal deveriam ser reduzidas para serem apropriadas ao tamanho das células que se pretendiam caracterizar. Para além disso, seria desejável realizar mais testes de forma a fazer uma calibração entre a resposta da plataforma em função de diferentes tamanhos de células/partículas. No entanto a disponibilidade limitada de partículas com diferentes tamanhos bem como os problemas verificados na plataforma microfluídica impediram esta caracterização mais detalhada.

## 6 CONCLUSÃO

Neste capítulo são apresentadas as principais conclusões do trabalho realizado assim com sugestões para trabalhos futuros.

### 6.1 Conclusões finais

Esta dissertação descreve todo o processo de otimização, fabrico e caracterização experimental de uma plataforma microfluidica com detecção RPS para discriminação de células de fitoplâncton. Esta plataforma compreende um canal microfluidico que permite a passagem das partículas/células pela zona de detecção, na qual está integrado um sensor de impedância fabricado com microelétrodos em filme fino. O princípio de detecção baseia-se na tecnologia RPS, onde um campo elétrico gerado entre elétrodos é perturbado pelo movimento da partícula/célula que bloqueia o fluxo de corrente, provocando uma variação de tensão cuja intensidade é proporcional ao volume da partícula que atravessa o canal. A partir desta variação, a plataforma é capaz de dar informações do número de células bem como do seu tamanho. O trabalho desenvolvido foi dividido em duas fases: a simulação numérica da plataforma microfluidica e o fabrico e teste experimental da mesma.

Na primeira fase, foram realizadas simulações numéricas com o programa COMSOL Multiphysics, para avaliar qual a configuração com melhor desempenho na resposta do sensor RPS, facilitando a escolha da solução mais viável para o fabrico da plataforma microfluidica. Os principais parâmetros estudados pela simulação incluíram o estudo do número de elétrodos bem como a sua largura e espaçamento. Para além disso, foi estudada a influência do tamanho da partícula na resposta do sensor. Os resultados da simulação permitiram identificar que o espaçamento entre os elétrodos é o

fator que apresenta maior influência na detecção da partícula. Um menor espaçamento garante que o campo elétrico fica mais concentrado, tornando mais facilmente detectadas as variações de corrente e de tensão, provocadas pela passagem das partículas. Para além disso, foi possível confirmar que quanto maior fosse a partícula, menor a corrente que percorre os elétrodos e conseqüentemente maior tensão e impedância. O mesmo estudo indicou que a passagem da partícula provoca uma maior influência quando passa o mais próximo dos elétrodos, o que demonstra que a geometria do microcanal deve ser adequada ao tamanho da partícula. Por fim, as simulações mostraram ainda que a configuração de três e quatro elétrodos apresentavam uma melhor discriminação. Apesar da amplitude dos pulsos ser semelhante nas duas situações, a distinção de dois pulsos é mais clara na configuração de quatro elétrodos uma vez que apresenta dois elétrodos *ground*, e por isso os pulsos são mais espaçados. No caso de três elétrodos, verifica-se uma zona central onde ocorre a sobreposição dos pulsos e por isso a sua distinção não é tão fácil. Na fabricação optou-se pelo fabrico da configuração com quatro elétrodos, visto que permitia realizar testes com todas as configurações.

A segunda fase consistiu no fabrico e caracterização da plataforma microfluidica, tendo por base todas as conclusões retiradas nas simulações numéricas. Para além disso, incluiu a implementação da eletrónica de atuação e leitura necessária para detecção das partículas. Contudo, a validação experimental da plataforma fabricada apresentou alguns problemas, nomeadamente a rápida degradação dos microelétrodos quando se excitavam os elétrodos com uma onda sinusoidal de 1,5 V com uma frequência de 80 kHz. Este problema não foi previsto nas simulações porque a ferramenta utilizada não considera os limites do elétrodo, apresentando sempre os valores teóricos de tensão e corrente em condições ideais. De forma a ultrapassar este problema, foi simulada e fabricada uma nova plataforma com dimensões superiores dos elétrodos, microcanais e mesmo nas partículas utilizadas na validação, de forma a provar o conceito destas tecnologias. Para além disso, a tensão de excitação foi significativamente reduzida para permitir a passagem de uma corrente de 13,6  $\mu\text{A}$ , a qual não provocou qualquer alteração nos elétrodos ao mesmo tempo que permitia obter variações detetáveis após amplificação. A plataforma foi validada experimentalmente em DC e AC, no entanto a detecção AC mostrou ser a mais adequada dado que evita os problemas de polarização direta, nomeadamente a alteração de pH, eletrólise da água do mar e geração de bolhas bem como a degradação dos elétrodos. Os resultados experimentais permitiram observar alterações distintas na tensão com a passagem de partículas de diferentes tamanhos, indo de encontro ao que se verificou na simulação, nomeadamente foram detetados picos de tensão maiores para partículas de tamanho maiores. Para além disso, com a detecção AC foi possível confirmar que a plataforma microfluidica conseguiu discriminar dois tipos de fitoplâncton

tóxico (*Alexandrium Tamarense* e da *Alexandrium Minutum*). Apesar destas espécies apresentarem tamanhos muito idênticos, a plataforma microfluidica apresentou picos de tensão diferentes demonstrando que a *Alexandrium Minutum* é ligeiramente maior que a *Alexandrium Tamarense*. A validação com sucesso da plataforma microfluidica permitiu confirmar que a tecnologia desenvolvida tem viabilidade para ser integrada num citómetro microfluidico para quantificação de células de fitoplâncton tóxico.

## 6.2 Trabalho futuro

Como trabalho futuro é sugerido melhorar as dimensões do canal microfluidico bem como dos microelétrodos de forma a tornar a plataforma microfluidica sensível a partículas ou células mais pequenas, especialmente para a gama de tamanhos do fitoplâncton tóxico. De forma a tornar a plataforma viável para uma maior gama de tamanhos, soluções baseadas em focagem hidrodinâmica ou acústicas podem ser integradas com o canal microfluidico para garantir que as partículas mantenham uma trajetória uniforme e passem individualmente pela zona de deteção. A deteção de tamanhos menores também implicará a otimização dos circuitos de excitação e leitura desenvolvidos. Tal como se verificou na prática, a corrente a aplicar sobre os elétrodos menores deve ser muito baixa para evitar a sua degradação. Esta condição, irá exigir que o ganho no amplificador de instrumentação seja aumentado de forma a detetar as variações de tensão menores. Para além disso, torna-se necessário desenvolver o circuito de leitura para contabilizar automaticamente o número de partículas em cada gama de tamanhos. Para isto, é necessário realizar testes de forma a fazer uma calibração e relacionar os picos de tensão com os tamanhos de células/partículas. Uma das possíveis soluções poderá ser a implementação de um *lock-in amplifier* que desmodulasse a onda gerada através da comparação com a onda de entrada. Após esta comparação, é necessário efetuar a leitura e extrair os valores produzidos pelos elétrodos através de um conversor analógico – digital (ADC), para que estes possam ser lidos e armazenados por exemplo num cartão de memória ou apresentados num display. Por fim, e tal como indicado no capítulo 1, esta tecnologia poderá ser integrada num citómetro de fluxo microfluidico para complementar as informações fornecidas pelas técnicas óticas e fazer uma caracterização morfológica e espectral completa de espécies de fitoplâncton em função do tamanho, forma, complexidade e seus pigmentos fotossintéticos. A combinação de todas estas funcionalidades numa plataforma LOC única oferece a possibilidade de criar dispositivos mais baratos, rápidos e confiáveis que podem ser utilizadas em monitorização submersa durante vários meses.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] “What are phytoplankton?” [Online]. Available: <https://oceanservice.noaa.gov/facts/phyto.html>. [Accessed: 10-Feb-2020].
- [2] S. Smith, “Analytical electric field and sensitivity analysis for two microfluidic impedance cytometer designs,” *IET Nanobiotechnol.*, vol. Vol.1, pp. 69–79.
- [3] I. IP, *Manual para a avaliação da qualidade biológica da água em lagos e albufeiras segundo a directiva quadro da água*. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Instituto da Água, I.P.I, 2009.
- [4] Diana Filipa Pereira Manita, “Bioacessibilidade in vitro das biotoxinas marinhas ácido ocadaico , dinofisistoxina -2 e seus derivados em bivalves crus e cozinhados.,” Universidade de Lisboa, 2017.
- [5] Sistema Nacional de Monitorização de Moluscos Bivalves, “Valores de referência utilizados pelo Laboratório de Fitoplâncton (IPMA) para avaliação da concentração de risco de espécies de fitoplâncton tóxico na água.,” 2017.
- [6] J.-Y. Liu, L.-H. Zeng, and Z.-H. Ren, “Recent application of spectroscopy for the detection of microalgae life information: A review,” *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2019.
- [7] B. Karlson, C. Cusack, and E. Bresnan, *Metodos microscopicos y moleculares para el analisis cuantitativo del fitoplancton*. 2010.
- [8] H. S. Kim, T. P. Devarenne, and A. Han, “Microfluidic systems for microalgal biotechnology: A review,” *Algal Res.*, vol. 30, no. July 2017, pp. 149–161, 2018.
- [9] S. Dunker, “Hidden Secrets Behind Dots: Improved Phytoplankton Taxonomic Resolution Using High-Throughput Imaging Flow Cytometry,” *Cytom. Part A*, 2019.
- [10] Z. I. Johnson and A. C. Martiny, “Techniques for Quantifying Phytoplankton Biodiversity,” *Ann. Rev. Mar. Sci.*, no. 1, 2015.
- [11] M. C. Cerón-García, C. V. González-López, J. Camacho-Rodríguez, L. López-Rosales, F. García-Camacho, and E. Molina-Grima, “Maximizing carotenoid extraction from microalgae used as food additives and determined by liquid chromatography (HPLC),” *Food Chem.*, vol. 257, 2018.
- [12] L. Schlüter, T. L. Lauridsen, G. Krogh, and T. Jørgensen, “Identification and quantification of phytoplankton groups in lakes using new pigment ratios - A comparison between pigment analysis by HPLC and microscopy,” *Freshw. Biol.*, vol. 51, 2006.
- [13] Z. Göröcs *et al.*, “A deep learning-enabled portable imaging flow cytometer for cost-effective, high-throughput, and label-free analysis of natural water samples,” *Light Sci. Appl.*, vol. 7, no. 1, 2018.
- [14] N. Convery and N. Gadegaard, “30 Years of Microfluidics,” *Micro Nano Eng.*, vol. 2, 2019.
- [15] A. M. Schaap, “Integrating optics and microfluidics to automatically identify algae species,” Technische Universiteit Eindhoven, 2015.
- [16] Y. H. Lin, T. M. Pan, M. H. Wu, A. K. Miri, and D. Nieto, “Microfluidic technology and its biological applications,” *Compr. Biotechnol.*, vol. 5, no. October 2018, pp. 62–80, 2019.
- [17] M. Linsenmeier, M. R. G. Kopp, S. Stavrakis, A. de Mello, and P. Arosio, “Analysis of biomolecular condensates and protein phase separation with microfluidic technology,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1868, no. 1, p. 118823, 2021.
- [18] W. Jung, J. Han, J. W. Choi, and C. H. Ahn, “Point-of-care testing (POCT) diagnostic systems using microfluidic lab-on-a-chip technologies,” *Microelectron. Eng.*, vol. 132, pp. 46–57, 2015.
- [19] L. Dai *et al.*, “Microfluidics-based microwave sensor,” *Sensors Actuators, A Phys.*, vol. 309, p. 111910, 2020.

