



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Susana Oliveira Catarino

**Estudo da Eficiência da Aplicação da
Microagitação Acústica, Baseada no Polímero
Beta-PVDF, no Processo de Mistura de Fluidos
Biológicos em Exames Clínicos Não Rotineiros**



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Susana Oliveira Catarino

**Estudo da Eficiência da Aplicação da
Microagitação Acústica, Baseada no Polímero
Beta-PVDF, no Processo de Mistura de Fluidos
Biológicos em Exames Clínicos Não Rotineiros**

Mestrado em Engenharia Biomédica

Trabalho efectuado sob a orientação da
Professora Doutora Graça Maria Henriques Minas

Setembro de 2009

De acordo com a legislação em vigor não é permitida a consulta e reprodução desta tese

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

Aos meus pais e aos meus irmãos.

Agradecimentos

Agradeço à Doutora Graça Minas, do Departamento de Electrónica Industrial, pela orientação proporcionada ao longo do ano de trabalho, bem como o acompanhamento constante, as sugestões e discussões, fundamentais para a elaboração deste trabalho.

Ao Doutor Senentxu Lanceros-Méndez, do Departamento de Física, pelo empenho demonstrado, trocas de ideias e sugestões.

Ao Doutor Fernando Mota Garcia, Director Técnico do Serviço de Patologia Clínica do Hospital São Marcos em Braga, pelas explicações técnicas.

À Vanessa Cardoso pela disponibilidade sempre demonstrada, pela ajuda na resolução das dúvidas e problemas que foram surgindo e pelos conselhos que deu ao longo de todo o trabalho.

Ao Pedro Martins pela ajuda permanente e pela disponibilidade aquando do trabalho laboratorial realizado no Departamento de Física.

À família agradeço o apoio e o incentivo que sempre mostraram.

Aos amigos agradeço, essencialmente, a amizade e o estímulo que sempre me garantiram, bem como as dicas sempre que alguma dúvida ia surgindo. Obrigada por estarem sempre por perto!

Resumo

A necessidade de diagnósticos rápidos, com elevada fiabilidade e baixo custo é, actualmente, um dos principais desafios da saúde, principalmente em exames clínicos não rotineiros, realizados com baixa frequência, nos quais é necessário o funcionamento do equipamento com uma produtividade reduzida. O desenvolvimento de dispositivos miniaturizados integrados num único chip responde a este problema, permitindo a quantificação com elevada sensibilidade, repetibilidade e precisão de várias biomoléculas clinicamente relevantes. Um requisito essencial destes microssistemas passa pela integração de um sistema de mistura, de forma a melhorar a mistura dos fluidos. Uma solução interessante recai na integração no microssistema da técnica de microagitação acústica gerada por transdutores piezoeléctricos. O objectivo deste trabalho é, por isso, estudar a eficiência e a optimização da microagitação acústica recorrendo ao polímero piezoeléctrico Poli(Fluoreto de Vinilideno) – PVDF, na sua fase β , para volumes de fluidos muito reduzidos (próximos de 1 μ l). Na reacção dos fluidos envolvidos na detecção de ácido úrico e nitrito, estudou-se ainda o aquecimento gerado pelo fenómeno de microagitação acústica, e o seu papel na optimização das reacções.

Concluiu-se, com a execução deste trabalho, que o uso da técnica de microagitação acústica baseada no polímero β -PVDF é uma boa opção para promover a mistura e consequente reacção dos fluidos, sendo a sua eficiência tanto melhor quanto maior a amplitude do sinal de actuação. Verificou-se ainda que a maior energia acústica transferida para o fluido e, consequentemente, a maior eficiência obtida na mistura ocorre quando o filme de β -PVDF é colocado a vibrar à sua frequência de ressonância. Pôde também concluir-se que a contribuição do aquecimento na reacção, gerado pelo uso do β -PVDF, é dependente dos fluidos envolvidos e do efeito da temperatura nas suas propriedades físicas.

Através do trabalho realizado, foi possível avaliar o contributo da microagitação acústica para a mistura de fluidos envolvidos na detecção de magnésio, nitrito e ácido úrico, confirmando-se assim a sua aptidão para ser aplicada na detecção de várias biomoléculas com elevada importância em diagnóstico clínico.

Abstract

The need for immediate diagnoses, with high reliability and low costs, is currently one of the major health challenges, especially in non-routine clinical analysis, performed with a low frequency, which require the operation of equipments with a low producibility. The development of miniaturized devices, integrated in a single – chip, can be a solution to this problem, allowing the quantification of several biomolecules with clinical relevance, and results with high sensitivity, repeatability and precision. A key requirement of these microsystems is the integration of a streaming system, which would be a valuable tool for improving the mixing of fluids. An interesting solution could be the integration into microsystems of acoustic streaming, generated through the use of piezoelectric transducers. Therefore, the main objective of this work is to study the efficiency and the optimization of acoustic streaming using the Poli(vinylidene fluoride) – PVDF piezoelectric polymer, in its β phase, for very small volumes of fluids (around 1 μ l). For the uric acid and nitrite reactions, it was also investigated the heat generated by the phenomenon of acoustic streaming and its role in the reactions optimization.

It was proved that the use of acoustic streaming based on β -PVDF polymer is a good option to promote mixing and consequently the fluids reaction, and the efficiency is better as the amplitude of the actuation signal increases. In addition, it was found that the maximum acoustic energy transferred to the fluid and, consequently, the maximum efficiency in the mixture occurs when the β -PVDF film is vibrating at the resonance frequency. Furthermore, it could be concluded that the contribution of heating for the reaction, generated by the use of β -PVDF, is dependent on the involved fluids and on the temperature effects on its physical properties.

Through the work, it was possible to evaluate the contribution of the acoustic streaming for mixing fluids in reactions of magnesium, nitrite and uric acid detection, confirming its ability to be applied in the detection of several biomolecules that have high importance in clinical diagnosis.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Enquadramento do trabalho	1
1.2. Objectivos	4
1.3. Descrição do trabalho	4
1.4. Organização da dissertação	5
2. Análise de fluidos biológicos	7
2.1. Biomoléculas nos fluidos biológicos	7
2.2. Técnica experimental: Espectrofotometria por absorção óptica	21
3. Microagitação Acústica	29
3.1. Mistura passiva e activa de fluidos	29
3.2. Princípios Físicos.....	31
3.3. <i>Quartz wind</i>	35
3.4. Aplicação da microagitação acústica num <i>Lab-on-a-chip</i>	37
4. Transdutores Piezoeléctricos	39
4.1. Piezoelectricidade	39
4.2. Polímero PVDF como transdutor piezoeléctrico	46

4.3. Eléctrodos a aplicar ao PVDF	52
5. Resultados experimentais	61
5.1. Instalação experimental	61
5.2. Estudo da microagitação acústica na optimização da reacção de ácido úrico.....	64
5.3. Estudo da microagitação acústica na optimização de outras reacções	73
5.4. Estudo da influência dos eléctrodos utilizados nos filmes de β – PVDF	80
5.5. Estudo da microagitação acústica à escala microscópica	85
5.6. Estudo do aquecimento dos fluidos.....	90
5.7. Estudo do aquecimento na optimização das reacções	96
6. Conclusões e trabalho futuro	103
6.1. Conclusões	103
6.2. Trabalho a desenvolver	105
Referências	107
Anexo 1 - Características de detecção por espectrofotometria	II

Lista de Figuras

Figura 2.1 - Diagrama de blocos simplificado de um espectrofotómetro de feixe simples.....	27
Figura 3.1 - Representação esquemática da microagitação acústica no interior e exterior da camada fronteira	32
Figura 3.2 - Contribuição relativa da agitação promovida na camada limite para a velocidade global de fluxo	34
Figura 4.1 - Formação de um dipolo eléctrico por aplicação de uma tensão mecânica. Os círculos vermelhos da figura representam as cargas positivas e os verdes as cargas negativas	40
Figura 4.2 - Sistema de eixos ortogonal para definição das direcções das forças que afectam um material piezoeléctrico	43
Figura 4.3 - Curva de impedância associada a um elemento piezoeléctrico.....	46
Figura 4.4 - Estrutura do monómero VDF e do PVDF obtido por polimerização.....	47
Figura 4.5 – (a) Representação das moléculas de PVDF estiradas e alinhadas, sujeitas a um campo eléctrico forte. (b) Reorientação dos dipolos na fase β do polímero PVDF.....	48
Figura 4.6 – Modelo de um segmento de uma molécula de PVDF na (a) fase α , e na (b) fase β	49

Figura 4.7 - Esquematização das transições de fases possíveis para a fase β do polímero PVDF, bem como os processos que são envolvidos nas transições.....	50
Figura 4.8 - Diagrama esquemático da medição da resistividade através de quatro pontas.....	55
Figura 4.9 - Vista de topo de uma câmara de vácuo.....	57
Figura 5.1 - Montagem experimental para medição de transmitâncias. Constituída por fonte de luz, monocromador, fibra óptica, caixa de medição, picoamperímetro, computador para aquisição de dados e gerador de sinais.....	62
Figura 5.2 - Caixa com fotodíodo da <i>Hamamatsu</i> e suporte para medição da transmitância em macrocuvetes.....	62
Figura 5.3 – Interface gráfica do <i>software testpoint</i> , com representação da curva da corrente no fotodíodo da <i>Hamamatsu</i>	63
Figura 5.4 - Espectro do fotodíodo calibrado da <i>Hamamatsu</i>	63
Figura 5.5 - Fotografia de uma cuvette, com filme de β -PVDF colado e eléctrodos de alumínio, utilizada nos ensaios experimentais.....	65
Figura 5.6 - Espectro de transmitância, em função do comprimento de onda, para uma concentração <i>standard</i> de ácido úrico de 5 mg/dl.....	66
Figura 5.7 - Espectro de absorvência, em função do comprimento de onda, para uma concentração <i>standard</i> de ácido úrico de 5 mg/dl.....	66
Figura 5.8 - Curva de absorvência em função do tempo para diferentes frequências do sinal sinusoidal de 2,24 V aplicado aos contactos de um filme de β -PVDF com 110 μ m de espessura	67
Figura 5.9 - Curva de absorvência em função do tempo para diferentes amplitudes do sinal sinusoidal de 10 MHz aplicado aos contactos de um filme de β -PVDF com 110 μ m de espessura.....	69
Figura 5.10 - Curva de absorvência em função do tempo para diferentes frequências do sinal sinusoidal de 2,24 V de amplitude aplicado aos contactos de um filme de β -PVDF com 28 μ m de espessura.....	71

Figura 5.11 - Curva de absorvência em função do tempo para diferentes amplitudes do sinal sinusoidal de 40 MHz aplicado aos contactos de um filme de β -PVDF com 28 μm de espessura.....	72
Figura 5.12 - Curva de absorvência em função do tempo para diferentes espessuras de filme de β -PVDF, com sinais sinusoidais de 2,24 V	73
Figura 5.13 - Espectro de absorvência, em função do comprimento de onda, para uma concentração de 2,36 mg/dl de magnésio num calibrador de urina.....	75
Figura 5.14 - Curva de absorvência do magnésio, em função do tempo, para diferentes frequências do sinal sinusoidal de 2,24 V aplicado aos contactos de um filme de β -PVDF de 110 μm de espessura	75
Figura 5.15 - Espectro de absorvência, em função do comprimento de onda, para uma concentração de nitrito de 100 μM	77
Figura 5.16 - Curva de absorvência do nitrito, em função do tempo, para diferentes frequências do sinal sinusoidal de 2,24 V aplicado aos contactos de um filme de β -PVDF com 110 μm de espessura	78
Figura 5.17 - Curva de absorvência do nitrito, em função do tempo, para diferentes amplitudes do sinal sinusoidal de 10 MHz aplicado aos contactos de um filme de β -PVDF com 110 μm de espessura	79
Figura 5.18 - Espectro de transmitância na zona do visível para várias amostras de β -PVDF, com e sem ITO depositado.....	81
Figura 5.19 - Curva de absorvência do ácido úrico, em função do tempo, para diferentes eléctrodos depositados no filme de β -PVDF com 28 μm de espessura, com um sinal sinusoidal de 40 MHz e 2,24 V.....	84
Figura 5.20 - Fotografia de microcuvetes (2 mm x 2 mm x 640 μm) com filme de PVDF (à esquerda) e sem filme (à direita)	85
Figura 5.21 - Caixa com fotodíodo e suporte para microcuvetes, para medição de transmitâncias.....	86

Figura 5.22 - Corrente do fotodíodo, fabricado em CMOS, em função do comprimento de onda, incorporado na montagem para leitura das transmitância em microcuvetes.....	86
Figura 5.23 - Corrente, medida no fotodíodo, em função do comprimento de onda, para uma concentração <i>standard</i> de ácido úrico de 5 mg/dl	87
Figura 5.24 - Espectro de transmitância, determinado numa escala miniaturizada, em função do comprimento de onda, para uma concentração <i>standard</i> de ácido úrico de 5 mg/dl.....	88
Figura 5.25 - Espectro de absorvência, determinado numa escala miniaturizada, em função do comprimento de onda, para uma concentração <i>standard</i> de ácido úrico de 5 mg/dl.....	88
Figura 5.26 - Curva de absorvência do ácido úrico, em função do tempo, numa escala miniaturizada, sem e com microagitação, com um sinal de 2,24 V e 10 MHz aplicado aos contactos de um filme de β -PVDF de 110 μm de espessura	89
Figura 5.27 - Curva da temperatura em função do tempo, sem microagitação e com microagitação, para um sinal eléctrico de 2,24 V e frequências de 1 e 10 MHz, num filme de β -PVDF de 110 μm	91
Figura 5.28 - Curva da temperatura em função do tempo, sem microagitação e com microagitação, para um sinal eléctrico de 10 MHz, com uma amplitude de 1 V e 2,24 V, num filme de β -PVDF de 110 μm	93
Figura 5.29 - Curva da temperatura em função do tempo, para um sinal eléctrico de amplitude 2,24 V, para filmes de β -PVDF de 28 μm e 110 μm , actuados a 40 MHz e 10 MHz, respectivamente.....	94
Figura 5.30 - Curva da temperatura em função do tempo, para um sinal eléctrico de 2,24 V de amplitude e 10 MHz de frequência, para filmes de β -PVDF de 28 μm , com diferentes eléctrodos depositados	95
Figura 5.31 - Montagem experimental para medição de absorvências. Constituída por espectrofotómetro, forno para controlo da temperatura das cuvetes e computador para aquisição de dados.....	97

Figura 5.32 - Variação da absorvência ao longo do tempo, para a reacção de ácido úrico, à temperatura ambiente e com pré-aquecimento dos líquidos a 37 °C..... 98

Figura 5.33 - Variação da absorvência ao longo do tempo, para a reacção de nitrito, à temperatura ambiente e com pré-aquecimento dos líquidos a 37 °C..... 99

Lista de Tabelas

Tabela 4.1 - Propriedades electromecânicas e térmicas do PVDF.....	51
Tabela 5.1 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o ácido úrico, de 0,26 u.a., com microagitação acústica aplicada a um filme de β -PVDF de 110 μm de espessura, com um sinal sinusoidal de 2,24 V de amplitude e várias frequências.....	68
Tabela 5.2 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o ácido úrico, de 0,26 u.a., com microagitação acústica aplicada a um filme de β -PVDF de 110 μm de espessura, com um sinal sinusoidal de 10 MHz de frequência e várias amplitudes	69
Tabela 5.3 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o ácido úrico, de 0,26 u.a., com microagitação acústica aplicada a um filme de β -PVDF de 28 μm de espessura, com um sinal sinusoidal de 2,24 V de amplitude e várias frequências	71
Tabela 5.4 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o ácido úrico, de 0,26 u.a., com microagitação acústica aplicada a um filme de β -PVDF de 28 μm de espessura, com um sinal sinusoidal de 40 MHz de frequência e várias amplitudes.....	72
Tabela 5.5 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o magnésio, de 0,51 u.a., com microagitação acústica aplicada a um filme de β -PVDF de	

110 μm de espessura, com um sinal sinusoidal de 2,24 V de amplitude e várias frequências.....	76
Tabela 5.6 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o nitrito, de 0,60 u.a., com microagitação acústica aplicada a um filme de β -PVDF de 110 μm de espessura, com um sinal sinusoidal de 2,24 V de amplitude e várias frequências.....	78
Tabela 5.7 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o nitrito, de 0,60 u.a., com microagitação acústica aplicada a um filme de β -PVDF de 110 μm de espessura, com um sinal sinusoidal de 10 MHz de frequência e várias amplitudes.....	79
Tabela 5.8 - Resistividade superficial determinada para dois filmes de β -PVDF de 28 μm , com ITO de duas espessuras diferentes.....	82
Tabela 5.9 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o ácido úrico, de 0,26 u.a., com microagitação acústica aplicada a um filme de β -PVDF de 28 μm de espessura, com um sinal sinusoidal de 40 MHz de frequência e 2,24 V de amplitude, e vários eléctrodos depositados.....	84
Tabela 5.10 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o ácido úrico, de 0,34 u.a., em microcuvetes, com microagitação acústica aplicada a um filme de β -PVDF de 110 μm de espessura, com um sinal sinusoidal de 2,24 V de amplitude e 10 MHz de frequência.....	89
Tabela 5.11 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o ácido úrico, de 0,179 u.a., com pré-aquecimento dos fluidos a 37° C	98
Tabela 5.12 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o nitrito, de 0,17 u.a., com pré-aquecimento dos fluidos a 37° C	100
Tabela A. 1 - Características técnicas da detecção das várias biomoléculas por espectrofotometria.....	II

Lista de Acrónimos e Termos

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Al	Alumínio
APCVD	<i>Chemical Vapor Deposition</i> , à Pressão Atmosférica
ATP	Adenosina Tri-fosfato
AZO	Óxido de Zinco Dopado com Alumínio
BCG	Verde de Bromocresol
Cd	Cádmio
CMOS	<i>Complementary Metal – Oxide Semiconductor</i>
DEI	Departamento de Electrónica Industrial
DF	Departamento de Física
ESPT	Etil-Sulfopropil-Toluidina
GLDH	Glutamato Desidrogenase
GOD	Glicose Oxidase
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
In	Índio
In₂O₃	Óxido de Índio
IPO	Instituto Português de Oncologia
ITO	Óxido de Índio - Estanho
IV	Infravermelho
KBr	Brometo de Potássio
LDH	Lactato Desidrogenase
MDH	Malato Desidrogenase
MEMS	<i>Micro Electro – Mechanical Systems</i>

NAD	Dinucleótido de Nicotinamida – Adenina Oxidado
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida – Adenina Reduzido
NO₂	Nitrito
NO₃	Nitrato
O₂	Oxigênio
pH	Potencial Hidrogeniônico
POD	Peroxidase
PVDF	Poli (Fluoreto de Vinilideno)
RF	Rádio – Frequência
Sn	Estanho
SnO₂	Óxido de Estanho
TCO	Óxido Condutor Transparente
u.a.	Unidades Arbitrárias
UM	Universidade do Minho
UV	Ultravioleta
VDF	Fluoreto de Vinilideno
Zn	Zinco
ZnO	Óxido de Zinco

Lista de Símbolos

<i>A</i>	Absorvência
<i>A_{fonte}</i>	Velocidade da fonte acústica (m/s)
<i>C</i>	Capacidade (F)
<i>C_D</i>	Coefficiente de difusão (m ² /s)
<i>C_e</i>	Carga dos electrões (C)
<i>C_m</i>	Concentração molar (mol/l)
<i>c</i>	Coefficiente elástico
<i>D</i>	Vector deslocamento eléctrico (C/m ²)
<i>d</i>	Coefficiente piezoeléctrico
<i>E</i>	Campo eléctrico (V/m)
<i>E_g</i>	Hiato energético (eV)
<i>e</i>	Coefficiente piezoeléctrico
<i>F</i>	Densidade de força (N/m ³)
<i>F_m</i>	Figura de mérito
<i>f_a</i>	Frequência de anti-ressonância (Hz)
<i>f_r</i>	Frequência de ressonância (Hz)
<i>g</i>	Coefficiente de diferença de potencial
<i>h</i>	Coefficiente piezoeléctrico
<i>I</i>	Intensidade da radiação transmitida (J.s/m)
<i>I_A</i>	Intensidade acústica (W/m ²)
<i>I_B</i>	Corrente eléctrica (A)
<i>I_o</i>	Intensidade da radiação incidente (J.s/m)
<i>k</i>	Constante de Boltzmann

k_a	Coeficiente de absorção (m^{-1})
k_{em}	Coeficiente de acoplamento electromecânico
k_{ext}	Coeficiente de extinção
k_n	Número de onda (m^{-1})
L	Indutância (H)
L_D	Distância (m)
l	Espessura do eléctrodo (cm)
l_c	Caminho óptico (m)
l_μ	Comprimento de absorção (m)
m^*	Massa efectiva do electrão (kg)
n	Índice de refacção
n_e	Densidade de electrões
P	Tensão mecânica (Pa)
pf	Pressão acústica (Pa)
R	Reflectância
R_B	Resistência eléctrica (Ω)
Re	Número de Reynolds
R_m	Meia largura de canal (m)
R_s	Resistência de folha (Ω)
r	Correlação
S	Deformação (m)
s	Coeficiente elástico
T	Transmitância
T_C	Temperatura ($^{\circ}C$)
T_D	Tempo médio de difusão (s)
t	Espessura do filme (m)
U	Velocidade (m/s)
u	Velocidade média (m/s)
V	Volume (l)
v	Velocidade do som (m/s)
x	Distância da fonte acústica (m)
Z	Impedância acústica (Rayl)
z	Distância à parede (m)
a	Coeficiente de absorção (m^{-1})

β	Coeficiente dieléctrico
ΔV	Queda de tensão (V)
δ	Espessura da camada fronteira (m)
ε	Permitividade dieléctrica (F/m)
ε_M	Coeficiente de absorção molar (l/(mol.m))
τ	Tempo médio entre colisões (s)
η	Viscosidade dinâmica (N.s/m ²)
λ	Comprimento de onda (nm)
μ	Mobilidade dos electrões (cm ² /(V.s))
ν	Viscosidade cinemática (m ² /s)
ρ	Resistividade eléctrica (Ω .cm)
σ	Condutividade eléctrica (S)
ω	Frequência angular (rad/s)

1. Introdução

Este capítulo apresenta, de modo sucinto, o enquadramento deste trabalho, os objectivos definidos para a sua realização, assim como a sua motivação. O capítulo termina com uma descrição da organização desta dissertação.

1.1. Enquadramento do trabalho

O trabalho desenvolvido encontra-se relacionado com um projecto de investigação – Laboratório num chip com microagitação acústica de fluidos – que está a ser desenvolvido pelo Departamento de Electrónica Industrial na Universidade do Minho.

Os testes clínicos para diagnósticos rápidos, precisos e de baixo custo são, actualmente, uma das grandes apostas na área da saúde. A possibilidade de criar um sistema de diagnóstico rápido, capaz de ser utilizado pelos profissionais de saúde no consultório médico, ou pelos próprios pacientes em casa, com uma garantia de sensibilidade e reprodutibilidade adequados, é um desafio à inovação. Essas necessidades levaram ao desenvolvimento de novos sistemas de diagnóstico para a detecção e quantificação, nos fluidos biológicos, de um vasto leque de biomoléculas com relevância clínica. Estes sistemas tendem a ser, na sua maioria, de dimensões reduzidas de modo a otimizar a sua utilização em qualquer local (dispositivos *point-of-care*), possibilitando, além disso, a obtenção de resultados fiáveis num intervalo de tempo reduzido. Apresentam ainda como vantagens uma elevada integração, um

pequeno volume de amostras e reagentes e um baixo custo quando produzidos em massa [1 – 4].

Por outro lado, um requisito essencial destes dispositivos miniaturizados, comumente denominados por microdispositivos, passa pela automatização das medições. Os sistemas devem ser capazes de conduzir a amostra através de microcanais até às câmaras onde decorre a reacção (sistema de microfluidos), para posterior detecção, processamento e leitura dos dados adquiridos. É de notar que os sistemas de detecção, processamento e leitura devem, de igual modo, ser miniaturizados e integrados no microdispositivo. No caso específico do projecto em curso, esses são responsáveis pela análise qualitativa de biomoléculas específicas através da técnica de espectrofotometria por absorção óptica.

Devido às dimensões reduzidas destes sistemas, é essencial ter em atenção a dificuldade em promover a condução e mistura dos fluidos necessária para o sucesso do dispositivo, visto o número de *Reynolds* (coeficiente que traduz a relação entre as forças inerciais e viscosas em escoamentos) envolvido numa escala tão miniaturizada ser baixo (geralmente inferior a 1) e, conseqüentemente, o escoamento dos fluidos ser laminar. O número de *Reynolds* traduz a interacção fluido – parede e, quando os volumes são muito reduzidos, indica uma viscosidade elevada, o que dificulta o deslocamento dos fluidos. Nestes casos, a mistura ocorre apenas por difusão, o que pode levar a elevados tempos de trânsito nos canais, principalmente quando estão presentes moléculas grandes e com baixa difusividade [1 – 2, 4 – 6]. Por estes motivos, é importante que sejam incorporados sistemas para acelerar a mistura dos fluidos envolvidos e, assim, diminuir o tempo de reacção. Uma possível solução passa pela utilização de dispositivos MEMS (*Micro Electro Mechanical Systems*), tais como microbombas e microválvulas. No entanto, estes apresentam algumas desvantagens, tais como o aumento do custo do dispositivo, uma difícil integração e a necessidade de sistemas de controlo complexos. Conseqüentemente, para possibilitar reacções mais eficientes é necessário acrescentar ao microdispositivo um mecanismo que acelere a mistura, preferencialmente sem partes móveis. A microagitação acústica é uma técnica de mistura alternativa aos MEMS, podendo ser utilizada recorrendo a simples transdutores piezoeléctricos. No âmbito deste trabalho, será utilizado o polímero piezoeléctrico Poli(fluoreto de vinilideno) na sua fase beta – β -PVDF, com eléctrodos condutores transparentes de ITO (óxido de índio-estanho).

De facto, o recurso a transdutores piezoelétricos é uma solução eficiente para diminuir o tempo de reacção dos fluidos envolvidos, através da geração de ondas acústicas e conseqüente microagitação dos fluidos [6]. A microagitação provocada pelo transdutor piezoelétrico deve-se ao processo denominado por *acoustic streaming*, que por sua vez se baseia no fenómeno *quartz wind*. Este, baseia-se na absorção das ondas acústicas pelos fluidos, resultando numa força na direcção de propagação e atenuação acústica, gerando assim o seu movimento e a conseqüente microagitação [7].

A eficiência da microagitação acústica com base em filmes piezoelétricos, nomeadamente o polímero β -PVDF, foi já comprovada à escala macroscópica [7]. Contudo, é importante optimizá-la, e garantir, simultaneamente, que a utilização dos filmes em dispositivos miniaturizados se apresenta vantajosa. É ainda importante seleccionar convenientemente as características dos filmes piezoelétricos e dos sinais eléctricos aplicados aos seus contactos, de modo a optimizar as condições da microagitação. De facto, são esses sinais eléctricos que vão ser convertidos pelo material piezoelétrico em ondas acústicas (e calor), dando origem à microagitação, como foi anteriormente referido. É também importante notar que, devido à técnica de medição por absorção óptica, utilizada no microdispositivo referente ao projecto final, e no qual este trabalho se incorpora, tanto os filmes piezoelétricos como os eléctrodos neles depositados, quando se encontram no caminho óptico, devem ser transparentes.

A grande vantagem do desenvolvimento deste tipo de dispositivo desenvolvido passa pela sua flexibilidade e elevada capacidade de adaptação, sendo adequado à medição analítica de um elevado número de biomoléculas, bastando para isso alterar os reagentes utilizados e o comprimento de onda do feixe de luz medido, que depende directamente da biomolécula em causa. Assim, torna-se vantajosa uma aposta na análise de biomoléculas de elevada importância em diagnóstico clínico, fazendo dos microdispositivos uma alternativa viável aos equipamentos de grandes dimensões e custo elevado, que são, actualmente, os métodos disponíveis nos laboratórios de análises clínicas. O estudo de biomoléculas cuja análise é não rotineira é particularmente relevante, uma vez que a sua quantificação em laboratórios de análises clínicas é efectuada com uma frequência muito baixa. Algumas biomoléculas chegam a ser analisadas somente uma vez por semana em equipamentos tradicionais, o que diminui a eficiência dos equipamentos e aumenta consideravelmente o preço da análise.