- [20] V. Giridharan *et al.*, “Microfluidic platforms for evaluation of nanobiomaterials: A review,” *J. Nanomater.*, vol. 2012, 2012.
- [21] T. Vaclavek, J. Prikryl, and F. Foret, “Resistive pulse sensing as particle counting and sizing method in microfluidic systems: Designs and applications review,” *J. Sep. Sci.*, vol. 42, no. 1, pp. 445–457, 2019.
- [22] S. Haeberle and R. Zengerle, “Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications,” *Lab Chip*, vol. 7, no. 9, pp. 1094–1110, 2007.
- [23] H. Zhang, C. H. Chon, X. Pan, and D. Li, “Methods for counting particles in microfluidic applications,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 7, no. 6, pp. 739–749, 2009.
- [24] H. M. Shapiro, “The Evolution of Cytometers,” *Cytom. Part A*, vol. 58, no. 1, pp. 13–20, 2004.
- [25] Y. Gong, N. Fan, X. Yang, B. Peng, and H. Jiang, “New advances in microfluidic flow cytometry,” *Electrophoresis*, vol. 40, no. 8, pp. 1212–1229, 2019.
- [26] T. W. Murphy, Q. Zhang, L. B. Naler, S. Ma, C. Lu, and T. Murphy, “technologies for single cell analysis,” pp. 60–80, 2018.
- [27] A. B. Shrirao *et al.*, “Microfluidic flow cytometry: The role of microfabrication methodologies, performance and functional specification,” *Technology*, vol. 06, no. 01, pp. 1–23, 2018.
- [28] R. Yang, L. Fu, and H. Hou, “Sensors and Actuators B : Chemical Review and perspectives on microfluidic flow cytometers,” *Sensors Actuators B. Chem.*, vol. 266, pp. 26–45, 2018.
- [29] A. R. Soares *et al.*, “Automatic System to Count and Classify Bacteria Based on Magnetic Cytometry,” *IEEE Magn. Lett.*, vol. 10, no. June, pp. 24–27, 2019.
- [30] X. Mao *et al.*, “An integrated, multiparametric flow cytometry chip using ‘microfluidic drifting’ based three-dimensional hydrodynamic focusing,” *Biomicrofluidics*, vol. 6, no. 2, 2012.
- [31] R. Green and S. Wachsmann-Hogiu, “Development, History, and Future of Automated Cell Counters,” *Clin. Lab. Med.*, vol. 35, no. 1, pp. 1–10, 2015.
- [32] “Coulter Principle, Counting and Sizing Particles - Beckman Coulter.” [Online]. Available: <https://www.beckman.com/resources/fundamentals/history-of-flow-cytometry/the-coulter-principle>. [Accessed: 15-May-2020].
- [33] H. Bayley and C. R. Martin, “Resistive-Pulse Sensing s From Microbes to Molecules,” 2000.
- [34] K. C. Cheung *et al.*, “Microfluidic impedance-based flow cytometry,” *Cytom. Part A*, vol. 77, no. 7, pp. 648–666, 2010.
- [35] T. Sun and H. Morgan, “Single-cell microfluidic Impedance cytometry: A review,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 8, no. 4, pp. 423–443, 2010.
- [36] Y. Song, J. Zhang, and D. Li, “Microfluidic and Nanofluidic Resistive Pulse Sensing : A Review,” pp. 1–19, 2017.
- [37] R. Peng and D. Li, “Talanta Particle detection on micro fl uidic chips by di ff erential resistive pulse sensing ( RPS ) method,” vol. 184, no. February, pp. 418–428, 2018.
- [38] L. Yang and T. Yamamoto, “Quantification of Virus Particles Using Nanopore-Based Resistive-Pulse Sensing Techniques,” vol. 7, no. September, 2016.
- [39] B. Giebel and C. Helmbrecht, “Chapter 1: Methods to Analyze EVs,” *Exosomes Microvesicles Methods Protoc.*, vol. 1545, no. December, pp. 1–20, 2017.
- [40] M. M. Modena, K. Chawla, P. M. Misun, and A. Hierlemann, “Smart Cell Culture Systems: Integration of Sensors and Actuators into Microphysiological Systems,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 13, no. 7, pp. 1767–1784, 2018.
- [41] Y. Feng, L. Huang, P. Zhao, F. Liang, and W. Wang, “A Microfluidic Device Integrating Impedance Flow Cytometry and Electric Impedance Spectroscopy for High-Efficiency Single-Cell Electrical Property Measurement,” *Anal. Chem.*, vol. 91, no. 23, pp. 15204–15212, 2019.
- [42] V. Errico, A. De Ninno, F. R. Bertani, L. Businaro, P. Bisegna, and F. Caselli, “Mitigating positional dependence in coplanar electrode Coulter-type microfluidic devices,” *Sensors Actuators, B Chem.*,

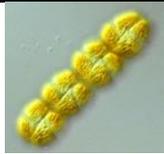
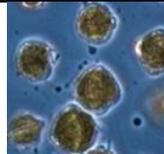
- vol. 247, pp. 580–586, 2017.
- [43] F. Caselli, R. Reale, N. A. Nodargi, and P. Bisegna, “Numerical investigation of a novel wiring scheme enabling simple and accurate impedance cytometry,” *Micromachines*, vol. 8, no. 9, 2017.
- [44] K. Mahesh, M. Varma, and P. Sen, “Double-peak signal features in microfluidic impedance flow cytometry enable sensitive measurement of cell membrane capacitance,” *Lab Chip*, vol. 20, no. 22, pp. 4296–4309, 2020.
- [45] D. D. Stupin *et al.*, “Bio-Impedance spectroscopy: Basics and applications,” *arXiv*, 2020.
- [46] S. C. Bürgel, C. Escobedo, N. Haandbæk, and A. Hierlemann, “Sensors and Actuators B : Chemical On-chip electroporation and impedance spectroscopy of single-cells,” *Sensors Actuators B. Chem.*, vol. 210, pp. 82–90, 2015.
- [47] S. C. Bürgel, L. Diener, O. Frey, J. Y. Kim, and A. Hierlemann, “Automated, multiplexed electrical impedance spectroscopy platform for continuous monitoring of microtissue spheroids,” *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 22, pp. 10876–10883, 2016.
- [48] V. Viswam *et al.*, “Impedance Spectroscopy and Electrophysiological Imaging of Cells with a High-Density CMOS Microelectrode Array System,” *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.*, vol. 12, no. 6, pp. 1356–1368, 2018.
- [49] K. Chawla *et al.*, “Integrating impedance-based growth-rate monitoring into a microfluidic cell culture platform for live-cell microscopy,” *Microsystems Nanoeng.*, vol. 4, no. 1, 2018.
- [50] J. Dragas *et al.*, “In Vitro Multi-Functional Microelectrode Array Featuring 59 760 Electrodes, 2048 Electrophysiology Channels, Stimulation, Impedance Measurement, and Neurotransmitter Detection Channels,” *IEEE J. Solid-State Circuits*, vol. 52, no. 6, pp. 1576–1590, 2017.
- [51] M. T. Guler and I. Bilican, “Capacitive detection of single bacterium from drinking water with a detailed investigation of electrical flow cytometry,” *Sensors Actuators, A Phys.*, vol. 269, pp. 454–463, 2018.
- [52] J. . lyasele and J. I. David, “The difference between Conductivity , TDS and salinity,” *Int. J. Eng. Res. Rev.*, vol. 3, no. 1, pp. 40–48, 2015.
- [53] J. P. Neves Almeida Silva Baptista, “Sistema Monitorização Subaquática,” 2018.
- [54] M. D. Ward and G. Kaduchak, “Fundamentals of Acoustic Cytometry,” *Curr. Protoc. Cytom.*, vol. 84, no. 1, p. e36, 2018.
- [55] E. De Engenharia, “Universidade do Minho Escola de Engenharia Paulo Jorge Teixeira de Sousa Matriz de sensores em filme fino para medição da pressão no trato gastrointestinal,” 2017.
- [56] Paulo Jorge Teixeira de Sousa, “Estudo e otimização de estruturas em PDMS para dispositivos microfluidicos Paulo Jorge Teixeira de Sousa Setembro de 2011 UMinho | 2011 Estudo e otimização de estruturas em PDMS para dispositivos,” 2011.
- [57] V. C. Pinto, C. F. Araújo, P. J. Sousa, L. M. Gonçalves, and G. Minas, “A low-cost lab-on-a-chip device for marine pH quantification by colorimetry,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 290, no. December 2018, pp. 285–292, 2019.
- [58] V. C. Pinto, P. J. Sousa, V. F. Cardoso, and G. Minas, “Optimized SU-8 processing for low-cost microstructures fabrication without cleanroom facilities,” *Micromachines*, vol. 5, no. 3, pp. 738–755, 2014.
- [59] K. Vasudevamurthy, “CONCRETE PARTICLE CHARACTERIZATION ABSTRACT OF THE THESIS CONCRETE PARTICLE CHARACTERIZATION USING IMPEDANCE CYTOMETRY by KAVYA VASUDEVAMURTHY THESIS DIRECTOR : Dr . Mehdi Javanmard,” no. October, 2018.
- [60] “Gymnodinium catenatum.” [Online]. Available: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/107772>. [Accessed: 19-Jan-2020].
- [61] “Marine Species Identification Portal: Gymnodinium catenatum.” [Online]. Available: [http://species-identification.org/species.php?species\\_group=dinoflagellates&id=62](http://species-identification.org/species.php?species_group=dinoflagellates&id=62). [Accessed:

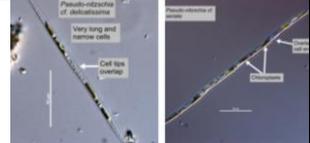
- 19-Jan-2020].
- [62] “Pyrodinium bahamense.” [Online]. Available: [https://naturalhistory2.si.edu/smsfp/irlspec/Pyrodi\\_bahame.htm](https://naturalhistory2.si.edu/smsfp/irlspec/Pyrodi_bahame.htm). [Accessed: 19-Jan-2020].
- [63] L. Morquecho, “Pyrodinium bahamense One the Most Significant Harmful Dinoflagellate in Mexico,” *Front. Mar. Sci.*, vol. 6, Jan. 2019.
- [64] “Marine Species Identification Portal: Alexandrium ostenfeldii.” [Online]. Available: [http://species-identification.org/species.php?species\\_group=dinoflagellates&id=39&menuentry=soorten](http://species-identification.org/species.php?species_group=dinoflagellates&id=39&menuentry=soorten). [Accessed: 19-Jan-2020].
- [65] “WoRMS - World Register of Marine Species - Alexandrium ostenfeldii (Paulsen) Balech & Tangen, 1985.” [Online]. Available: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=109712#images>. [Accessed: 08-Apr-2020].
- [66] J. K. á, “Studies on the cyanophytes (Cyanobacteria, Cyanoprokaryota) of Cuba 11. Freshwater Anabaena species Studie o sinicích (Cyanobacteria, Cyanoprokaryota) Kuby. 11. Sladkovodní druhy rodu Anabaena.”
- [67] R. Brasil and V. Bot, “Cianobactérias de diferentes tipos de lagoas (‘salina’, ‘salitrada’ e ‘baía’) representativas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil 1.”
- [68] “Anabaena - microbewiki.” [Online]. Available: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Anabaena>. [Accessed: 08-Apr-2020].
- [69] H. S. Ryu, R. Y. Shin, and J. H. Lee, “Morphology and taxonomy of the aphanizomenon spp. (cyanophyceae) and related species in the nakdong river, South Korea,” *J. Ecol. Environ.*, vol. 41, no. 1, pp. 1–9, 2016.
- [70] D. Nuzzo *et al.*, “Effects of the aphanizomenon flos-aquae extract (Klamin®) on a neurodegeneration cellular model,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2018, 2018.
- [71] N. Buesing and M. O. Gessner, “Benthic bacterial and fungal productivity and carbon turnover in a freshwater marsh,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 1, pp. 596–605, 2006.
- [72] E. Curren and S. C. Y. Leong, “Lyngbya regalis sp. Nov. (oscillatoriales, cyanophyceae), a new tropical marine cyanobacterium,” *Phytotaxa*, vol. 367, no. 2, pp. 120–132, 2018.
- [73] A. J. Watkinson, J. M. O’Neil, and W. C. Dennison, “Ecophysiology of the marine cyanobacterium, Lyngbya majuscula (Oscillatoriaceae) in Moreton Bay, Australia,” *Harmful Algae*, vol. 4, no. 4, pp. 697–715, 2005.
- [74] “Species Profile - *Cylindrospermopsis raciborskii*.” [Online]. Available: <https://nas.er.usgs.gov/queries/greatlakes/FactSheet.aspx?SpeciesID=2651&Potential=N&Type=0>. [Accessed: 05-Apr-2020].
- [75] “EOS - Phytoplankton Encyclopedia Project.” [Online]. Available: [https://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/diatoms/pennate/pseudonitzschia/pseudonitzschia\\_genus.html](https://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/diatoms/pennate/pseudonitzschia/pseudonitzschia_genus.html). [Accessed: 09-Apr-2020].
- [76] N. Raho, G. Pizarro, L. Escalera, B. Reguera, and I. Marín, “Morphology, toxin composition and molecular analysis of *Dinophysis ovum* Schütt, a dinoflagellate of the ‘*Dinophysis acuminata* complex,’” *Harmful Algae*, vol. 7, no. 6, pp. 839–848, 2008.
- [77] “EOS - Phytoplankton Encyclopedia Project.” [Online]. Available: [https://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/dinoflagellates/dinophysis/d\\_acuminata.html](https://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/dinoflagellates/dinophysis/d_acuminata.html). [Accessed: 24-Jan-2020].
- [78] “WoRMS - World Register of Marine Species - *Dinophysis ovum* (F.Schütt) T.H.Abé.” [Online]. Available: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=646201>. [Accessed: 09-Apr-2020].
- [79] “EOS - Phytoplankton Encyclopedia Project.” [Online]. Available:

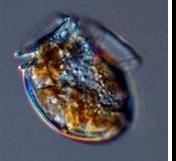
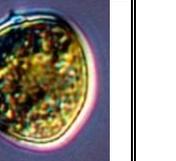
- [https://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/dinoflagellates/dinophysis/d\\_fortii.html](https://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/dinoflagellates/dinophysis/d_fortii.html). [Accessed: 25-Jan-2020].
- [80] “Marine Species Identification Portal : Prorocentrum lima.” [Online]. Available: [http://species-identification.org/species.php?species\\_group=dinoflagellates&id=89](http://species-identification.org/species.php?species_group=dinoflagellates&id=89). [Accessed: 25-Jan-2020].
- [81] “WoRMS - World Register of Marine Species - Prorocentrum lima (Ehrenberg) F.Stein, 1878.” [Online]. Available: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=110301>. [Accessed: 09-Apr-2020].
- [82] “EOS - Phytoplankton Encyclopedia Project.” [Online]. Available: [https://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/dinoflagellates/prorocentrum/p\\_minimum.html](https://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/dinoflagellates/prorocentrum/p_minimum.html). [Accessed: 25-Jan-2020].
- [83] “Prorocentrum minimum.” [Online]. Available: [https://naturalhistory2.si.edu/smsfp/irlspec/Proroc\\_minimum.htm](https://naturalhistory2.si.edu/smsfp/irlspec/Proroc_minimum.htm). [Accessed: 09-Apr-2020].
- [84] “EOS - Phytoplankton Encyclopedia Project.” [Online]. Available: [https://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/dinoflagellates/alexandrium/a\\_tamarense.html](https://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/dinoflagellates/alexandrium/a_tamarense.html). [Accessed: 18-Jan-2020].
- [85] “Alexandrium minutum.” [Online]. Available: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/107755>. [Accessed: 14-Apr-2020].
- [86] U. Tillmann, M. Elbrächter, B. Krock, U. John, and A. Cembella, “Azadinium spinosum gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins,” *Eur. J. Phycol.*, vol. 44, no. 1, pp. 63–79, Feb. 2009.
- [87] “WoRMS - World Register of Marine Species - Azadinium spinosum Elbrächter & Tillmann, 2009.” [Online]. Available: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=391509>. [Accessed: 09-Apr-2020].
- [88] T. Jauffrais, V. Séchet, U. Tillman, B. Krock, Z. Amzil, and P. Hess, “Growth and toxin production of Azadinium spinosum in batch and continuous culture,” 2010.
- [89] “EOS - Phytoplankton Encyclopedia Project.” [Online]. Available: [https://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/dinoflagellates/dinophysis/d\\_acuta.html](https://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/dinoflagellates/dinophysis/d_acuta.html). [Accessed: 24-Jan-2020].

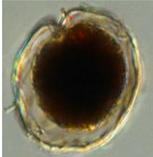
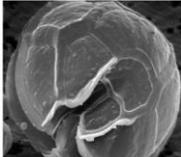
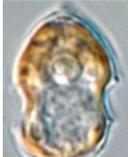
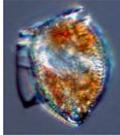
# ANEXO I – PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DAS ESPÉCIES

## DE FITOPLÂNCTON

Espécie		<i>Gymnodinium catenatum</i> [60][61]	<i>Pyrodinium bahamense</i> [62], [63]	<i>Alexandrium ostenfeldii</i> [64], [65]	<i>Anabaena</i> [66]–[68]	<i>Aphanizomenon</i> [69], [70]
Descrição	Classificação	Dinoflagelado	Dinoflagelado	Dinoflagelado	Cinobactéria	Cinobactéria
	Forma	Pequenas em forma de ovo	Poliédricas e meio redondas	Quase esféricas com tamanho médio	Retos, curvos ou espirais	Cilindros ou em forma de barril
	Tamanho	Comprimento: 34 µm - 65 µm Largura: 27 µm - 43 µm	Comprimento: 47 µm - 84 µm Largura: 35 µm - 64 µm	Comprimento: 40 µm - 56 µm Largura: 40 µm - 50 µm	Diâmetro: 2 µm - 10 µm	Comprimento: 4 µm - 9 µm Largura: 2 µm - 4 µm
	Cor	Vermelho-Castanho Ou Amarelo – Castanho	Verde-Amarelo	Castanho-Vermelho	Azul - Verde	Verde – Azul
Comportamento	Estilo de Vida	É um dinoflagelado fotossintético. Reproduz-se assexuadamente por fissão binária e sexualmente através de gametas diferentes (Heterogamia)	É um dinoflagelado fotossintético. Reproduz-se sexualmente através da união de gametas	É um dinoflagelado fotossintético. Reproduz-se assexuadamente por fissão binária e sexualmente por isogamia (gametas masculinos e femininos iguais)	É uma bactéria fotossintética. Reproduz-se assexuadamente.	É uma bactéria fotossintética.
	Florescimento	Em águas costeiras quentes e temperadas. (também se adaptam a águas frias)	Em águas quentes (climas tropicais e subtropicais)	Em águas costeiras frias	Em águas rasas e em solo húmido Águas doces	Águas doces
	Efeitos Tóxicos	Produz toxinas paralisantes (PSP)	Produz toxinas paralisantes (PSP)	Produz toxinas paralisantes (PSP)	Produz toxinas paralisantes (PSP)	Produz toxinas paralisantes (PSP)
Distribuição	Habitat	Estuários Águas costeiras (Calmas sem correntes)	Estuários Águas costeiras	Estuários	Lagos Águas doces	Água doce e salobra Lagos
	Geográfico	México Argentina Europa Austrália Japão	Golfo da Califórnia Golfo do México Mar do Caribe	Costa da Europa Ocidental; Costa sudoeste da Nova Escócia	Índia América Alemanha	Mar Báltico Grandes Lagos
	Estação	–	Verão	Primavera e Verão	Verão	Inverno e Verão
Condições de Crescimento	Temperatura	12°C - 30°C	20°C - 35°C	12,5°C – 25,2°C	12°C – 20°C	22°C – 28°C
	Salinidade	28 ppt – 32ppt	20 ppt – 35ppt	5 ppt – 21 ppt	1,4 ppt – 11,8 ppt	–
Identidade						