Têm sido estudadas as potencialidades deste tipo de microdispositivos para análise de biomoléculas na urina e sangue (soro e plasma). Contudo, são várias as lacunas no que concerne ao estudo do seu potencial na quantificação de biomoléculas na saliva. A recolha de amostras em saliva é rápida e não invasiva, e as concentrações dos componentes salivares encontram-se relacionadas com as suas concentrações no soro sanguíneo. Consequentemente, um estudo da sua aplicabilidade neste campo é, sem dúvida, interessante. Estes dispositivos têm, ainda, a aptidão para serem utilizados noutras aplicações que não na área médica, nomeadamente na área bio(química), farmacêutica, alimentar, industrial, militar ou de análise de águas [3, 8 – 11].

1.2. Objectivos

A presente dissertação tem como objectivo o estudo da microagitação acústica para a mistura das moléculas estudadas com os respectivos reagentes de forma a diminuir o tempo de reacção. Um outro objectivo consiste no estudo de biomoléculas, passíveis de serem determinadas por espectrofotometria e de elevada importância para diagnóstico clínico. Pretende-se seleccionar um conjunto de biomoléculas cuja quantificação não seja rotineira e compreender quais as características da sua detecção por absorção óptica. Pretende-se, ao longo do trabalho, estudar, tanto à escala macro como micrométrica, a eficiência da aplicação da microagitação acústica baseada no β – PVDF, na geração de ondas acústicas e na mistura de fluidos. Pretende-se, ainda, optimizar o processo de microagitação dos fluidos, no que diz respeito ao sinal eléctrico aplicado no polímero (nomeadamente à frequência e à amplitude do sinal), aos eléctrodos utilizados, à espessura do polímero e ao aquecimento gerado por esta técnica, bem como determinar a contribuição individual quer do aquecimento quer da microagitação na melhoria da mistura.

1.3. Descrição do trabalho

O projecto tem como pretensão final o desenvolvimento de um microdispositivo integrado para a análise de biomoléculas específicas, quantificadas através da técnica de

espectrofotometria por absorção óptica, incorporando ainda um sistema de microagitação acústica para promover a mistura e assim diminuir o tempo de reacção dos fluidos envolvidos.

Para este efeito, realizou-se o estudo da importância da análise de determinadas biomoléculas em vários fluidos biológicos, e seleccionou-se um conjunto de biomoléculas com potencial para aplicação no microdispositivo. Para essas moléculas, foram investigadas as suas características, as técnicas de detecção, o comprimento de onda da luz incidente, a gama de linearidade do processo, a sensibilidade do método, o tempo de reacção e a temperatura óptima para análise. Foi ainda investigada a importância clínica de cada uma delas, e discutido o papel da sua quantificação no diagnóstico de várias patologias.

Posteriormente, estudou-se a eficiência da microagitação acústica e testaram-se vários parâmetros, com o intuito de a otimizar. Desta forma, foi utilizado um polímero com boas propriedades electroactivas - o PVDF na sua fase β , de modo a conseguir gerar as ondas acústicas pretendidas. Foram utilizados eléctrodos de alumínio e eléctrodos transparentes de ITO, através dos quais o sinal eléctrico foi aplicado no filme piezoeléctrico. Ao longo do projecto analisaram-se quais as melhores características do filme de β -PVDF, ao nível da sua espessura, dos eléctrodos depositados e do sinal eléctrico aplicado, de modo a melhorar a microagitação e mistura e conseqüentemente acelerar a reacção. Estudaram-se, deste modo, vários dos parâmetros adjacentes ao fenómeno da microagitação acústica, e testou-se a aplicabilidade deste fenómeno em dispositivos à escala miniaturizada.

Estudou-se ainda a influência do efeito piezoeléctrico e da microagitação acústica no aquecimento dos fluidos e na melhoria do tempo de reacção. Por fim, analisou-se a contribuição individual do aquecimento e da microagitação acústica no tempo de reacção.

1.4. Organização da dissertação

O primeiro capítulo da dissertação resume os principais objectivos do trabalho realizado, efectuando o seu enquadramento teórico. Neste capítulo é ainda referido,

sucintamente, o trabalho experimental efectuado, sendo por fim descrita a organização da dissertação.

O segundo capítulo incorpora informação relativa à análise de fluidos biológicos. São caracterizados os fluidos mais relevantes no organismo, sendo efectuada uma selecção de algumas biomoléculas com interesse no diagnóstico médico, e caracterizada a sua detecção por espectrofotometria. O capítulo estuda ainda esta técnica, sendo referidos os princípios teóricos da espectrofotometria, bem como o cálculo das concentrações através da Lei de *Lambert – Beer* e a instrumentação necessária.

O terceiro capítulo da dissertação estuda a base teórica da microagitação acústica, em particular do fenómeno de *quartz wind*, referindo ainda algumas técnicas já desenvolvidas de promoção e controlo da microagitação acústica.

No quarto capítulo, são abordados os transdutores piezoeléctricos, com enfoque nos princípios teóricos da piezoelectricidade, nas características do material piezoeléctrico utilizado – o β -PVDF, e nas propriedades dos eléctrodos condutores transparentes.

No quinto capítulo apresentam-se os resultados experimentais obtidos ao longo do trabalho efectuado, bem como a sua discussão. O sexto e último capítulo enquadra as principais conclusões retiradas do trabalho realizado, e propõe algumas sugestões para trabalho futuro a desenvolver.

2. Análise de fluidos biológicos

Neste capítulo é apresentado o conceito de fluido biológico, sendo descritos os principais fluidos biológicos humanos. Apresenta-se ainda uma selecção de biomoléculas cuja aplicação no microdispositivo será interessante, a sua importância clínica e as características técnicas da sua detecção por espectrofotometria. Por fim, estuda-se ainda a técnica experimental utilizada – espectrofotometria por absorção óptica.

2.1. Biomoléculas nos fluidos biológicos

São várias as biomoléculas presentes nos fluidos biológicos com elevada importância em diagnóstico clínico, algumas das quais se descrevem nesta secção.

2.1.1. Conceito de fluido biológico

Fluido biológico pode ser definido como a componente líquida dos organismos vivos de origem animal, nomeadamente o Homem. O seu principal constituinte é água, na qual uma vasta gama de solutos se encontra dissolvida ou suspensa. Os solutos incluem iões orgânicos, aminoácidos, glícidos, lípidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, entre outros. A água e os iões orgânicos, quando interligados, compõem as

moléculas biológicas ou biomoléculas. Os restantes componentes são formados pelo encadeamento de várias moléculas, pelo que a sua dimensão é superior à das biomoléculas e, por isso, são denominadas por macromoléculas [12].

Aproximadamente 56% do organismo humano é constituído por fluidos. Os fluidos biológicos humanos mais relevantes são a urina, sangue (soro e plasma), saliva, fluido cerebrospinal, fluido linfático, fluido sinovial, bÍlis, fluido intracelular e fluido lacrimal [12 – 13]. Os fluidos biológicos desempenham um papel essencial na homeostase, ou seja, na tendência do organismo para manter um estado de equilíbrio. São os responsáveis pela manutenção do pH e pela regulação da temperatura corporal. Deste modo, variações das concentrações e características dos vários fluidos, fora das gamas consideradas normais, são indÍcios de disfunções metabólicas ou patologias [13].

Seguidamente, serão descritos a urina, o sangue e a saliva, visto serem os principais fluidos biológicos analisados em exames clÍnicos.

2.1.2. Principais fluidos biológicos em exames clÍnicos

Nesta secção, caracterizam-se os principais fluidos biológicos humanos analisados em diagnóstico clÍnico.

2.1.2.1. Urina

A urina é um fluido complexo, cuja composição é o produto final do metabolismo celular no sistema renal e urinário. Diariamente, em média, são excretados entre 1 e 1,5 litros de urina, valor este que depende da ingestão de água. A sua formação ocorre nos rins, mais especificamente nos glomérulos, onde é filtrado cerca de 25% do sangue proveniente da circulação sistémica. De acordo com as necessidades do indivíduo, o sistema renal tem a capacidade de diluir ou concentrar a urina, regulando a excreção de sódio e outros metabolitos.

A sua composição é, aproximadamente, 95% de água e 5% de biomoléculas dissolvidas. Os principais constituintes sólidos da urina são a ureia, cloreto, sódio, potássio, amónia, fosfato inorgânico, sulfato inorgânico, creatinina, ácido úrico, glicose,

albumina e proteína total [12]. Além destas biomoléculas, são muitos outros os componentes da urina com elevada importância em diagnóstico, mas que se apresentam em quantidades bastante reduzidas. No ponto 2.3 serão abordadas algumas destas moléculas (magnésio, frutose e citrato).

A urina é, ao lado do sangue, o fluido biológico mais frequentemente analisado para diagnóstico clínico. A extração de amostras é não invasiva e o líquido é pouco viscoso, o que o torna num fluido simples de analisar. Este fluido é frequentemente analisado para avaliação da função renal e do metabolismo [14].

2.1.2.2. Sangue

O sangue é um fluido constituído, em 55% do total do seu volume, por plasma, sendo os restantes 45% preenchidos por componentes celulares. A grande maioria dos componentes celulares presentes no sangue são os glóbulos vermelhos. As plaquetas e os glóbulos brancos ocupam menos de 1% do volume sanguíneo.

O plasma é constituído por água (cerca de 90%), na qual solutos orgânicos e inorgânicos se dissolvem e são transportados para todo o organismo. Na função de transporte apenas o oxigénio é excepção, uma vez que não é transportado no plasma, sendo levado através do organismo pelos glóbulos vermelhos. Entre os solutos dissolvidos no plasma encontram-se electrólitos (sódio, principalmente), bem como nutrientes, hormonas, resíduos orgânicos e proteínas. Estas correspondem a 7-9% do plasma, e dividem-se em albuminas (80% do total das proteínas), que são o principal contributo para a manutenção da pressão osmótica sanguínea, globulinas (16%), que transportam lípidos e vitaminas lipossolúveis e fibrinogénio (4%), que intervém na coagulação sanguínea. Quanto aos componentes celulares, estes dividem-se em glóbulos vermelhos que transportam oxigénio, glóbulos brancos com função de defesa do organismo e plaquetas sanguíneas que participam no processo de coagulação [13, 15].

O uso de amostras sanguíneas para análises requer a separação do sangue em duas fases por centrifugação. Assim, as células ficam separadas do plasma, ficando este apto para ser analisado. Contudo, para análises de pesquisa de anticorpos e exames serológicos, o plasma não é a amostra ideal, pelo que se deve obter uma outra fase – o soro. Este é obtido através da coagulação sanguínea, através da qual os factores de

coagulação, como o fibrinogénio, são removidos naturalmente. Tal como a urina, o sangue é um dos fluidos mais frequentemente utilizados para análises, apesar de a recolha de amostras ser invasiva [14].

2.1.2.3. Saliva

A saliva é constituída por componentes originários das glândulas salivares (glândula parótida, submandibular e sublingual), bem como de fontes glandulares não salivares (mucosa oral e gengivas). A sua composição pode variar de acordo com o repouso ou a estimulação. São vários os componentes que são transportados directamente do soro sanguíneo para a saliva através da mucosa oral e/ou das gengivas, por processos de difusão ou transporte activo. Contudo, e ao contrário do que se possa inferir, a saliva não é um ultrafiltrado simples do plasma, mas é um fluido complexo formado através de diversos mecanismos: difusão passiva, transporte activo contra um gradiente de concentração, pinocitose e ultrafiltração através de membrana. Assim, a concentração destes componentes na saliva pode reflectir, ou não, as suas concentrações no soro [16].

Os componentes aquosos da saliva, bem como os electrólitos, são na sua maioria derivados do soro, enquanto os elementos imunológicos e bioquímicos (como imunoglobulinas, enzimas e proteínas) podem derivar do soro, glândulas salivares, ou outras fontes intra ou extra orais. Assim, a análise da composição e origem dos componentes da saliva pode ter um papel importante como ferramenta de diagnóstico para a localização e caracterização de várias doenças sistémicas [16].

São várias as biomoléculas presentes na saliva que podem ser monitorizadas, de modo a actuarem como marcadores de diversas patologias. Para isso, é necessário que reflectam as concentrações das moléculas no soro sanguíneo e que as concentrações dos marcadores não sejam alteradas em função das condições intraorais ou por processos associados ao transporte dos marcadores entre o soro e a saliva.

A monitorização destes marcadores na saliva apresenta-se vantajosa em relação ao soro sanguíneo, visto a recolha de amostras salivares ser mais simples, não invasiva, indolor, de baixo custo, com um risco mínimo de infecção e possível de ser efectuada pelo próprio paciente, sem necessidade de pessoal médico [16].

São várias as áreas clínicas que podem recorrer a análises salivares para diagnosticar doenças sistêmicas e prever a sua progressão. Assim, tem sido estudada a sua viabilidade para diagnosticar doenças autoimunes, cardiovasculares (nomeadamente através da avaliação da amilase salivar, em comparação com a do soro, aquando de cirurgias cardiovasculares) e infecciosas (por exemplo, HIV). Tem sido também avaliado o seu uso em endocrinologia (uma vez que o valor das hormonas salivares reflecte o nível da sua concentração livre), para medição da concentração de cortisol, estradiol, progesterona e testosterona, por exemplo. Além destas, a saliva tem sido usada ainda em oncologia, monitorização de drogas e nefrologia, nomeadamente através da creatinina e ácido úrico, para avaliação da função renal [17].

2.1.3. Quantificação de biomoléculas nos fluidos biológicos e a sua importância clínica

O diagnóstico de muitas patologias é baseado na análises de fluidos biológicos e mais especificamente nas biomoléculas específicas neles presentes. Uma análise inicial, qualitativa, compreende habitualmente a observação de várias propriedades físicas. Contudo, num elevado número de casos, o estudo qualitativo dos fluidos não é suficiente para estabelecer um diagnóstico. Nestas circunstâncias, é necessário determinar quantitativamente a concentração de várias biomoléculas [12].