<i>Espécie</i>		<i>Plankthotrix</i> [71]	<i>Lyngbya</i> [72], [73]	<i>Cylindrospermopsis</i> [66], [69], [74]	<i>Pseudo-nitzschia</i> [75]
<i>Descrição</i>	<i>Classificação</i>	Cinobactéria	Cinobactéria	Cinobactéria	Diatomácea
	<i>Forma</i>	Trícomas longos e não ramificados (filamentos)	Células discoides empilhadas umas em cima das outras	Filamentos encadeados (cilíndricas e ovais)	Estreita e em forma de barco
	<i>Tamanho</i>	Comprimento: 2 µm - 3 µm Largura: 3 µm - 9 µm	Comprimento: 8 µm - 51 µm Largura: 1 µm - 10 µm	Comprimento: 5 µm - 16 µm Largura: 2 µm - 5 µm	Comprimento: 25 µm - 160 µm Largura: 0,5 µm - 8 µm
	<i>Cor</i>	Azul - Verde	Azul - Verde	Azul - Verde	Amarelo - Castanho
<i>Comportamento</i>	<i>Estilo de Vida</i>	É uma bactéria fotossintética.	É uma bactéria fotossintética. Reproduz-se assexuadamente	É uma bactéria fotossintética.	Realiza a fotossíntese. Reproduz-se sexual e assexuadamente.
	<i>Florescimento</i>	Crescem na profundidade dos Lagos	Em água doce e especialmente nas águas de nascente (climas tropicais e subtropicais)	Desencadeado por temperaturas frias ou grandes flutuações de temperatura (climas tropicais e subtropicais)	Em águas rasas junto a costa.
	<i>Efeitos Tóxicos</i>	Produz toxinas paralisantes (PSP)	Produz toxinas paralisantes (PSP)	Produz toxinas paralisantes (PSP)	Produz toxinas amnésicas (ASP)
<i>Distribuição</i>	<i>Habitat</i>	Lagoas Reservatórios de água doce	Águas Costeiras Estuários	Lagoas	Oceanos Água doce Solos Húmidos
	<i>Geográfico</i>	Zurique Portugal	Austrália Flórida Costa da Singapura	América de Sul	Em várias partes do mundo.
	<i>Estação</i>	—	—	Inverno	Primavera e Outono
<i>Condições de Crescimento</i>	<i>Temperatura</i>	5°C - 25°C	5°C - 50°C	15°C - 35°C	-2°C - 29°C
	<i>Salinidade</i>	—	9 ppt - 36 ppt	Tolerância de 4 ppt	18 ppt - 38 ppt
<i>Identidade</i>					

Espécie		<i>Dinophysis acuminata</i> [76], [77]	<i>Dinophysis ovum</i> [76], [78]	<i>Dinophysis fortii</i> [79]	<i>Prorocentrum lima</i> [80], [81]	<i>Prorocentrum cordatum</i> [82], [83]
Descrição	Classificação	Dinoflagelado	Dinoflagelado	Dinoflagelado	Dinoflagelado	Dinoflagelado
	Forma	Em forma de concha (Oval)	Forma de ovo	Em forma de concha	Oval	Coração
	Tamanho	Comprimento: 30 µm - 35 µm Diâmetro: 38 µm - 58 µm	Comprimento: 32 µm - 42 µm Diâmetro: 22,5 µm - 32 µm	Comprimento: 62 µm - 66 µm Largura: 41 µm - 58 µm	Comprimento: 32 µm - 50 µm Largura: 20 µm - 28 µm	Comprimento: 6,6 µm - 20 µm Largura: 5 µm - 16 µm
	Cor	Castanho-Avermelhado	Dourada	Castanho - Vermelho	Dourado - Castanho	Dourado - Castanho
Comportamento	Estilo de Vida	É um dinoflagelado fotossintético e quimiossintético. Reproduz-se assexuada por fissão binária.	É um dinoflagelado fotossintético e quimiossintético. Reproduz-se assexuada por fissão binária.	É um dinoflagelado fotossintético. Reproduz-se assexuada por fissão binária.	É um dinoflagelado fotossintético. Reproduz-se assexuada por fissão binária.	É um dinoflagelado fotossintético e quimiossintético. Reproduz-se assexuada por fissão binária.
	Florescimento	Em áreas protegidas e fechadas	Em zonas costeiras com temperatura temperada	Muito abundante no Verão	Em climas temperados e tropicais	Normalmente em Estuários
	Efeitos Tóxicos	Produz ácido ocadáico, dinofisitoxinas + pectenotoxinas (DSP)	Produz ácido ocadáico, dinofisitoxinas + pectenotoxinas (DSP)	Produz ácido ocadáico, dinofisitoxinas + pectenotoxinas (DSP)	Produz ácido ocadáico, dinofisitoxinas + pectenotoxinas (DSP)	Produz ácido ocadáico, dinofisitoxinas + pectenotoxinas (DSP)
Distribuição	Habitat	E zonas neríticas	Em zonas costeiras	Em zonas neríticas e nos oceanos	Zonas neríticas Estuários	Estuários Águas Costeiras Águas Salobras
	Geográfico	Em temperadas quentes e frias por todo o mundo	Galiza Grécia Texas	Águas mornas e tropicais de todo o mundo	Por todo o mundo	Por todo o mundo
	Estação	Final da Primavera até o Verão	Da Primavera ao Outono	Primavera tardia até ao Verão	Verão	Verão
Condições de Crescimento	Temperatura	12°C - 22°C	≈12°C - 22°C	≈ 13°C	≈ 24°C	20°C - 24°C
	Salinidade	28 ppt - 34,5 ppt	28 ppt - 34,5 ppt	≈ 34 ppt	≈ 19 ppt	10 ppt - 16 ppt
Identidade						

<i>Espécie</i>		<i>Alexandrium Tamarense</i> [84]	<i>Alexandrium Minutum</i> [85]	<i>Azadinium spinozum</i> [86]–[88]	<i>Dinophysis acuta</i> [76], [89]
<i>Descrição</i>	<i>Classificação</i>	Dinoflagelado	Dinoflagelado	Dinoflagelado	Dinoflagelado
	<i>Forma</i>	Esférica	Esférica e pequenas	Em forma de concha	Esférica
	<i>Tamanho</i>	Comprimento: 22µm - 51µm Largura: 17µm - 44µm	Comprimento: 28µm - 35µm Largura: 20µm - 30µm	Comprimento: 54 µm - 94 µm Diâmetro: 43 µm - 60 µm	Comprimento: 12 µm - 16 µm Largura: 7 µm - 11 µm
	<i>Cor</i>	Laranja - castanho	Verde - castanho	Laranja - avermelhado - Castanho	Verde - Amarelo
<i>Comportamento</i>	<i>Estilo de Vida</i>	É um dinoflagelado fotossintético. Reproduz-se assexuadamente por fissão binária e sexualmente através da união de gametas diferentes.	É um dinoflagelado fotossintético. Reproduz-se assexuadamente por fissão binária e sexualmente através da união de gametas diferentes.	É um dinoflagelado fotossintético. Reproduz-se assexuada por fissão binária.	É um dinoflagelado fotossintético
	<i>Florescimento</i>	Em águas costeiras salgadas e em grandes estuários.	Em águas quentes temperadas e em águas doces.	Nos verões quentes, Invernos secos e fortes primaveras.	Em águas costeiras
	<i>Efeitos Tóxicos</i>	Produz toxinas paralisantes (PSP)	Produz toxinas paralisantes (PSP)	Produz ácido ocadáico, dinofisotoxinas + pectenotoxinas (DSP)	Produz azaspirácidos (AZP)
<i>Distribuição</i>	<i>Habitat</i>	Águas Costeiras frias Estuários Baías Restritas	Lagoas Estuários	Oceano	Em águas costeiras
	<i>Geográfico</i>	Norte da América Europa Japão	Ásia África Norte da América América Central e Caribe Europa Oceânia	Águas frias em todo o mundo	Europa África América do Sul Japão
	<i>Estação</i>	Verão (Julho - Agosto)	Primavera	Primavera e Verão	Verão
<i>Condições de Crescimento</i>	<i>Temperatura</i>	-2°C - 28°C	15°C - 25°C	—	≈ 18°C
	<i>Salinidade</i>	20,8 ppt - 29,5ppt	15 ppt - 35ppt	—	30 ppt-40ppt
<i>Identidade</i>					

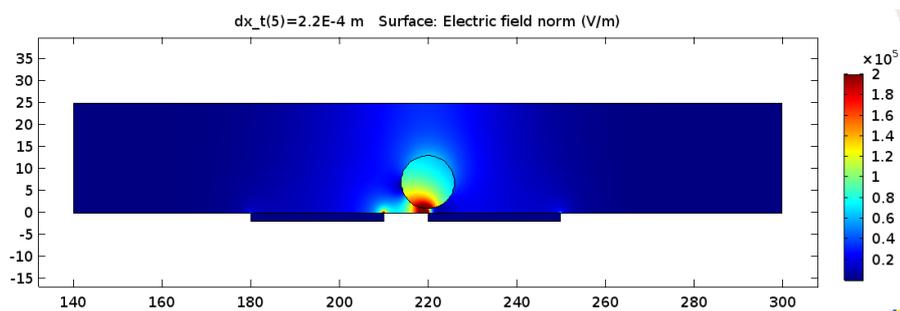
## ANEXO II – CAMPOS ELÉTRICOS E LINHAS DE CORRENTE FORMADOS PELA PASSAGEM DA PARTÍCULA

### Dois Eléttodos

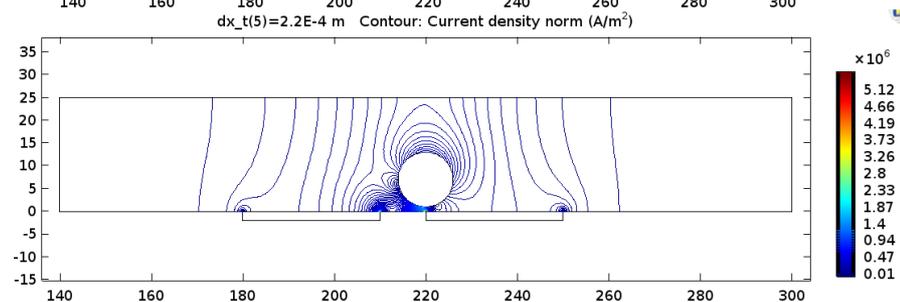
30  $\mu\text{m}$  de largura espaçados de 10  $\mu\text{m}$

Partícula de 6  $\mu\text{m}$  de raio

**Campo Eléttico**

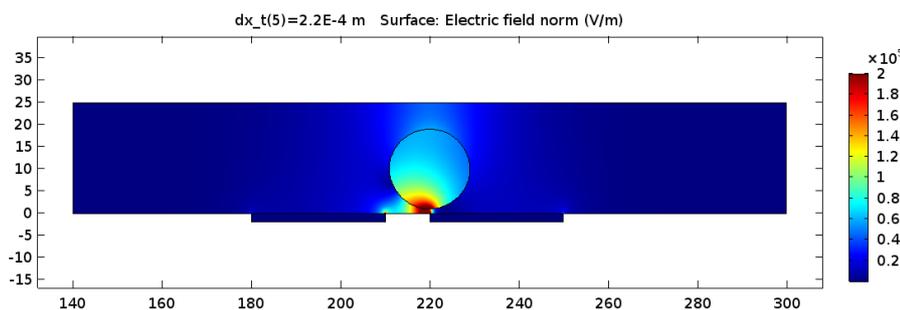


**Linhas de Corrente**

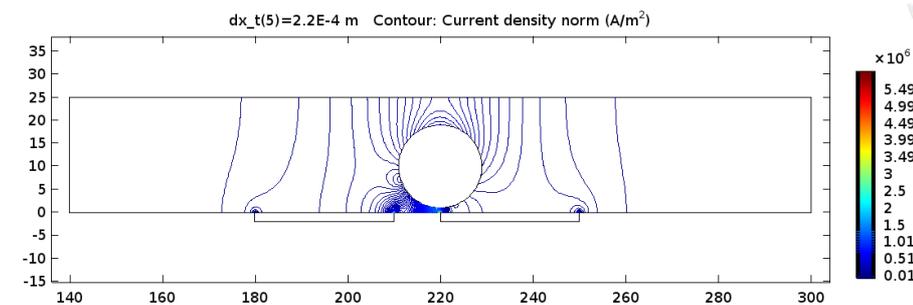


Partícula de 9  $\mu\text{m}$  de raio

**Campo Eléttico**



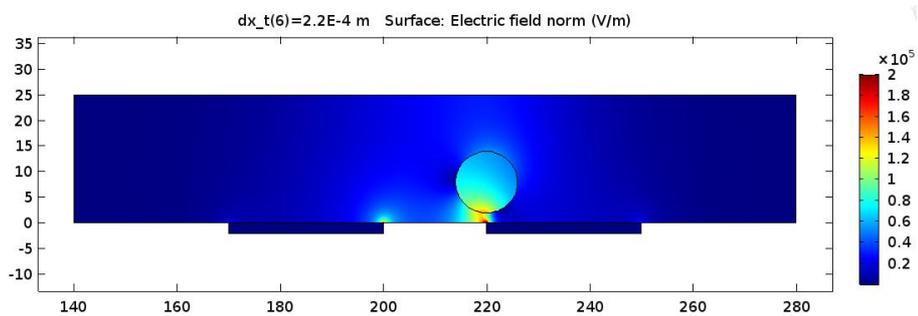
**Linhas de Corrente**



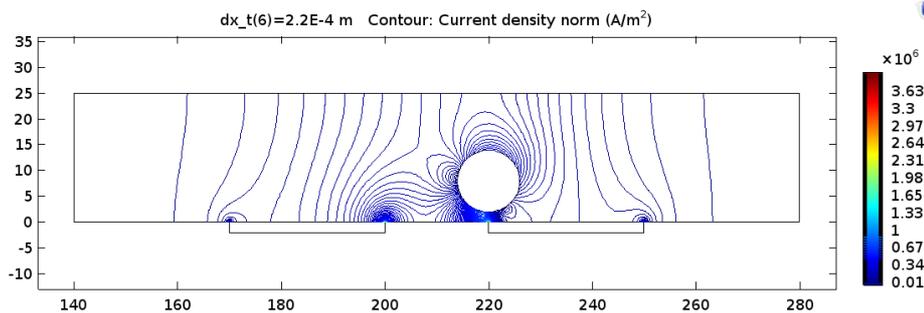
30 μm de largura espaçados de 20 μm

Partícula de 6 μm de raio

**Campo Elétrico**

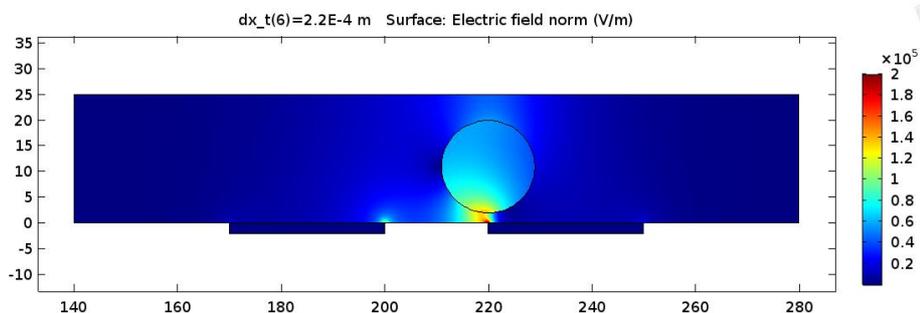


**Linhas de Corrente**

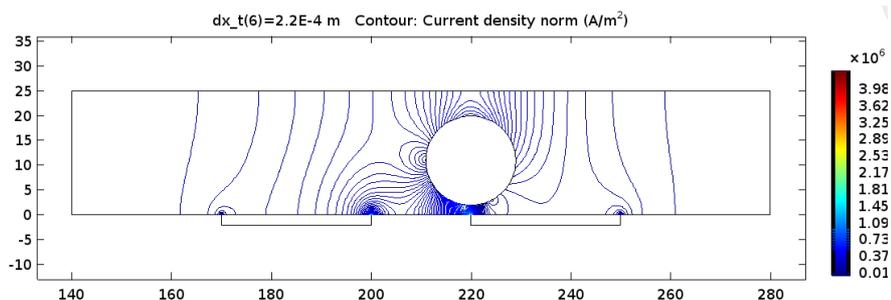


Partícula de 9 μm de raio

**Campo Elétrico**



**Linhas de Corrente**

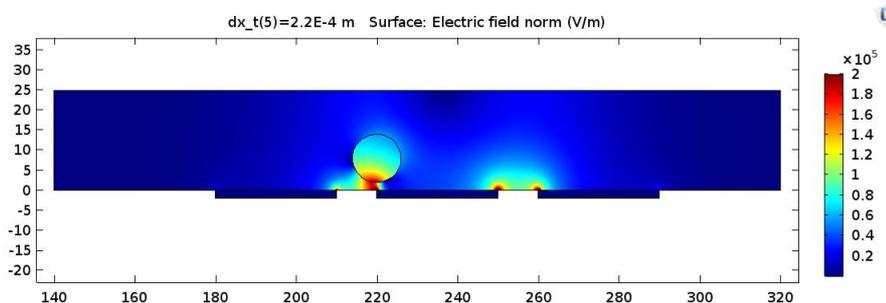


**Três Eléttodos**

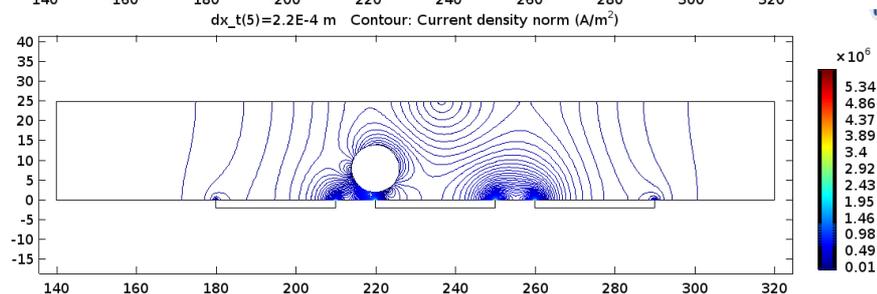
30 μm de largura espaçados de 10 μm

Partícula de 6 μm de raio

**Campo Eléttico**

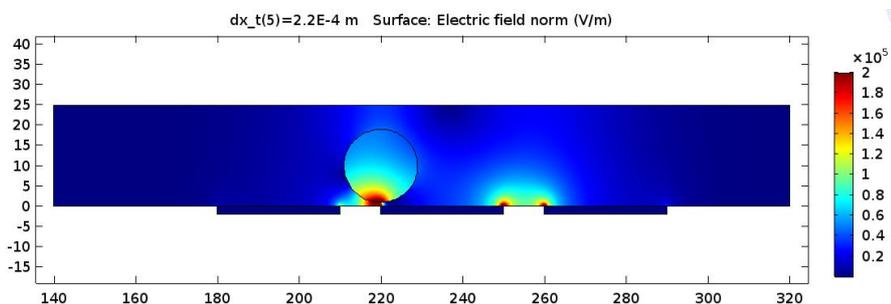