São muitas as biomoléculas presentes nos fluidos biológicos, cuja concentração é passível de ser analisada por espectrofotometria de absorção óptica. Contudo, foram seleccionadas aquelas cuja importância em diagnóstico é elevada, e que não são analisadas de modo rotineiro.

2.1.3.1. Frutose na urina

A frutose é um açúcar redutor primariamente metabolizado no fígado, apesar de o intestino e os rins possuírem enzimas necessárias para o seu catabolismo. A nível hepático, a frutose é convertida em glicose e glicogénio. Apesar de estimular a gliconeogénese, a administração da frutose produz apenas pequenos aumentos no nível

glicémico. Este açúcar é ainda responsável pela estimulação do transporte de glicocinase para fora do núcleo hepático.

Na prática clínica, a frutose está associada a disfunções metabólicas genéticas, que podem ser associadas a hipoglicemia e acidose metabólica. Uma destas disfunções, a frutoseúria essencial, não apresenta sintomas, e é transmitida geneticamente, como resultado de uma deficiência na enzima frutocinase, que leva a uma supressão no metabolismo da frutose. Como consequência, a frutose é parcialmente excretada pela urina.

A frutose está ainda associada a uma intolerância hereditária, caracterizada pela ausência da enzima aldolase B, responsável pela clivagem da frutose 1-fosfato. Esta, acumula-se no organismo, impedindo a formação de glicogénio e a sua conversão em glicose para ser usada como fonte energética. Como consequência, o nível de frutose no sangue aumenta, aumentando também a quantidade excretada pela urina.

A intolerância hereditária à frutose pode, assim, ser detectada através da análise de frutose na urina e da glicose sanguínea, após a ingestão de substâncias que contenham frutose. Este teste deve ser efectuado em pediatria, para que o diagnóstico ocorra até aos seis meses de idade.

A nível de valores de referência, não há consenso na literatura em relação aos níveis sanguíneos e urinários de frutose considerados normais, uma vez que estes variam de acordo com o método de determinação. Além disso, as baixas concentrações em que habitualmente os açúcares redutores estão presentes nos fluidos biológicos dificultam a sua dosagem [18].

A detecção da frutose por espectrofotometria pode basear-se na fosforilação da frutose pela adenosina tri-fosfato (ATP) numa reacção catalisada pela hexocinase. No passo seguinte, a frutose 6-fosfato é convertida em glicose 6-fosfato e é oxidada para 6-fosfogluconato na presença de NAD, numa reacção catalisada pela glicose 6-fosfato desidrogenase. Durante a oxidação, uma quantidade estequiométrica de NAD é reduzida para NADH, e o consequente aumento da absorvência a 340 nm é directamente proporcional à concentração de frutose [19 – 20].

2.1.3.2. Citrato na urina

O citrato (ou ácido cítrico) é um composto orgânico de elevada importância bioquímica, visto actuar como intermediário em vários ciclos metabólicos. É filtrado livremente ao nível glomerular e reabsorvido no túbulo proximal. A presença de citrato na urina é benéfica, visto potenciar a reabsorção tubular renal de cálcio, promovendo hipocalciúria.

O citrato liga-se a iões cálcio, formando complexos solúveis. Num processo simultâneo, ocorre uma elevação do pH urinário e um aumento da solubilização do ácido úrico, inibindo a precipitação de ácido úrico e oxalato de cálcio. Deste modo, a determinação de citrato na urina é relevante para exploração do metabolismo do fósforo, cálcio e ácidos do ciclo de *Krebs*, assim como para análise de pacientes com suspeitas de cálculos renais (situação em que o nível de citrato na urina se encontra diminuída). As situações de hipocitraturia (baixa taxa de citrato na excreção urinária) podem ocorrer de forma isolada ou, como se prevê, associadas a hipercalciúria, hiperuricosúria, hiperoxalúria, distúrbios intestinais ou insuficiência renal [21].

Em indivíduos adultos, a gama normal de valores de citrato urinário está compreendida entre os 288 e os 902 mg, considerando uma amostra de 1,5 l de urina recolhida ao longo de 24 horas. Uma redução destes valores é um indicador da existência de cálculos renais. A nível epidemiológico, sabe-se ainda que as mulheres excretam uma maior quantidade de citrato que os homens, pelo que têm menor tendência ao desenvolvimento de cálculos [19, 22 – 23].

A detecção do citrato por absorção óptica pode basear-se na reacção de conversão do ácido cítrico em oxalacetato e acetato na presença da enzima citrato liase. Na presença das enzimas malato desidrogenase e lactato desidrogenase, o oxalacetato e o piruvato (produto da sua descarboxilação) são reduzidos para L-malato e L-lactato, respectivamente, com oxidação de NADH. A concentração de NADH oxidado é então avaliada por leituras no espectrofotómetro a 340 nm. Esta concentração é proporcional à de ácido cítrico na amostra [19].

2.1.3.3. Nitrito e nitrato salivar

A detecção e quantificação de nitrito e nitrato na saliva apresenta-se vantajosa em relação à análise de amostras sanguíneas uma vez que permite o diagnóstico de várias doenças, recorrendo a uma recolha de amostras não invasiva, simples e com um risco de infecção inferior. Além disso, as concentrações de nitrato salivar encontram-se directamente relacionadas com as concentrações sanguíneas deste ião [24 – 25].

Os nitritos presentes na saliva derivam da absorção de nitrato ao longo do tracto gastrointestinal superior. Esta absorção promove uma elevada concentração de nitrato no plasma, que se manifesta de igual modo na saliva, produzida nas glândulas salivares. Na cavidade oral os nitratos são então convertidos em nitritos, que têm um papel muito importante na carcinogénese, ao reagir com aminas e amidas para formar nitrosaminas carcinogénicas. Deste modo, é promovido o desenvolvimento de carcinomas do tracto digestivo, nomeadamente cancro da boca. Este é o sexto tipo de cancro mais comum, e a sua incidência em jovens tem vindo a aumentar. Radicais livres como espécies azotadas (NO^3 e NO^2) e à base de oxigénio (radicais superóxido, hidroxil e peróxido de hidrogénio), são assim os principais indutores do cancro da boca, ao promoverem alterações e quebras nas cadeias de ADN e ao danificarem os genes supressores dos tumores. Os níveis de nitrito salivar podem ser ainda considerados indicadores do estado antioxidante do indivíduo [16, 24, 26 – 28]. Deste modo, a quantificação dos nitritos na saliva pode ser usada como uma ferramenta de diagnóstico de doenças tumorais.

Quanto aos valores de referência, é importante notar que estes não são rígidos, isto é, dependem da dieta e da presença de estímulos, entre outros factores. Assim, e a título de exemplo, após a ingestão de uma refeição rica em nitrato (NO^3^-), as concentrações salivares de nitrito (NO^2^-) e nitrato permanecem elevadas por um período mínimo de tempo de 5 horas, sem que esta concentração seja indicadora de carcinoma [29]. Em condições normais, as concentrações de nitrato salivar variam entre 21 e 36 mg/l e são, aproximadamente, duas a três vezes superiores às de nitrito (12 – 17 mg/l) [30 – 31].

2.1.3.4. Ácido úrico salivar

O ácido úrico tem um papel importante no organismo ao agir como um poderoso e activo antioxidante e destruidor de radicais livres de oxigénio, e ao inibir a progressão de tumores (por exemplo cancro da boca). Aliás, a acção das moléculas de ácido úrico é responsável por 70 % da capacidade antioxidante da saliva [16, 32 – 33]. Em concentrações fisiológicas, os sais de ácido úrico reduzem os oxidantes oxo-heme (formados pela reacção de peróxido com hemoglobina), e protegem os eritrócitos dos danos peroxidativos que levam à lise celular [32, 34].

De um modo mais específico, a pH neutro, 99% das moléculas de ácido úrico encontram-se na forma de espécies isoladas com constante de acidez de 5,4. Contudo, em pH ácido (quando a saliva atinge o estômago), as moléculas tornam-se protonadas, e é nesse estado que vão reagir com o dióxido de azoto. A reacção consiste na inibição da formação de radicais de dióxido de azoto e dos seus compostos derivados, prevenindo assim as suas consequências patológicas. Deste modo, o papel antioxidante do ácido úrico salivar protege o estômago da formação de espécies azotadas tóxicas [35].

A concentração de sais de ácido úrico – urato, na saliva, apresenta variações ao longo do dia. Durante o sono a concentração é mais elevada, o que potencia a acção antioxidante e, como consequência, a defesa da cavidade oral. Este papel é preponderante visto, durante a noite, a acidez da cavidade oral ser mais acentuada e as secreções de sódio e cloreto estarem no seu máximo [36 – 37].

A quantificação do ácido úrico salivar é ainda importante no diagnóstico de gota. Esta manifestação clínica é resultante da deposição de cristais de ácido úrico nos tecidos e articulações, e caracteriza-se por, nestas circunstâncias a concentração de ácido úrico ser superior, atingindo concentrações similares às verificadas no sangue [36, 38 – 39]. Também os diagnósticos de hiperuricemia, síndrome de *Lesch-Nyhan*, obesidade, diabetes, colesterol elevado, alta pressão arterial, falhas renais ou cardíacas, podem ser auxiliados pelos valores elevados obtidos pela quantificação desta molécula em amostras salivares [38 – 40].

A saliva parótida humana é constituída por, aproximadamente, 2,5% de ácido úrico [42], sendo o seu valor médio cerca de 1,6 mg/ml, podendo variar entre os 0,5 e os 2,9 mg/ml (embora a percentagem de amostras estudadas que tenha atingido estes extremos seja diminuta) [41]. Verifica-se ainda que a concentração de ácido úrico na

saliva é muito superior no homem, pelo que na quantificação do ácido úrico é importante ter em consideração o sexo do indivíduo [33].

Um dos exemplos de métodos de detecção de ácido úrico baseia-se na sua oxidação a alantóina, na presença de uricase, formando-se peróxido de hidrogénio. Este, na presença de peroxidase, oxida outro reagente, a 4-aminofenazona, formando um composto vermelho – a quinoneimina, que absorve radiação a 520 nm [16, 34, 42].

2.1.3.5. Albumina salivar

A albumina é uma proteína com importante acção antioxidante no plasma sanguíneo. A nível salivar, apesar de o seu papel antioxidante ser bastante inferior ao do ácido úrico, esta ainda se encontra presente. A sua produção é aumentada no caso de estimulação do fluxo de saliva. Nestas condições, não só a albumina, como também outras moléculas antioxidantes (ácido úrico e o ácido ascórbico) vêm a sua produção acelerar. É importante notar que, à medida que o tempo passa, a concentração de albumina em amostra vê-se diminuída entre duas a três vezes, em comparação com a concentração numa amostra acabada de retirar [34]. Valores baixos de albumina são indicadores de falha hepática, infecção aguda ou nutrição insuficiente, entre outras patologias [43]. O valor médio de albumina salivar, de acordo com o estudo desenvolvido por *Moore et al*, é de aproximadamente 12 μ M [34].

A albumina na saliva pode ser quantificada por métodos ópticos, num processo baseado na reacção que ocorre entre a albumina da amostra e o verde de bromocresol. Esta reacção ocorre em soluções com pH 8,3, e provoca uma alteração da cor observável. A intensidade da cor formada é proporcional à concentração de albumina na amostra [44].

2.1.3.6. Creatinina salivar

A creatinina é uma molécula formada a partir de reacções não enzimáticas sofridas pela creatina no tecido muscular, e tem um papel fundamental, tal como o ácido úrico, no metabolismo das proteínas [45].

A quantificação da creatinina salivar pode ter um papel importante no diagnóstico da função renal, ao ser um indicador da taxa de filtração glomerular, com elevada sensibilidade e especificidade [17, 46]. A análise da creatinina é ainda aceite como indicador da função muscular e tiroidal. Vários estudos indicam que, em pacientes com atrofia muscular, a *clearance* de creatinina apresenta valores baixos [45]. Contudo, a importância da creatinina pode ser alargada ao diagnóstico de outras patologias, nomeadamente pancreatite aguda em pacientes com insuficiência renal [47].

Para o diagnóstico da pancreatite aguda deve ter-se em consideração, não só o nível de creatinina salivar, como também o de amilase, uma vez que este diagnóstico se baseia na razão entre a concentração das duas moléculas. Um aumento significativo desta razão é indicativo da doença, embora a sua especificidade não seja garantida [47]. Também para a análise da função renal pode ter-se em atenção a razão amilase / *clearance* de creatinina, que garante resultados mais precisos do que a análise individual da *clearance* de creatinina [46]. Em casos de insuficiência renal crónica, a *clearance* de amilase salivar (em média, 2,3 ml/minuto) é bastante superior aos valores de *clearance* desta molécula em indivíduos sem patologia, pelo que a razão amilase / creatinina é também superior [48].

A detecção colorimétrica da creatinina pode ser baseada na reacção de *Jaffe*. Esta consiste na reacção da creatinina com picrato, em meio alcalino, formando um complexo de cor vermelho – alaranjado. A intensidade da cor formada, medida a 510 nm nos primeiros minutos da reacção, é proporcional à concentração de creatinina na amostra [44].

2.1.3.7. Glicose salivar

O controlo do nível de açúcar no sangue, nomeadamente a glicose, é essencial para a qualidade de vida dos pacientes com diabetes. Contudo, retirar amostras sanguíneas tão frequentemente é invasivo e pode tornar-se doloroso para o paciente, pelo que seria vantajoso encontrar um método de detecção da glicose sanguínea sem recorrer a métodos invasivos. Deste modo, vários estudos tentam encontrar correlações entre os níveis de glicose salivares e sanguíneos. Nestas circunstâncias, seriam

necessárias apenas amostras de saliva para controlar os níveis de açúcar em diabéticos [49].

De acordo com *Yamaguchi et al* [50], a relação entre o nível de glicose salivar e sanguínea varia entre 1/50 e 1/100 em indivíduos normais. Assim, seria possível estimar o nível sanguíneo de açúcar a partir de amostras salivares e, assim, facilitar o diagnóstico clínico de pacientes diabéticos [50]. A concentração de glicose salivar varia directamente com a sanguínea, mas numa ordem de magnitude bastante inferior. Além disso, as médias de concentrações de glicose na saliva são superiores nos indivíduos diabéticos, em comparação com os saudáveis [51]. Contudo, os níveis de glicose salivar variam de acordo com o ambiente, a dieta e o próprio indivíduo [49]. Os valores médios de glicose salivar, em jejum, para indivíduos normais, são aproximadamente 0,78 mg/100 ml, enquanto para indivíduos diabéticos este valor é de 1,61 mg/100 ml [51].