**Linhas de Corrente**

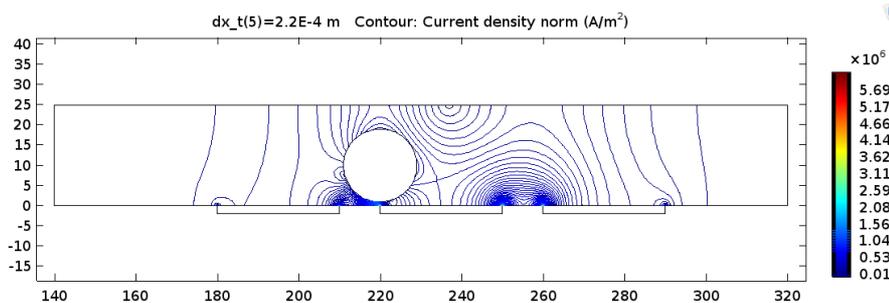


Partícula de 9 μm de raio

**Campo Eléttico**



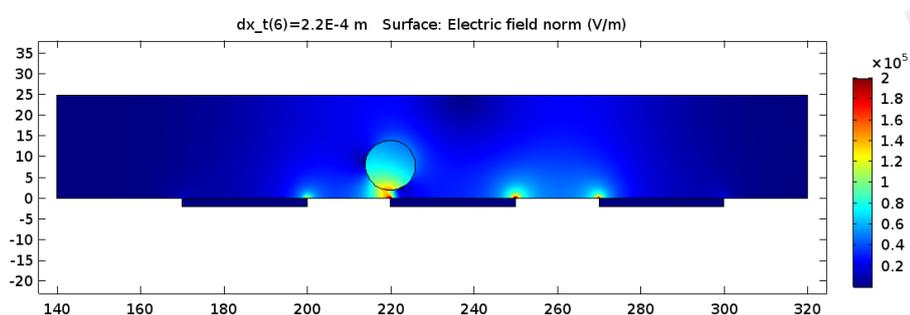
**Linhas de Corrente**



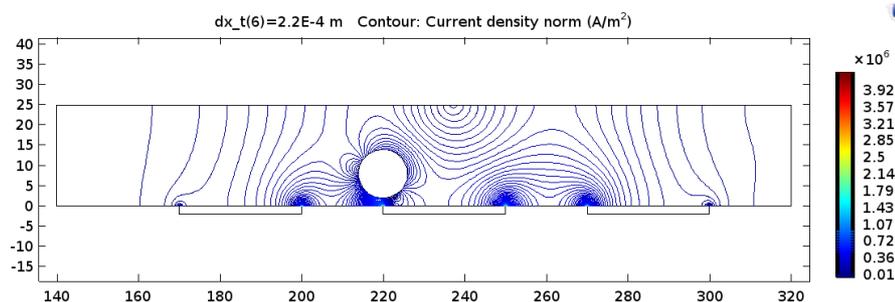
30 μm de largura espaçados de 20 μm

Partícula de 6 μm de raio

**Campo Elétrico**

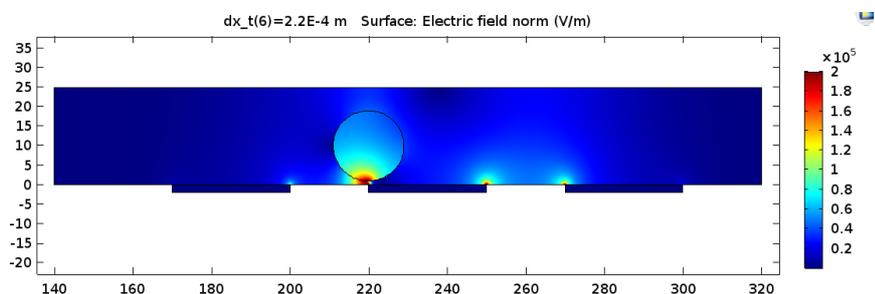


**Linhas de Corrente**

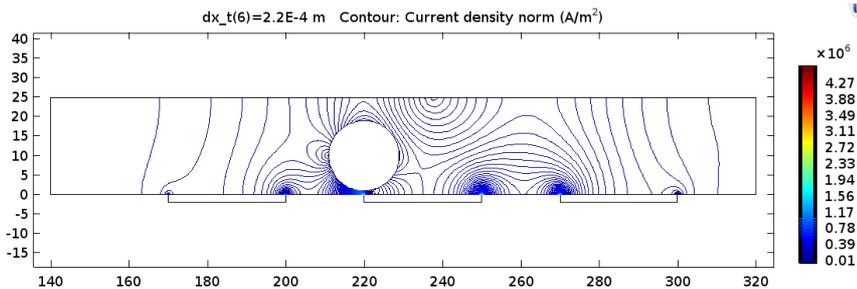


Partícula de 9 μm de raio

**Campo Elétrico**



**Linhas de Corrente**

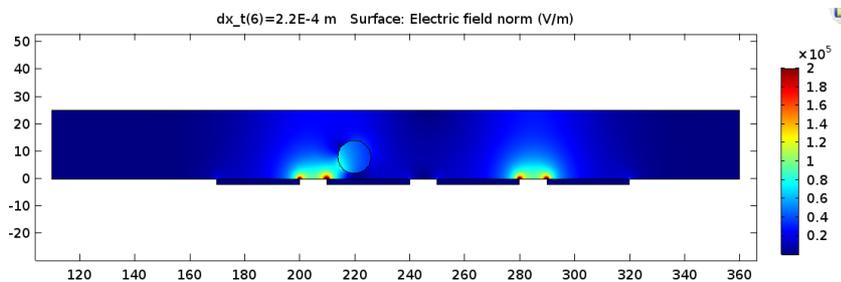


**Quatro Eléttodos**

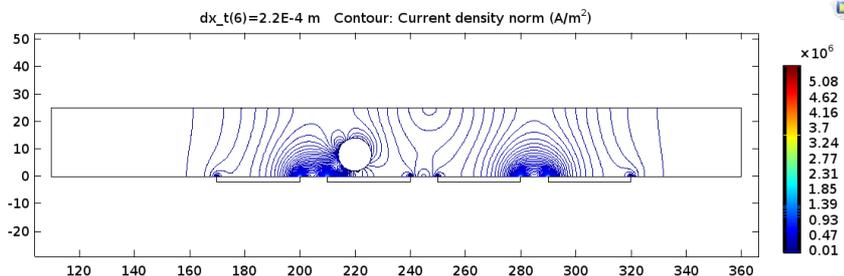
30 μm de largura espaçados de 10 μm

Partícula de 6 μm de raio

**Campo Eléttico**

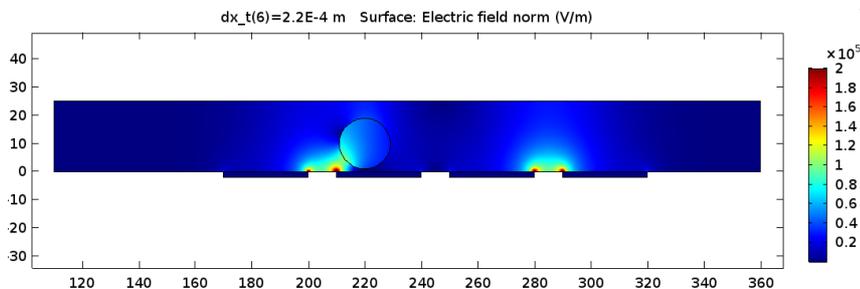


**Linhas de Corrente**

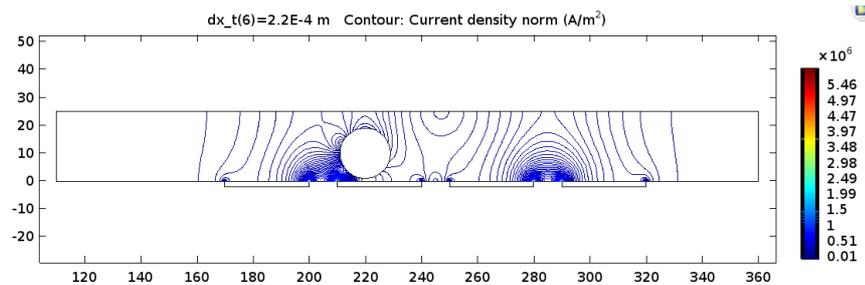


Partícula de 9 μm de raio

**Campo Eléttico**



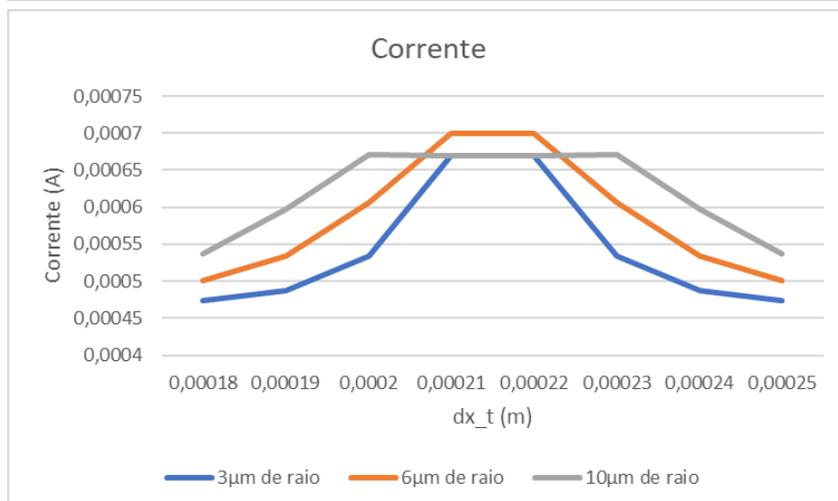
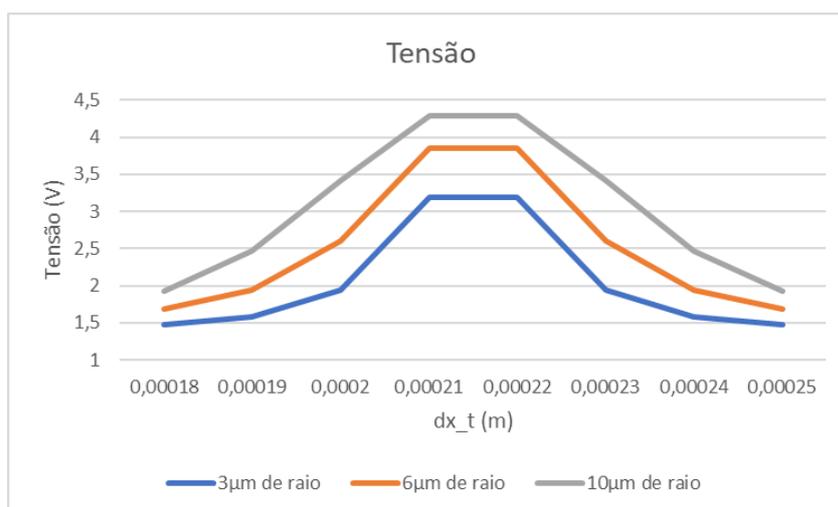
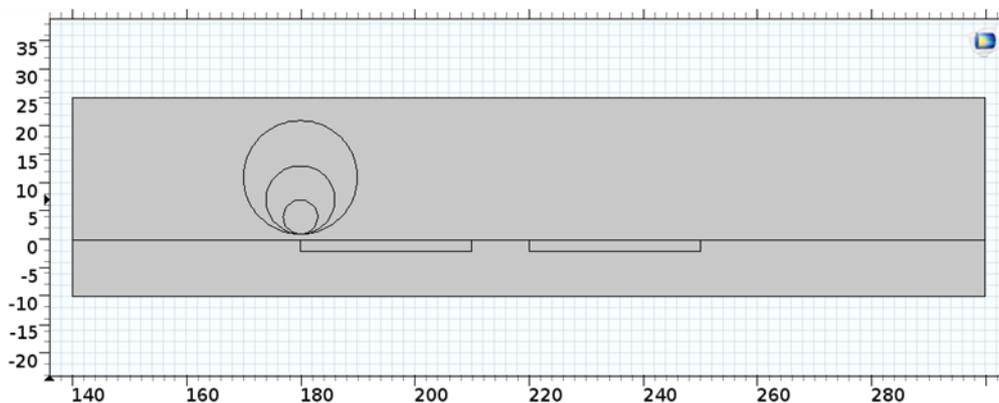
# Linhas de Corrente

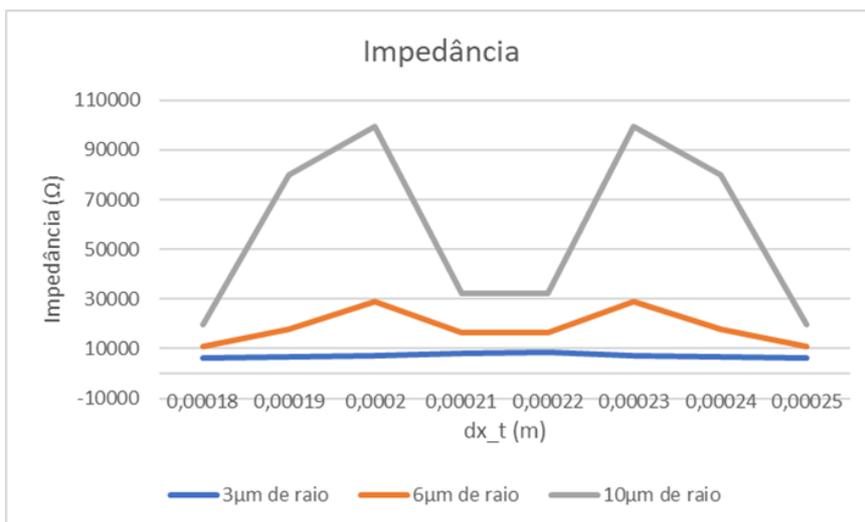


## ANEXO III – SIMULAÇÕES COM MAIS PARTÍCULAS

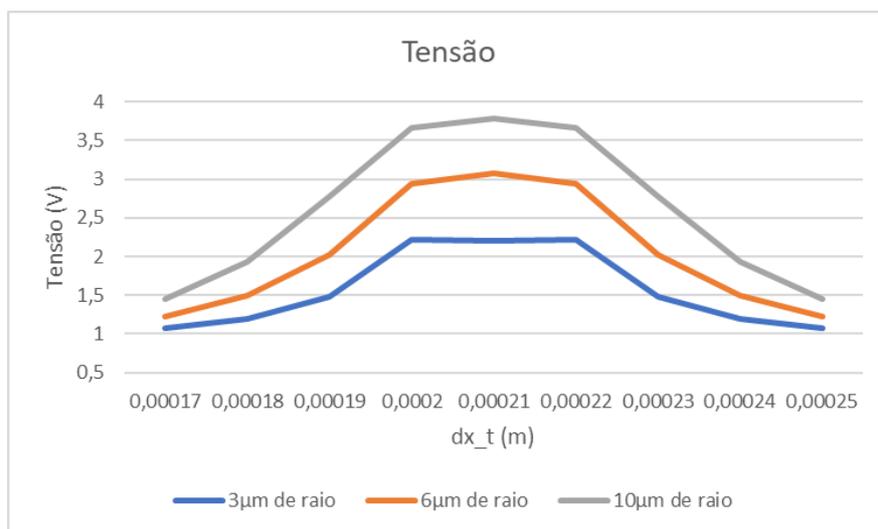
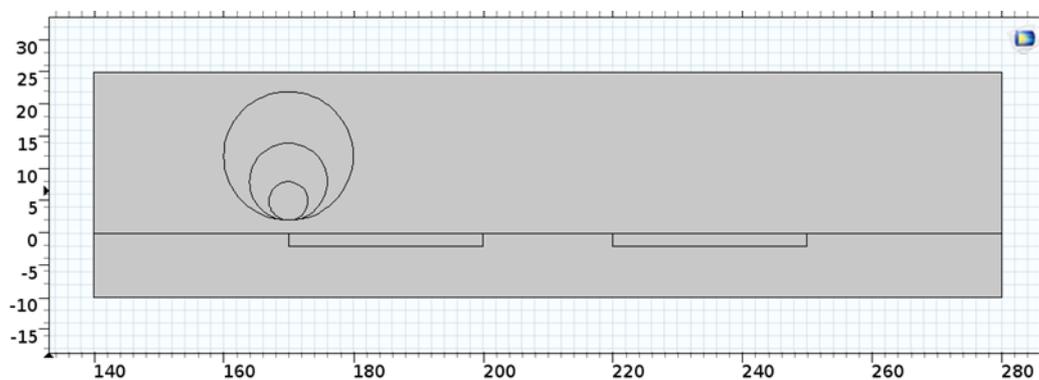
### Dois Eléttodos

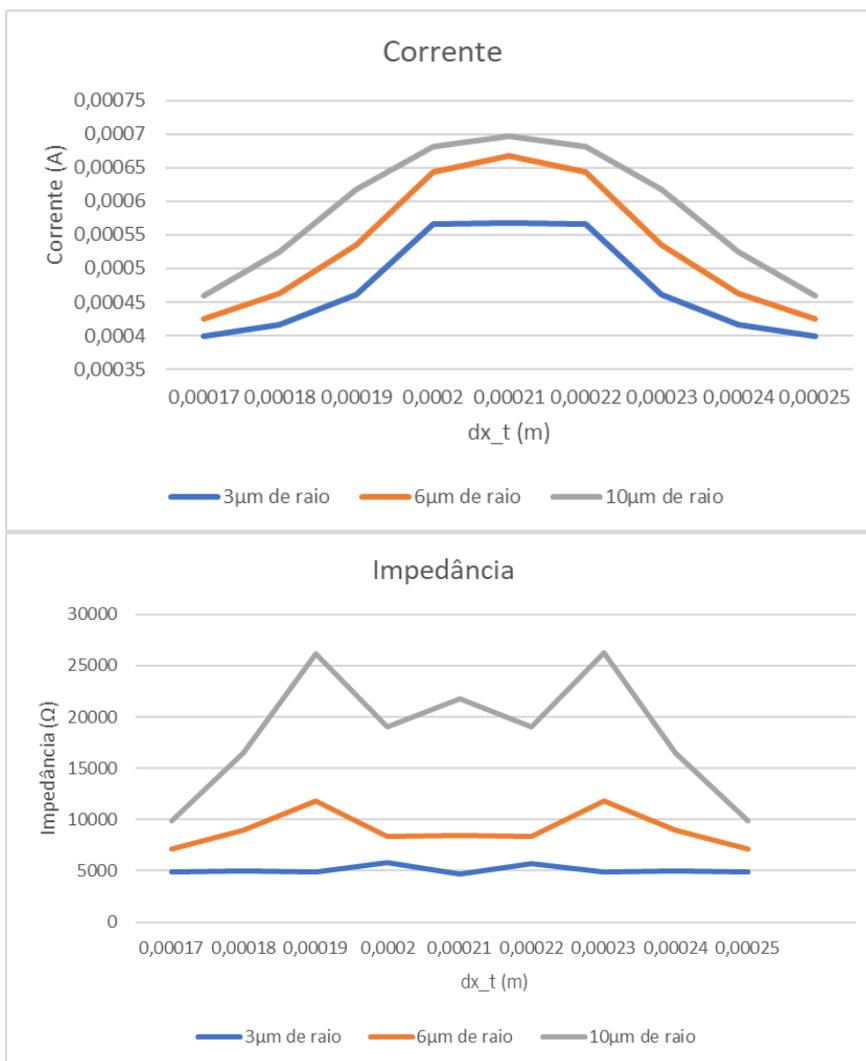
30  $\mu\text{m}$  de largura espaçados de 10  $\mu\text{m}$