A detecção colorimétrica da glicose baseia-se na reacção de oxidação, na presença da glicose oxidase, da glicose a ácido glucónico, formando-se também peróxido de hidrogénio. Na presença da peroxidase, o peróxido de hidrogénio reage com fenol e 4-aminofenazona e produz um complexo colorido, cuja intensidade da cor é proporcional à concentração de glicose na amostra [44].

2.1.3.8. Potássio salivar

A quantificação do ião potássio a nível salivar é um bom indicador de avaliação da reabsorção osmótica. Isto porque, para taxas de secreção de saliva muito baixas, vários estudos indicam que há um aumento da concentração de potássio. Contudo, a sua concentração é independente da taxa de secreção salivar, quando esta se apresenta superior [52].

A secreção do potássio na saliva pode ser dividida em duas fases. A primeira é uma fase transitória, em que ocorre uma elevada taxa de secreção de potássio, quando a glândula salivar é activada por estimulação nervosa. A maioria do potássio segregado nesta fase é proveniente do potássio intracelular da glândula que, ao mesmo tempo que perde potássio para a saliva, perde também para o sangue. Na segunda fase, a taxa de secreção de potássio é inferior, e este é derivado do plasma. Nesta fase, a concentração salivar de potássio é independente da taxa de estimulação nervosa [52].

O potássio pode ser quantificado através de métodos ópticos. Um exemplo baseia-se na reacção de activação da piruvato cinase pelo potássio presente na amostra. A concentração de potássio na amostra é proporcional à conversão do fosfoenolpiruvato a piruvato, através da piruvato cinase. O piruvato é depois transformado em lactato. A quantidade de NAD formada é proporcional à concentração de potássio na amostra [44].

2.1.3.9. Ureia de nitrogénio salivar

A ureia de nitrogénio salivar é uma molécula com potencial para avaliação da taxa de filtração glomerular, e assim ser um índice da função renal, visto a correlação entre a sua concentração salivar e no soro sanguíneo ser muito elevada (de acordo com *Okamoto et al*, $r=0,93$) [53]. Deste modo, poderia aproveitar-se a quantificação desta molécula para, de um modo simples e fiável, detectar anomalias na função renal. As características da ureia de nitrogénio permitem que seja um bom analito para medições por espectrofotometria [53].

Na prática, não está ainda confirmado que a análise da concentração da ureia de nitrogénio salivar seja um bom índice de análise da eficácia da hemodiálise e, como consequência, da função renal. Uma dificuldade inerente a este processo é a presença de bactérias na cavidade oral, que podem contaminar as amostras salivares. Esta dificuldade pode ser ultrapassada pelo uso de amostras de saliva da parótida, que no entanto são mais difíceis de recolher [53].

A detecção por espectrofotometria baseia-se na hidrólise da ureia a ião amónia e dióxido de carbono, na presença de urease. Na presença de glutamato – dehidrogenase, o ião amónia formado reage com α -cetoglutarato e NADH para formar glutamato e NAD. A oxidação do NADH, medida a 340 nm, é proporcional à concentração de ureia na amostra [44].

2.1.3.10. Magnésio na urina

O magnésio é uma molécula que desempenha um factor fundamental em diversas reacções enzimáticas importantes, quer como parte integrante de uma

metaloenzima, quer como activador. Participa ainda activamente na glicólise, respiração celular e transporte de cálcio através das membranas celulares.

A sua regulação é efectuada através da velocidade de excreção renal, sendo controlada pela paratiróide, e é efectuada em conjunto com a regulação de cálcio no organismo. O aumento da reabsorção de cálcio provoca a inibição da reabsorção de magnésio.

As medições da concentração de magnésio em exames de urinálise são utilizadas no diagnóstico e tratamento de hipomagnesemia e hipermagnesemia. Ao nível de sintomas, a hipomagnesemia é geralmente observada em casos de diabetes, alcoolismo crónico, diurese forçada, hipertiroidismo, hipoparatiroidismo, hipocalcemia, e pancreatite aguda. A hipermagnesemia é normalmente observada em casos de insuficiência renal, desidratação, acidose diabética grave e doença de *Addison*.

Os níveis de referência de magnésio na urina, para um adulto, situam-se na gama 3 – 5 mmol/24h (73 – 122 mg/24h). Estes valores podem variar com a idade, sexo, tipo de amostra ou dieta, pelo que o intervalo de referência não é rígido.

A concentração de magnésio pode ser quantificada através de uma reacção colorimétrica. Os iões de magnésio formam um complexo colorido com azul de xilidil numa solução básica (pH 11,4). A cor púrpura produzida é medida a 520 nm e é proporcional à concentração de magnésio na amostra. A interferência do cálcio nas medições é eliminada pela adição de um reagente (glicoleterdiamina - N, N, N', N' - ácido tetraacético) [54].

2.1.4. Características técnicas da detecção das biomoléculas

A detecção das biomoléculas estudadas, através de métodos espectrofotométricos, requer o conhecimento das características técnicas essenciais para a sua correcta determinação. Assim, caso sejam necessários, é importante conhecer os reagentes envolvidos na reacção. É ainda essencial reconhecer o comprimento de onda da absorção da biomolécula ou da mistura formada entre a amostra e o reagente específico para a biomolécula a analisar (que deve corresponder ao valor máximo do espectro de absorvência da amostra) [12], o tempo médio de reacção, a temperatura óptima a que esta deve ocorrer, bem como a linearidade e sensibilidade dos métodos.

Para que a reacção se conclua no tempo estimado, e os resultados do cálculo da concentração da biomolécula sejam lineares, é ainda importante garantir que a razão entre os volumes de amostra e reagente é suficiente para que todas as biomoléculas presentes na amostra reajam com o reagente. Deste modo são frequentemente utilizadas razões muito elevadas entre a concentração de reagente e a de amostra, para que este risco seja evitado [12].

No caso específico da linearidade, deve avaliar-se a gama de referência das biomoléculas nos fluidos biológicos, de modo a garantir a aplicabilidade do método. Se a concentração da molécula nos fluidos for inferior ao valor mínimo de concentração necessário para garantir-se linearidade, a técnica não é aplicável. Pelo contrário, se a concentração for superior à gama de linearidade, basta diluir a amostra, acrescentando o factor de diluição aos cálculos da concentração da biomolécula.

O anexo 1 apresenta, para cada uma das biomoléculas abordadas, os dados técnicos da sua detecção, baseados nas bulas disponibilizadas pela *Far Diagnostic*, *Olympus* e *Sigma Aldrich* [19, 44, 54].

2.2. Técnica experimental: Espectrofotometria por absorção óptica

A espectrofotometria baseia-se no estudo da interacção da radiação electromagnética com as biomoléculas e é uma técnica analítica vastamente utilizada em laboratório. Este método permite determinar a absorção óptica de um dado componente numa mistura e pode, por isso, ser utilizado para identificar uma biomolécula característica, quantificá-la, determinar a sua concentração e estrutura, ou medir a actividade cinética das enzimas [12].

2.2.1. Princípios teóricos

A análise quantitativa por espectrofotometria baseia-se na interacção entre as moléculas biológicas e diversas zonas do espectro electromagnético. Em análises bioquímicas, a zona do espectro electromagnético mais frequentemente analisada é a

região visível, embora as radiações x, infravermelha e ultravioleta tenham também aplicabilidade [12, 56].

Para que as biomoléculas presentes numa dada amostra possam ser analisadas por espectrofotometria por absorção óptica, na gama da luz visível, elas devem possuir cor. Esta, pode ser intrínseca ao componente a quantificar, o que não é comum nas moléculas biológicas, ou pode, em alternativa, ser provocada por uma reacção colorimétrica específica, com adição de reagentes apropriados, que resulta na formação de um composto com cromóforos na gama da luz visível e, por isso, corado. A análise colorimétrica baseia-se, por isso, na variação da cor da amostra, consequência da variação da concentração de uma determinada molécula. O valor da absorvência determinada através de ensaios espectrofotométricos é, quando o ambiente laboratorial é controlado, directamente proporcional à concentração do componente a analisar na amostra. Para cada molécula específica, existe um comprimento de onda próprio, na região da luz visível, que garante a máxima absorvência [7, 12].

Para que as reacções colorimétricas sejam adequadas para medições espectrofotométricas, devem ser específicas, selectivas, rápidas, reprodutíveis e terem um valor de absorvência estável, durante um intervalo de tempo determinado [12].

2.2.2. Interacção da radiação electromagnética com as moléculas

Quando a radiação electromagnética incide sobre uma amostra, pode sofrer vários fenómenos ópticos – reflexão, refacção, dispersão ou absorção pelo material no qual incide, o que provoca a diminuição da quantidade de radiação transmitida através do material [7, 57].

A absorção é o processo de conversão da radiação incidente noutras formas de energia, principalmente calor, ao atingir a matéria presente na amostra. Este fenómeno gera uma atenuação do sinal do fluxo óptico, e a intensidade absorvida é função da energia dos fotões incidentes, que é inversamente proporcional ao seu comprimento de onda. A absorvência é, por isso, a fracção do fluxo incidente que é absorvida [12, 57]. Este é um processo que ocorre ao nível molecular, e está relacionado com as transições entre os níveis energéticos nos átomos e moléculas. Todas as moléculas possuem uma energia interna, para a qual contribui a energia associada aos electrões, às vibrações

entre os átomos e à rotação dos vários grupos de átomos na molécula. Assim, tanto os átomos como as moléculas possuem níveis de energia definidos, que podem ser preenchidos com os electrões que compõe a sua nuvem electrónica. Se a estrutura química da molécula se alterar, o seu espectro de absorção irá variar. Quando a energia da radiação é igual ou superior à diferença entre dois níveis energéticos moleculares, ocorre absorção, isto é, a energia da radiação é transferida para a molécula e os fotões absorvidos excitam um electrão de um estado de energia para um outro de energia superior. Deste modo, os efeitos que a radiação vai provocar na mistura em análise serão dependentes do seu comprimento de onda [7, 55, 57 – 58].

2.2.3. Cálculo da concentração: Lei de *Lambert – Beer*

A espectrofotometria é baseada na absorção de luz pelas substâncias, num comprimento de onda específico, sendo a quantidade de luz absorvida proporcional à quantidade de substância presente na amostra. Por outro lado, a absorvência e a transmitância podem ser relacionadas. Estes princípios são resumidos na lei de *Lambert – Beer* [14].

A lei de *Lambert – Beer* relaciona a intensidade da radiação incidente e transmitida com a concentração de um determinado componente numa amostra líquida, sob a forma de solução. Para a lei ser aplicada convenientemente, é importante ter em consideração que a radiação incidente deve ser monocromática, e os fenómenos de reflexão, refacção e dispersão devem ser desprezáveis. Além disso, o pH e a força iónica das soluções devem manter-se constantes, de modo a evitar desvios no equilíbrio químico e físico das espécies absorventes e não alterar a determinação da concentração através da lei de *Lambert – Beer* [59].

A intensidade transmitida decai exponencialmente na extensão do caminho óptico (espessura da amostra), bem como com o aumento da concentração das soluções, como traduz a equação 2.1.

$$I = I_0 10^{-\varepsilon_M l_c C m} \quad (2.1)$$

em que I é a radiação transmitida pela amostra, I_0 é a radiação incidente, Cm é a concentração molar, em mol/l, da solução da amostra, l_C o caminho óptico da solução, em metros, e ε_M o coeficiente de absorção molar, em l/(mol.m). Este é uma propriedade específica da substância e é função do comprimento de onda da radiação, do solvente e da temperatura [7]. As intensidades das radiações incidente e transmitida podem ser relacionadas através da transmitância (T), como a equação 2.2 indica. A transmitância é, por isso, a fracção da intensidade da radiação incidente numa amostra que é transmitida através da amostra.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.2)$$

As expressões 2.1 e 2.2 podem então ser reformuladas, reescrevendo a lei de *Lambert – Beer*:

$$T = 10^{-\varepsilon_M l_C Cm} \quad (2.3)$$

A absorvência, A , é adimensional e define-se pela equação 2.4, a partir da qual se obtêm a equação 2.5.

$$A = -\log T \quad (2.4)$$

$$A = \varepsilon_M l_C Cm \quad (2.5)$$

Como se observa pela expressão, a absorvência é directamente proporcional à concentração da solução da amostra e ao caminho óptico. Assim, desde que o coeficiente de absorção molar seja conhecido, a concentração pode ser determinada experimentalmente.

Como se deduz, a absorvência e a concentração estão directamente relacionadas, pelo que é possível traçar uma curva de calibração, ou seja, um gráfico da absorvência em função da concentração, para uma determinada biomolécula em solução e para um comprimento de onda específico. A partir da análise da curva pode determinar-se a concentração de qualquer amostra dessa biomolécula, com base no valor de absorvência

medido, desde que a concentração se encontre dentro do intervalo de linearidade da curva. Pode ainda obter-se o valor do coeficiente de absorção molar, que corresponde ao declive da região linear do gráfico [7, 12, 14, 55].

2.2.4. Métodos de leitura espectrofotométricos

As leituras em ensaios espectrofotométricos podem ser efectuadas de vários modos, apesar de a técnica de medição ser semelhante. Os métodos variam, essencialmente, com o tipo de reacção.

2.2.4.1. Espectrofotometria colorimétrica *endpoint*

Neste método, ocorre uma reacção química com *endpoint* (ou ponto final) simples. Uma reacção com *endpoint* exige um tempo de reacção entre analito e reagente até que a reacção completa de todas as moléculas presentes nos fluidos ocorra, e aí a concentração de amostra poderá ser determinada. A presença da molécula a detectar e dos reagentes leva então à formação de um composto colorido (cromogénio), do qual é medida a capacidade de absorção da luz visível. Efectua-se uma única medição da absorvência [14, 60].

2.2.4.2. Espectrofotometria enzimática *endpoint*

Neste método de leitura, é usada uma enzima que catalisa a reacção química. Normalmente, o produto final é uma coenzima capaz de absorver luz em baixos comprimentos de onda do espectro visível ou mesmo perto da zona ultra-violeta. Uma vez mais, e como se trata de uma reacção *endpoint*, é apenas efectuada uma medição da absorvência do produto da reacção, quando esta se conclui [14].

As reacções *endpoint* podem ser classificadas como *endpoint* positivo ou negativo, dependendo do valor final de absorvência (isto é, se este é superior ou inferior

ao valor inicial na reacção). Como exemplos de analitos que tipicamente usam reacções *endpoint* positivo podem referir-se a glicose, cálcio e albumina. A ureia é um exemplo de uma molécula detectada por *endpoint* negativo [60].

2.2.4.3. Espectrofotometria cinética

Neste método, para a quantificação de actividade enzimática (pelas suas propriedades catalíticas), a taxa de formação dos produtos da reacção é determinada por uma mudança na absorvência por minuto. Na análise cinética, são efectuadas múltiplas medições da absorvência ao longo do tempo. As alterações médias na absorvência por minuto são determinadas para avaliar as condições da reacção e melhorar a precisão na determinação da actividade da enzima.

A cinética de ordem zero é a que avalia a actividade enzimática de modo mais preciso, visto todos os centros activos da enzima se encontrarem ligados ao substrato. Nesta situação, a concentração de substrato está em excesso e todas as outras condições da reacção são óptimas para garantir a máxima velocidade de catálise da enzima. Deste modo, a variação da absorvência por minuto (A/min) é constante, apesar de poder haver um aumento ou diminuição linear na absorvência do produto formado. Se a variação da absorvência não for constante, então é considerada outra qualquer variável além da actividade enzimática e os resultados não devem ser calculados. Assim, neste método torna-se vantajosa a diluição da amostra de enzima, diminuindo assim a razão enzima/substrato e aumentando a precisão da análise da cinética.

A actividade *endpoint* é determinada medindo uma absorvência inicial no fim de uma fase de incubação e uma segunda absorvência no final de uma unidade de tempo específica, podendo assim determinar-se a variação na absorvência por minuto e avaliar a actividade enzimática [14].

2.2.5. Instrumentação

O espectrofotómetro é o equipamento necessário para a medição do espectro de absorção de uma determinada biomolécula. Este opera, normalmente, nas regiões

visível, ultravioleta e infravermelho do espectro electromagnético. A constituição básica de um espectrofotómetro de feixe único compreende uma fonte luminosa, um filtro monocromador, um recipiente para a amostra, um fotodetector, um dispositivo de leitura e uma fonte energética (figura 2.1) [7, 14, 55].

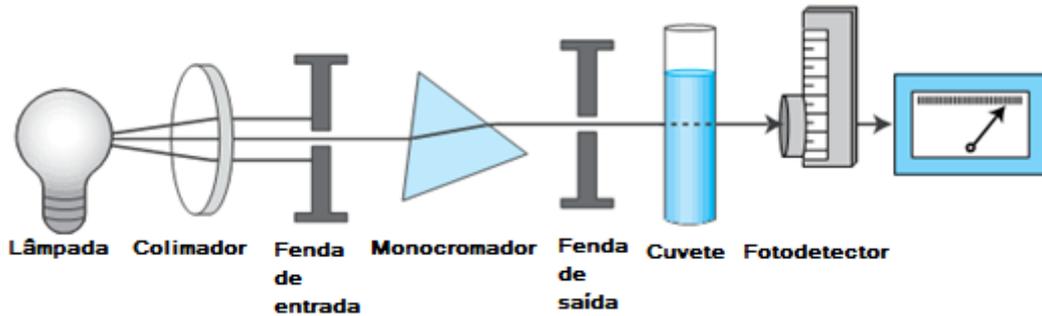


Figura 2.1 - Diagrama de blocos simplificado de um espectrofotómetro de feixe simples [14].

A fonte de luz emite radiação electromagnética em vários comprimentos de onda e, dependendo da zona do espectro, são utilizadas diferentes lâmpadas. As mais frequentemente utilizadas são as lâmpadas de deutério, hidrogénio, xénon e tungsténio [7, 14, 55, 57 – 58].

A luz que as fontes emitem é composta, ou seja, é necessário separar o feixe nos seus comprimentos de onda, e focalizar o comprimento de onda desejado sobre a amostra, de modo que apenas este incida sobre ela. Para isso, recorre-se ao monocromador, geralmente baseado em redes de difracção, prismas e filtros de absorção ou de interferência [14, 55 – 56, 58].

A luz, agora monocromática, atravessa a cuvete com a amostra e, ao chegar ao detector, é registada a intensidade transmitida e convertida em energia eléctrica. Os fotomultiplicadores são os detectores mais usados, devido à elevada sensibilidade que possuem (capacidade de detectar baixas intensidades luminosas). Contudo, actualmente, os fotodíodos de silício estão a ser cada vez mais utilizados, devido às reduzidas dimensões e baixo custo, o que permite a sua utilização em dispositivos miniaturizados com eficácia, numa gama do espectro electromagnético entre os 200 e os 1000 nm. Os fotodíodos são fotossensores caracterizados pela presença de uma junção semicondutora, na qual a radiação incide e separa os electrões e as lacunas, o que origina uma corrente eléctrica [7, 14, 55, 57 – 58, 61].

Além dos espectrofotómetros de constituição mais simples, existem também espectrofotómetros de feixe duplo, cujos resultados são mais precisos. Nesta

configuração, o sinal de saída corresponde a uma combinação sincronizada dos sinais na amostra e num compartimento de referência, ou seja, é calculado pela razão entre eles [57 – 58]. Deste modo, evitam-se os desvios que podem ocorrer devido a pequenas flutuações da fonte de luz.

3. Microagitação Acústica

O presente capítulo aborda os princípios teóricos da microagitação acústica, dando ênfase à microagitação gerada por transdutores piezoelétricos – fenómeno designado por *quartz wind*. São ainda referidas várias técnicas de mistura activas e passivas.

3.1. Mistura passiva e activa de fluidos

A mistura em microdispositivos fluídicos pode ser promovida de forma activa ou passiva, recorrendo a estruturas miniaturizadas, integradas nos sistemas fluídicos. Nas estruturas activas, estão presentes partes móveis ou são utilizadas forças externas para promover a mistura, e esta ocorre pela interacção das interfaces com o fluxo, modificando-o. Nas estruturas passivas, não se verifica a presença de partes móveis e a mistura ocorre em virtude da própria geometria e tipologia da estrutura.

O comportamento e o movimento dos fluidos nos dispositivos à escala micro podem, assim, ser regulados pelo uso de estruturas microfluídicas passivas. São várias as estruturas desenvolvidas com este objectivo, e cujo sucesso foi já demonstrado [2, 5, 8, 10]. Nesta categoria, podem incluir-se obstáculos, extractores por difusão, filtros passivos e membranas. Os sistemas e dispositivos microfluídicos passivos apresentam algumas vantagens para incorporação em microdispositivos para análises bioquímicas, uma vez que permitem integração fácil e apresentam baixo custo, o que se torna adequado para utilização em microdispositivos que se pretendem portáteis e

descartáveis. Contudo, os misturadores passivos apresentam como desvantagens o difícil fabrico, devido à complexidade dos microcanais, a existência de canais longos e, conseqüentemente, longos tempos de trânsito. Por outro lado, os dispositivos activos baseados em MEMS, tais como microbombas e microválvulas, facilitam o bombeamento e a mistura dos fluidos, mas aumentam o custo do dispositivo, necessitam de sistemas de controlo complexos e a sua integração é também complexa.

A maioria dos sistemas de análise bioquímica requer dispositivos capazes de controlar, com elevada precisão, volumes de amostras e reagentes na ordem dos nanolitros [72]. A microagitação acústica gerada pela utilização de filmes piezoeléctricos activos pode ser, por isso, uma boa alternativa ou complemento à utilização de estruturas microfluídicas passivas. Apesar de ser uma técnica activa, supera as limitações anteriormente referidas, uma vez que não possui partes móveis, é de fácil integração e tem baixo custo de produção. Além de estes materiais apresentarem uma enorme facilidade de fabrico, baseada apenas na deposição de filmes finos, a microagitação que promovem é facilmente controlada, através da escolha da frequência e amplitude do sinal de excitação, e da espessura do transdutor adequada à aplicação.

Contudo, e apesar das vantagens que os dispositivos baseados em microagitação incorporam, apresentam também algumas desvantagens, no que diz respeito, principalmente, à ineficiência do fenómeno de microagitação acústica a uma escala tão miniaturizada. A microagitação acústica é um fenómeno não linear, de segunda ordem, pelo que apenas uma pequena fracção da energia acústica é convertida em energia cinética e transmitida para o fluido (numa ou duas ordens de magnitude a menos). Estudos práticos remontam para uma eficiência máxima de 3%, o que limita significativamente a aplicabilidade da agitação em casos onde uma elevada potência seja exigida [7, 62, 63].

A pressão gerada e a velocidade da microagitação acústica são, ainda, limitadas pelo aquecimento e cavitação. Isto deve-se ao facto de grande parte da energia acústica ser convertida em calor [7, 63]. Uma das principais conseqüências observadas no uso de transdutores piezoeléctricos é, por isso, o aquecimento do sistema a pressão constante, produzindo uma resposta piroeléctrica, para além da resposta piezoeléctrica esperada [71]. Uma vez que a microagitação acústica é caracterizada pela produção acentuada de calor à medida que as ondas acústicas se propagam através dos fluidos, é uma técnica desaconselhada em aplicações termossensíveis [62]. Contudo, no presente trabalho, em

que são analisados fluidos biológicos, e em que a maioria das análises deve realizada à temperatura óptima de 37 °C, a produção de calor torna-se vantajosa. O aumento de temperatura acelera a reacção dos fluidos e reagentes e diminui, por isso, o tempo necessário para concluir várias reacções químicas endotérmicas.

3.2. Princípios Físicos

Nos sistemas microfluídicos, as dimensões são muito reduzidas, tipicamente na ordem dos 100 μm , e as velocidades são também baixas (ordem de 1 mm/s). Deste modo, o número de *Reynolds* em microfluidos é tipicamente menor que 1, pelo que o regime de fluxo é laminar, e a mistura ocorre apenas por difusão.

Promover a agitação de fluidos em regime laminar é uma tarefa inibida pela ausência de turbulência e limitada pela difusão. O tempo médio de difusão, T_D , de uma pequena quantidade de partículas numa distância L_D , é dado por: $T_D = L_D^2/C_D$, em que C_D é o coeficiente de difusão, ou seja, a facilidade com que a partícula se desloca ao longo do fluido. O tempo de mistura pode, por isso, ser reduzido através da redução da distância a percorrer pela partícula ou do aumento da área de contacto entre os fluidos que se pretendem misturar, mantendo o volume constante [62, 63, 64].

Se a mistura ocorrer apenas por difusão, são necessários tempos de trânsito elevados ou canais complexos e/ou longos para que esta ocorra. Para que a mistura seja mais eficiente, podem utilizar-se métodos alternativos de mistura, como a microagitação acústica. Esta pode ser promovida através de actuadores piezoeléctricos, que geram ondas acústicas devido ao efeito piezoeléctrico (descrito no capítulo 4).

Para que o efeito piezoeléctrico possa ser aproveitado para microagitação de fluidos, é necessário que a energia eléctrica seja convertida em ondas acústicas, e que estas se propaguem numa direcção perpendicular à superfície do material piezoeléctrico, promovendo o movimento dos fluidos num fenómeno denominado por agitação acústica (*acoustic streaming*) [7]. Este conceito foi inicialmente abordado por *Rayleigh* [63, 65 – 67]. Quando ondas acústicas de elevada amplitude se propagam ao longo do fluido provocam o seu movimento. A energia acústica é transmitida para o fluido, onde uma parte é dissipada sob a forma de calor e a restante é convertida em energia cinética. A intensidade da agitação acústica aumenta com a frequência de vibração, até à frequência

de ressonância do material piezoelétrico (ver capítulo 4), e com a amplitude dos sinais de actuação [62, 66].

A agitação acústica envolve uma camada fronteira viscosa, cuja espessura é definida como $\delta = \sqrt{2\nu/\omega}$, sendo δ a espessura da camada, ν a viscosidade cinética do meio e ω a frequência angular da onda. O meio exterior à camada fronteira vibra em concordância com o campo acústico, enquanto no meio interior à camada limite gera-se um fluxo de ar circular [66 – 67]. A figura 3.1 representa esquematicamente a microagitação na camada fronteira e no seu exterior.

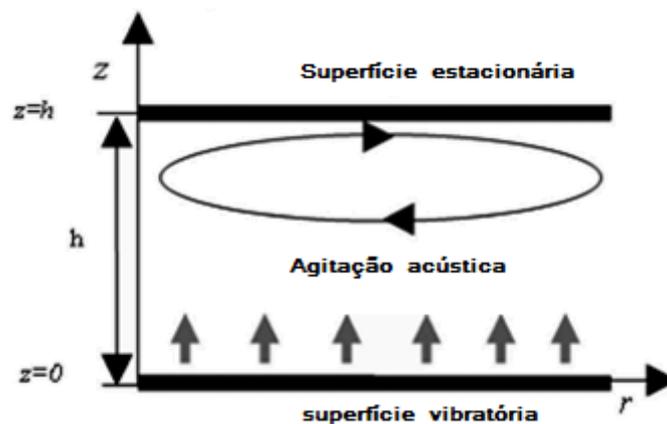


Figura 3.1 - Representação esquemática da microagitação acústica no interior e exterior da camada fronteira [66].

A microagitação acústica apresenta duas vantagens no que concerne à sua aplicação em dispositivos microfluídicos. Uma delas está relacionada com o facto de a microagitação eliminar o efeito das forças viscosas associadas aos canais em micro escala. A segunda vantagem é que, com a diminuição do diâmetro do canal, as forças que promovem a agitação são favorecidas, sendo maior a força por unidade de área. Assim, à medida que o diâmetro do canal diminui, a contribuição da camada acústica de fronteira para a velocidade de microagitação torna-se mais preponderante. Estas conclusões são baseadas nos estudos de *Nyborg* para a agitação entre placas paralelas de extensão infinita [62, 68].