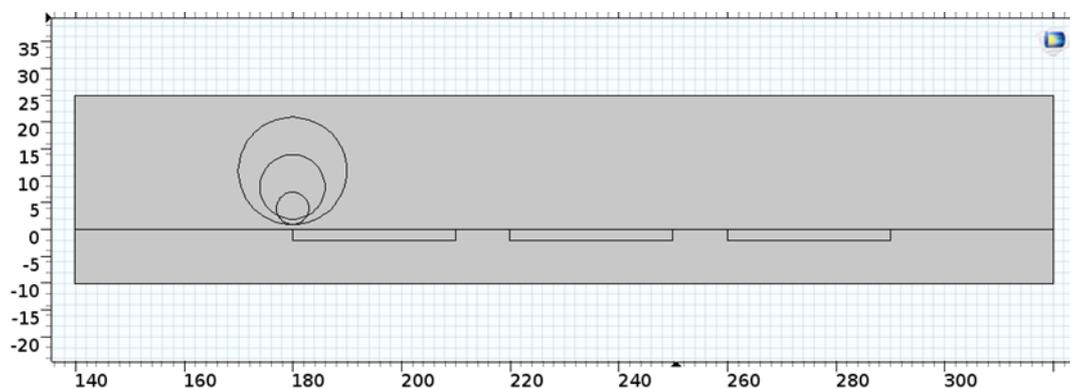
30 μm de largura espaçados de 20 μm

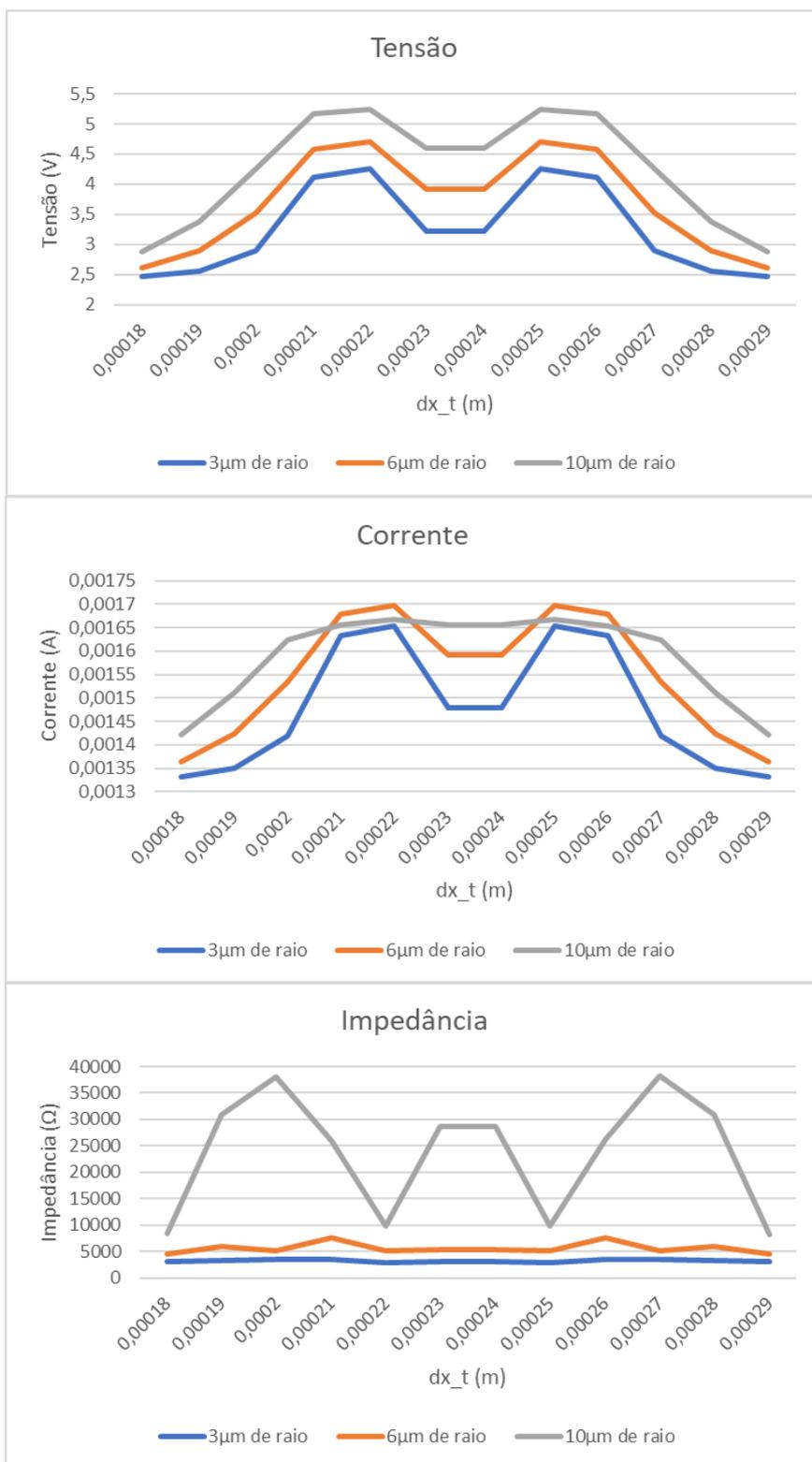




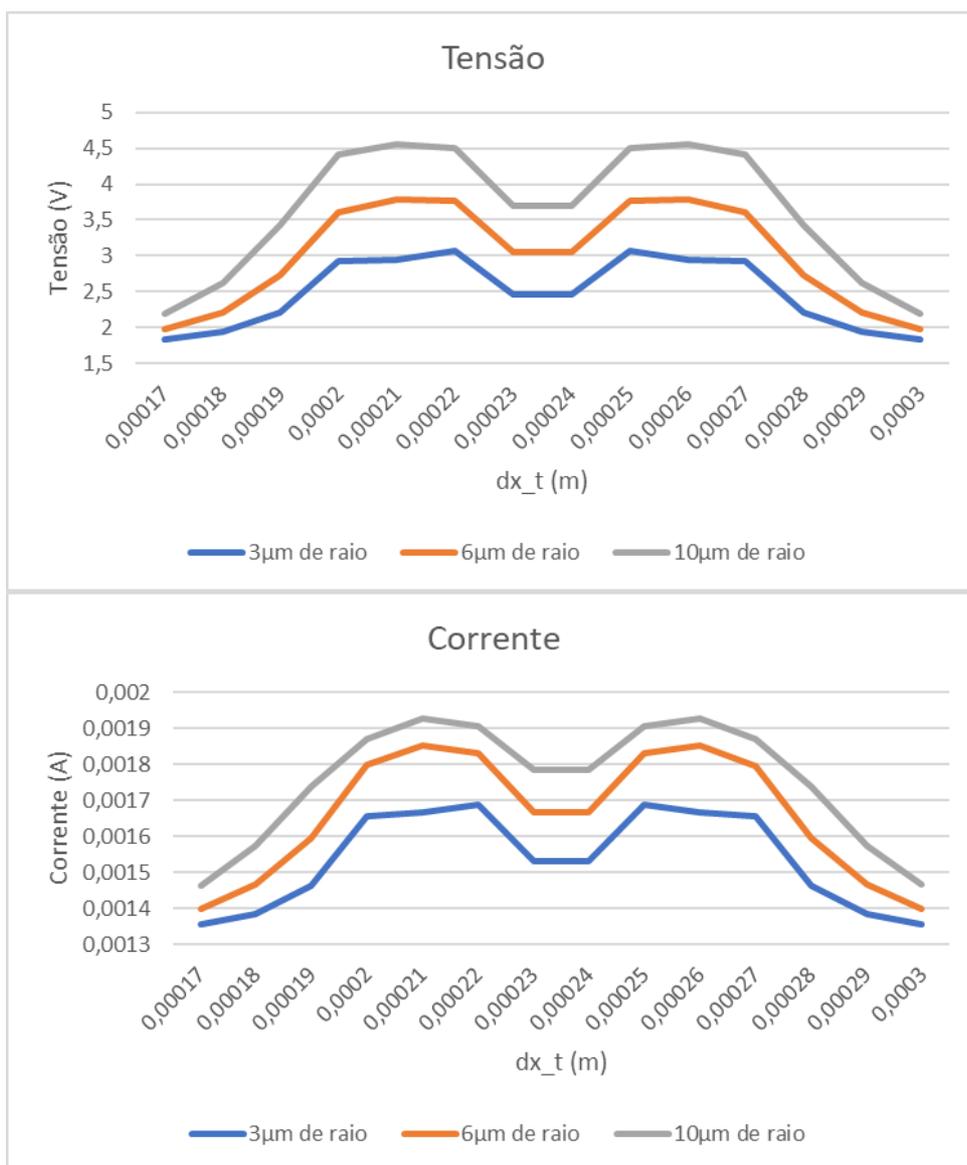
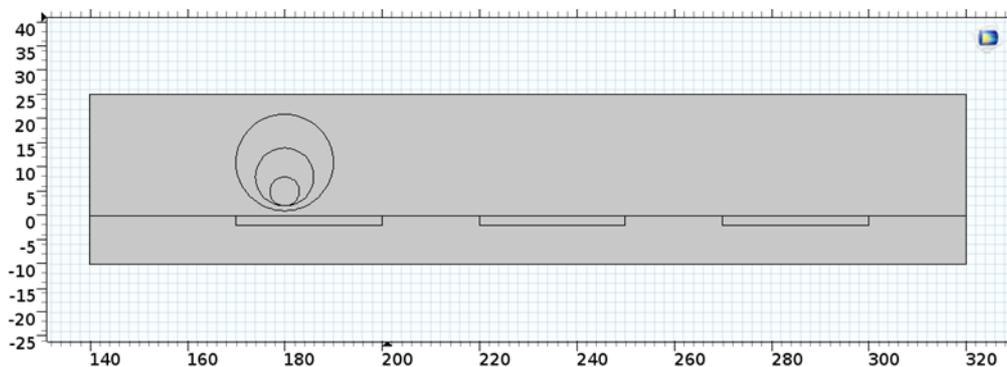
## Três Elétrodos

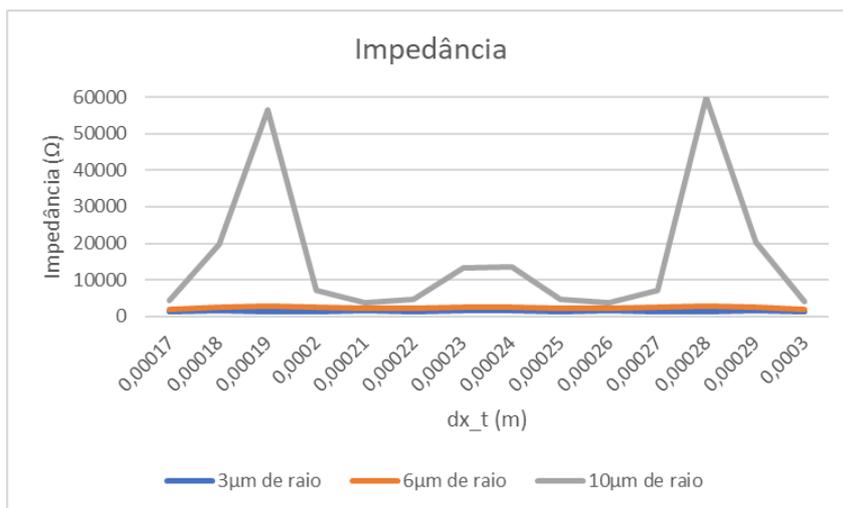
30 µm de largura espaçados de 10 µm





30  $\mu\text{m}$  de largura espaçados de 20  $\mu\text{m}$





## Quatro Elétrodos

30 μm de largura espaçados de 10 μm