Nyborg desenvolveu um conjunto de equações para representar a agitação acústica, que combinam as equações de *Navier-Stokes*, equações de continuidade e equações dinâmicas, resultando numa expressão para a força por unidade de volume.

Nessas equações, *Nyborg* assumiu que a onda acústica é propagada ao longo de um canal cilíndrico de secção constante e preenchido por um fluido viscoso. Assumiu ainda que uma onda acústica plana axial, de amplitude conhecida, é introduzida numa das extremidades do canal, preenchendo-o na totalidade da sua secção, e que as paredes do canal são rígidas [62, 66].

A equação 3.1 fornece a força efectiva por unidade de volume, unidimensional, para a área completa no interior do canal [62, 68].

$$F_x = F_{xa} + F_{xs} \quad (3.1)$$

F_{xa} e F_{xs} representam as forças, por unidade de volume, devido às perdas por viscosidade e às ondas acústicas próximas da fronteira, respectivamente.

Devido à importância da agitação induzida na camada fronteira, representada por F_{xs} , a microagitação acústica torna-se num método viável para aplicações microfluídicas. A força F_{xs} apresenta uma amplitude relativamente elevada, apesar de ocorrer numa porção reduzida da secção do canal [62, 68].

A velocidade acústica, U_1 , nas direcções axial e radial (em relação à fonte acústica) pode ser determinada com base na velocidade da fonte acústica, no coeficiente de absorção acústica, e no número de onda, com as condições fronteira adequadas [62, 66, 68]. A velocidade de agitação, U_2 , é dada por:

$$U_2 = U_{2a} + U_{2s} \quad (3.2)$$

Em que U_{2a} e U_{2s} são as velocidades de agitação devido aos efeitos da viscosidade e à camada fronteira, respectivamente. A velocidade de agitação devido aos efeitos da viscosidade varia com o diâmetro do canal, enquanto a velocidade de agitação devido aos efeitos da camada fronteira é independente do tamanho do canal.

Assim, em canais de larga escala, a contribuição da agitação induzida pela camada fronteira é mínima. À medida que o diâmetro do canal diminui, a contribuição das interacções da camada limite para a velocidade de agitação torna-se mais significativa [62]. A figura 3.2 representa a contribuição parcial da agitação na camada limite para a agitação total do fluido, para várias frequências de agitação.

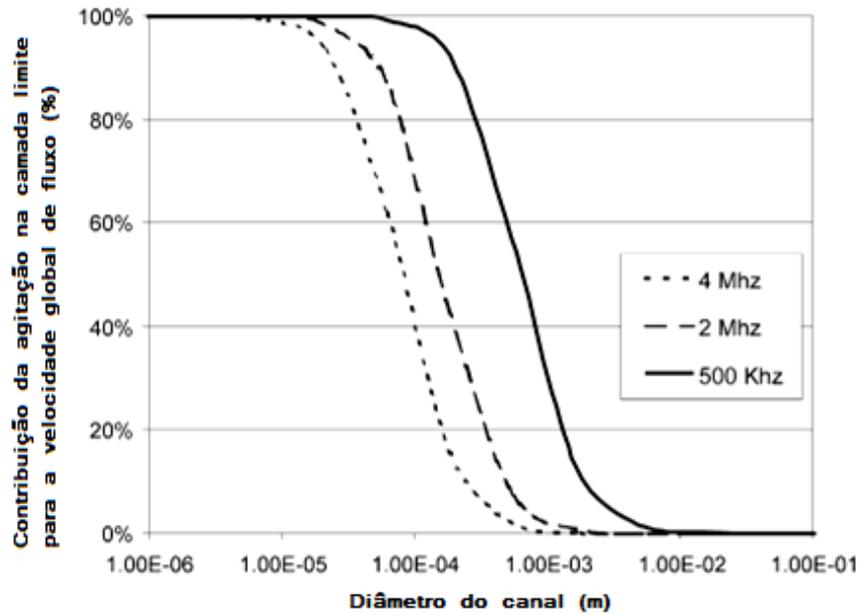


Figura 3.2 - Contribuição relativa da agitação promovida na camada limite para a velocidade global de fluxo [62].

As velocidades médias de fluxo são calculadas pelas médias das várias velocidades através do diâmetro do canal. Estes resultados são, geralmente, considerados válidos quando a camada limite acústica é pequena em relação ao diâmetro do canal [62].

O impacto da camada limite é função da posição radial no canal, e é superior junto às paredes. Além disso, a espessura desta camada mantém-se inalterada mesmo com a diminuição do diâmetro do canal, ocupando por isso uma maior área relativa, junto às paredes do canal. À medida que o diâmetro decresce, a velocidade de agitação devido à camada limite permanece constante, enquanto a velocidade de agitação devida aos efeitos da viscosidade diminui. Além disso, quando a agitação devido à camada de fronteira se torna dominante, a velocidade média de fluxo torna-se constante com a diminuição do diâmetro do canal. Deste modo, conclui-se que a microagitação acústica é desejável como meio de mistura de fluidos em dispositivos microfluídicos, com canais de dimensões reduzidas (inferiores a 100 μm).

A frequência das ondas acústicas tem também um impacto significativo na quantificação da microagitação acústica. Esta, aumenta proporcionalmente ao quadrado da frequência, em canais onde o comprimento de onda é pequeno em comparação com o diâmetro do canal. Contudo, quando o comprimento de onda é da ordem ou superior ao

diâmetro do canal, a velocidade média de microagitação aumenta exponencialmente em relação à frequência. Além do diâmetro dos canais e da frequência das ondas acústicas, também as propriedades dos fluidos influenciam a velocidade da agitação acústica [62].

3.3. *Quartz wind*

O fenómeno designado por *quartz wind* foi introduzido em 1978, por *Lighthill*, no seguimento do trabalho de *Rayleigh* no final do século XIX [69]. Este fenómeno é a designação dada a um tipo particular de agitação acústica, estudado mais recentemente, e que se baseia no uso de ultrassons, ou seja, feixes acústicos de elevada frequência (superior a 20 kHz). A agitação através deste fenómeno ocorre devido à absorção dos feixes acústicos pelos fluidos, induzindo o seu fluxo [63, 69]. Esta absorção resulta numa força de radiação no próprio fluido, na direcção de propagação e atenuação acústica, por acção de uma tensão de *Reynolds*. Esta força promove, assim, o movimento dos fluidos em curtas distâncias, podendo ser direccionado em feixes acústicos. Matematicamente, a força gerada por unidade de volume, num fluido que se encontra num reservatório ou canal, é resultado do decaimento exponencial da intensidade acústica, e é representada pela equação 3.3 [7, 63, 65, 69 – 70],

$$F = \frac{I_A}{v} \frac{e^{-x/l_\mu}}{l_\mu} \quad (3.3)$$

em que I_A representa a intensidade acústica, v a velocidade do som no fluido, x a distância da fonte acústica e l_μ o comprimento de absorção no fluido ou o inverso do coeficiente de absorção do fluido.

A equação pode ser derivada para a velocidade *quartz wind* de um fluxo entre placas paralelas, considerando $x/l_\mu \ll 1$, ou seja, uma secção transversal do comprimento bastante inferior ao comprimento de absorção. O comportamento é semelhante à pressão que conduz o fluxo em canais rectangulares infinitamente grandes. Nestas circunstâncias, a força gerada corresponde ao gradiente de pressão e é representada por I_A/vl_μ . A velocidade de fluxo resultante através de um canal infinitamente grande e preenchido com um campo acústico é, por isso, parabólica, com velocidade nula nas paredes do canal e velocidade máxima no centro do canal. O feixe acústico gerado pode ser dirigido ao longo do canal, desde que, a onda acústica seja

pequena em comparação com a largura do transdutor piezoelétrico, ou através de reflexão acústica total. Para feixes que preencham parcialmente um canal ou um reservatório, desenvolve-se uma recirculação ao longo das paredes [7, 63, 69].

A velocidade média, u , é representada pela equação 3.4, para um canal com secção transversal de comprimento muito menor que o comprimento de absorção e sem impedância acústica externa.

$$u = \frac{1}{v} \frac{R_m^2}{7.11\eta l_\mu} \quad (3.4)$$

em que R_m corresponde a meia largura do canal e η à viscosidade do fluido [7, 63]. A equação acima apresenta uma expressão de cálculo da velocidade de escoamento para capilares com uma largura na ordem dos milímetros e um comprimento de 1 cm. Para uma frequência de 50 MHz, são obtidas velocidades de milímetros por segundo. Podem obter-se velocidades mais elevadas diminuindo o comprimento do canal ou aumentando a frequência, o que diminuiria os comprimentos de absorção, visto este ser inversamente proporcional ao quadrado da frequência. Em sistemas microfluídicos, é importante que as frequências sejam suficientemente elevadas, de modo a reduzir o comprimento de absorção para um valor inferior ao comprimento do canal, e assim minimizar a intensidade acústica reflectida. Para partículas esféricas que absorvem totalmente a radiação acústica, pode determinar-se a velocidade média através da expressão 3.5. Se a partícula for totalmente reflectora, a velocidade será duas vezes superior [7, 63, 70].

$$u = \frac{1}{v} \frac{R_m}{6\eta} \quad (3.5)$$

Em canais fechados, preenchidos acusticamente ou com uma impedância externa elevada, desenvolve-se um gradiente de pressão, permitindo o bombeamento dos fluidos e a sua circulação. Assim, a pressão p_f , a uma distância x da fonte acústica, é definida pela expressão apresentada na equação 3.6 [7, 63].

$$p_f = \frac{1}{v} (1 - e^{-x/l_\mu}) \quad (3.6)$$

3.4. Aplicação da microagitação acústica num *Lab-on-a-chip*

De modo simplificado, o *Lab-on-a-chip* é um dispositivo composto por três partes básicas: um sistema microfluídico contendo os microcanais e as câmaras de reacção, um sistema de filtros ópticos de banda estreita e um sistema de detecção e leitura fabricado por processos CMOS.

Num sistema de microcanais fechado, o fluxo dos líquidos ocorre devido a diferenças de pressão, e é definido pela geometria [74]. Nesse dispositivo, a microagitação e mistura podem ser promovidas através da incorporação de um filme piezoeléctrico na base das câmaras de reacção. A aplicação de um sinal eléctrico no filme é responsável pela geração de ondas acústicas, que se propagam na câmara, ao longo do corpo do fluido, agitando-o.

O uso de um polímero piezoeléctrico, como o PVDF, pode apresentar-se vantajoso, quando comparado com outros sistemas de agitação e mistura de microfluidos. Além do baixo custo e da facilidade de manipulação, o PVDF é um polímero transparente, com boa transmitância para comprimentos de onda na zona visível do espectro electromagnético. Esta é uma condição essencial, visto ser necessário que o filme piezoeléctrico, assim como os seus eléctrodos, permitam a passagem da luz até ao detector. No capítulo seguinte aborda-se em pormenor o polímero piezoeléctrico a ser utilizado no *Lab-on-a-chip*.

4. Transdutores Piezoelétricos

Este capítulo aborda os princípios físicos da piezoelectricidade, explicando a base do comportamento piezoelétrico de vários materiais. São referidas as equações fundamentais deste fenómeno, bem como os conceitos teóricos associados. O capítulo estuda ainda as propriedades químicas e físicas do polímero piezoelétrico escolhido – o poli (fluoreto de vinilideno), bem como a sua estrutura química e molecular. Este capítulo aborda ainda as principais propriedades eléctricas e ópticas dos eléctrodos condutores transparentes, bem como os seus métodos de deposição mais frequentes. De modo detalhado, este capítulo analisa o óxido de índio - estanho.

4.1. Piezoelectricidade

Com origem na palavra grega *piezein*, que significa pressão, a piezoelectricidade foi descoberta no final do século XIX por Pierre e Jacques Curie, durante um estudo do efeito da pressão na geração de carga eléctrica em cristais [7, 75 – 76]. É uma propriedade electroactiva, cujo comportamento físico se encontra directamente relacionado com a estrutura química e cristalina dos materiais.

A piezoelectricidade pode ser observada em materiais que não apresentam centros de simetria, isto é, que sejam anisotrópicos [7, 75, 77]. Os cristais piezoelétricos são aqueles que, quando sujeitos a uma tensão mecânica, provocam uma

alteração na polarização. Os materiais podem ainda classificar-se em cristais polares e cristais não polares. Os polares são polarizados espontaneamente e, conseqüentemente, possuem um único eixo polar. Sabe-se que os cristais polares são, além de piezoelétricos, piroelétricos. Deste modo, nestes cristais uma variação na temperatura produz uma variação na polarização do cristal [77 – 78].

O efeito piezoelétrico pode ser directo ou inverso. O efeito piezoelétrico directo consiste na conversão de energia mecânica em energia eléctrica, ou seja, de acordo com este fenómeno, quando um material é sujeito a uma tensão mecânica, são desenvolvidas cargas positivas e negativas na superfície do material, gerando-se um potencial eléctrico entre dois eléctrodos colocados paralelamente nas duas faces opostas do material. Antes de o material ser sujeito a uma força mecânica externa, os centros de gravidade das cargas negativas e positivas das moléculas coincidem, pelo que os efeitos das cargas se cancelam e a molécula é electricamente neutra. Quando se exerce uma força sobre o material, a estrutura molecular é deformada, ocorrendo separação dos centros de gravidade das cargas positivas e negativas. Esta separação gera uma distribuição de cargas na superfície do material, resultando na sua polarização (figura 4.1). Num processo inverso, surge uma deformação mecânica do material quando sujeito a um campo eléctrico [75, 78 – 80].



Figura 4.1 - Formação de um dipolo eléctrico por aplicação de uma tensão mecânica. Os círculos vermelhos da figura representam as cargas positivas e os verdes as cargas negativas [80].

De modo abreviado, o efeito piezoelétrico pode ser descrito pelas relações lineares apresentadas nas equações 4.1 e 4.2, baseadas em princípios termodinâmicos e na consideração inicial de que, como foi já referido, o material não possui centro de simetria [7, 79].

$$\text{Efeito directo:} \quad D = dP + \varepsilon E \quad (4.1)$$

$$\text{Efeito inverso:} \quad S = sP + dE \quad (4.2)$$

Em que D representa o vector deslocamento eléctrico, d o coeficiente piezoeléctrico, P a tensão mecânica, ϵ a permitividade dieléctrica, E o campo eléctrico, S a deformação e s o coeficiente elástico. Como se observa da análise das expressões acima apresentadas, o campo eléctrico aplicado, E , e a deformação, S , encontram-se relacionados linearmente [75, 78].

Se, em vez de uma única deformação, o material vibrar, observar-se-á um sinal eléctrico alternado entre os eléctrodos, com uma frequência correspondente à frequência de vibração do material. Do mesmo modo, a aplicação de um sinal eléctrico alternado provocará a vibração do material. É este comportamento que dá origem à microagitação acústica estudada neste trabalho.

Deve ainda referir-se que a frequência e amplitude do sinal eléctrico têm um papel importante na vibração do material. O efeito piezoeléctrico atinge uma intensidade máxima quando a frequência do sinal eléctrico aplicado aos contactos do material piezoeléctrico é semelhante à frequência de ressonância natural do cristal [7].

4.1.1. Coeficientes e equações fundamentais

O efeito piezoeléctrico pode ser descrito matematicamente. De modo a representar este efeito convenientemente, é necessário descrever as propriedades do material envolvido, pelo que são vários os coeficientes piezoeléctricos, elásticos e dieléctricos utilizados para caracterizar os materiais anisotrópicos, em termos de tensão, força mecânica, densidade de fluxo eléctrico, campo eléctrico e tensores dieléctricos [81]. Assim, são definidos conjuntos de coeficientes eléctricos e conjuntos de coeficientes elásticos de forma a relacionar os sistemas eléctrico e mecânico. Mais ainda, de acordo com as condições necessárias da medição, são definidos uma tensão mecânica, uma deformação mecânica, um campo eléctrico ou um vector de deslocamento eléctrico, todos constantes. Quanto maior a simetria apresentada pelo material, mais reduzido é o número de coeficientes diferentes de zero. Com base nos coeficientes referidos, e tendo em atenção o sistema termodinâmico, isto é, considerando as diferentes formas de energia de *Gibbs*, pode descrever-se o efeito piezoeléctrico com base nas equações que se seguem [7].

$$\begin{aligned}
 S_j &= s_{ij}^E P_j + d_{mi} E_m & S_i &= s_{ij}^D P_j + g_{mi} D_m \\
 D_n &= d_{mi} P_i + \varepsilon_{mn}^P E_m & E_m &= -g_{mi} P_i + \beta_{mn}^P D_n \\
 P_i &= c_{ij}^E S_j - e_{mi} E_m & P_i &= c_{ij}^D S_j - h_{mi} D_m \\
 D_n &= e_{mi} S_i + \varepsilon_{mn}^S E_m & E_m &= -h_{mi} S_i + \beta_{mn}^S D_n
 \end{aligned} \tag{4.3}$$

em que:

i, j : 1, 2, ..., 6.

m, n : 1, 2, 3.

β : coeficientes dieléctricos.

d, g, e, h : coeficientes piezoeléctricos.

d_{mi} : coeficiente piezoeléctrico.

ε_{mn} : permitividade dieléctrica.

D_n : vector deslocamento eléctrico.

E_m : campo eléctrico.

P_1, P_2, P_3 : tensões de tracção ou compressão.

P_4, P_5, P_6 : tensões de cisalhamento.

S_1, S_2, S_3 : deformações puras.

S_4, S_5, S_6 : deformações de cisalhamento.

Os diferentes índices superiores apresentados ao longo das equações são representativos dos coeficientes que se mantêm constantes, nomeadamente o campo eléctrico E , o vector deslocamento eléctrico D , a tensão mecânica P e a deformação S . Por sua vez, a presença de dois sub-índices nos coeficientes é indicadora de uma relação entre quantidades eléctricas e mecânicas. O primeiro índice inferior indica a direcção do campo eléctrico associado ao potencial aplicado ou carga produzida, enquanto o segundo aponta para a direcção da tensão ou deformação mecânica [7, 78].

A presença dos índices inferiores indica que, na prática, a transferência de energia decorrente do efeito piezoeléctrico ocorre num sistema tridimensional complexo. Daí o facto de vários dos coeficientes serem apresentados sob a forma de

tensores. Define-se, por isso, convencionalmente, um sistema de eixos (1, 2 e 3) para identificação das direcções das forças que afectam o material piezoeléctrico. O eixo 3 corresponde à linha central, e denomina-se de eixo polar, paralelo à direcção de polarização do material. Este sistema considera ainda três direcções de torção 4, 5 e 6, perpendiculares às direcções 1, 2 e 3, respectivamente. A figura 4.2 apresenta uma representação gráfica do sistema de eixos acima descrito [77, 78].

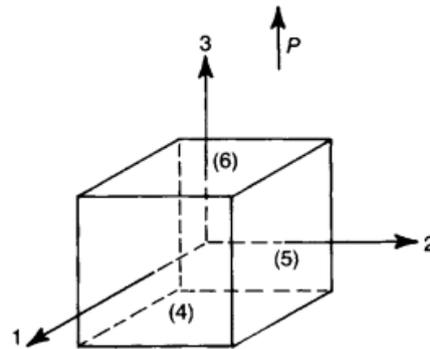


Figura 4.2 - Sistema de eixos ortogonal para definição das direcções das forças que afectam um material piezoeléctrico [77].

Numa amostra piezoeléctrica, são vários os parâmetros a ter em conta, que relacionam as energias mecânica e eléctrica envolvidas no efeito piezoeléctrico. O coeficiente de acoplamento electromecânico, k_{em} , é um factor que representa o nível da eficiência na geração de ondas acústicas, ou seja, a capacidade do material piezoeléctrico converter uma forma de energia noutra. O seu quadrado é definido pelo quociente entre a energia mecânica ou eléctrica que é convertida e a energia total de entrada no sistema, como representado nas equações 4.4 e 4.5, para o efeito piezoeléctrico directo e inverso [7, 77].

$$\text{Efeito directo: } k_{em}^2 = \frac{\text{energia mecânica convertida em energia eléctrica}}{\text{energia mecânica total de entrada}} \quad (4.4)$$

$$\text{Efeito inverso: } k_{em}^2 = \frac{\text{energia eléctrica convertida em energia mecânica}}{\text{energia eléctrica total de entrada}} \quad (4.5)$$

Este parâmetro depende das direcções da tensão e do campo eléctrico, pelo que é um tensor, estando por isso associado a sub-índices.

Deve considerar-se também o coeficiente de deformação, d , que relaciona a deformação mecânica produzida com a aplicação de um determinado campo eléctrico (equação 4.6). Valores elevados deste parâmetro indicam grandes deslocamentos mecânicos. Este coeficiente relaciona ainda a carga registada nos eléctrodos com a tensão mecânica aplicada (equação 4.7).

$$\text{Efeito inverso:} \quad d = \frac{\text{Força desenvolvida}}{\text{Campo eléctrico aplicado}} \quad (4.6)$$

$$\text{Efeito directo:} \quad d = \frac{\text{Densidade de carga}}{\text{Tensão mecânica aplicada}} \quad (4.7)$$

Tal como em relação ao parâmetro k_{em} , também o coeficiente de deformação depende das direcções da tensão e campo eléctrico, pelo que apresenta sub-índices [7].

Frequentemente, determina-se ainda um coeficiente de diferença de potencial, g , que considera a tensão eléctrica aplicada ou desenvolvida, consoante o efeito piezoeléctrico é inverso ou directo. Este pode ser calculado pela expressão 4.8, se o efeito piezoeléctrico for directo, ou pela expressão 4.9, se for o efeito inverso [78].

$$\text{Efeito directo:} \quad g = \frac{\text{diferença de potencial desenvolvida}}{\text{tensão mecânica aplicada}} \quad (4.8)$$

$$\text{Efeito inverso:} \quad g = \frac{\text{deformação desenvolvida}}{\text{diferença de potencial aplicada}} \quad (4.9)$$

4.1.2. Circuito equivalente e resposta em frequência

Os valores das propriedades piezoelétricas de um material podem ser obtidos do seu comportamento em ressonância, quando sujeito a um campo eléctrico que varia sinusoidalmente [77].

Na frequência de ressonância a impedância eléctrica do piezoeléctrico atinge um valor mínimo, uma vez que as contribuições capacitivas e indutivas para a impedância eléctrica se anulam, sendo por isso a impedância puramente resistiva. Esta frequência de ressonância, f_r , pode ser determinada pela equação 4.10, com base nos elementos do circuito eléctrico equivalente.

$$f_r = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{L_1 C_1}} \quad (4.10)$$

Em que L_1 é uma indutância que equivale à inércia do sistema mecânico, e C_1 é uma capacidade que equivale à rigidez mecânica.

Aumentando ligeiramente a frequência, a impedância atinge um máximo, dizendo-se então que o piezoeléctrico se encontra em anti-ressonância. Para esta frequência, as contribuições capacitiva e indutiva para a impedância eléctrica são máximas. A frequência de anti-ressonância, f_a , pode ser determinada pela equação 4.11.

$$f_a = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{C_0 + C_1}{L_1 C_0 C_1}} \quad (4.11)$$

Em que C_0 corresponde à capacidade eléctrica do elemento piezoeléctrico.

A figura 4.3 mostra a variação da impedância do material piezoeléctrico em função da frequência. O material piezoeléctrico apresenta um comportamento capacitivo para frequências inferiores à frequência de ressonância (f_r) e superiores à frequência de anti-ressonância (f_a), apresentando um comportamento indutivo entre f_r e f_a [78]. Na frequência de ressonância, a impedância é mínima, pelo que a transmissão de ondas sonoras é máxima.

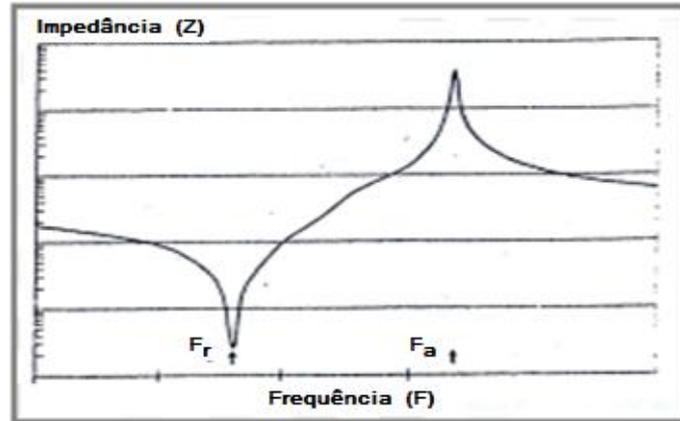


Figura 4.3 - Curva de impedância associada a um elemento piezoelétrico [78].

Para que a vibração e conseqüente transmissão das ondas geradas seja máxima, é importante que a frequência do sinal elétrico aplicado corresponda à frequência de ressonância do material, específica para a sua espessura. Esta é determinada pela expressão 4.12.

$$F_R = \frac{v}{2t} \quad (4.12)$$

Em que v é a velocidade do som no filme piezoelétrico e t a espessura [7].

4.2. Polímero PVDF como transdutor piezoelétrico

O poli(fluoreto de vinilideno), denominado também por PVDF, é um polímero bastante estudado, sendo caracterizado pelas excelentes propriedades electroactivas, nomeadamente a piezoelectricidade e a piroelectricidade, pela elevada constante dielétrica, e pelas diversas fases cristalinas, o que o torna aplicável em muitas áreas. Comercialmente, o PVDF é disponibilizado sob a forma de pós ou filmes semi-transparentes [7, 75 – 76].

A nível molecular, o PVDF é um polímero hidrocarbonado linear formado pelo encadeamento de monómeros de fluoreto de vinilideno (VDF), ou seja, por reacções de adição, e apresenta como fórmula molecular $-(\text{CH}_2\text{CF}_2)_n-$. A uma temperatura de 25 °C

e a uma pressão de 1 atm, este monómero apresenta-se em fase gasosa, estável, com uma solubilidade inferior a 0,02 g por 100 g de água e com uma reduzida toxicidade. A síntese comercial do VDF envolve reacções de pirólise gasosa. A figura 4.4 apresenta a estrutura do monómero VDF e da unidade repetitiva do PVDF, obtida por polimerização. No PVDF, os monómeros apresentam-se espaçados por 2,6 Å, e as cadeias apresentam uma estrutura regular com grupos CH₂ e CF₂ alternados [7, 75, 79, 81 – 82].

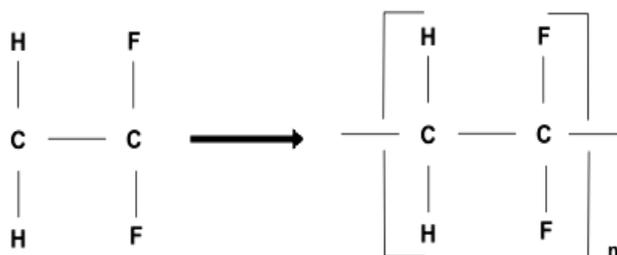


Figura 4.4 - Estrutura do monómero VDF e do PVDF obtido por polimerização.

4.2.1. Estrutura molecular

O PVDF é um polímero polimorfo sintético que apresenta estrutura semicristalina (isto é, apresenta fases cristalinas e amorfas). Cristaliza, geralmente, na fase α , numa estrutura esferulítica, em que os esferulitos são formados por regiões lamelares que crescem radialmente, durante a cristalização, a partir de um centro comum. Entre as lamelas cristalinas localiza-se a região amorfa do material. O PVDF pode cristalizar ainda em fase β , numa estrutura aproximadamente hexagonal fechada, com os dipolos das cadeias alinhados ao longo da estrutura [7, 76, 82].

O PVDF apresenta dipolos eléctricos permanentes, na direcção normal à direcção das suas cadeias. Estes são formados pela diferença de electronegatividade entre os átomos de flúor (electronegativos) e os de hidrogénio (electropositivos), em relação aos de carbono. Em relação aos átomos de flúor, estes são caracterizados pelo seu reduzido raio atómico, o que permite vários rearranjos conformacionais do polímero. Deste modo, é favorecida a ocorrência de várias conformações diferentes e, daí, diferentes estruturas cristalinas. A posição dos átomos de carbono na cadeia polimérica determina a conformação das ligações (*trans*, *cis*⁺ ou *cis*⁻) [81]. O polímero PVDF pode apresentar-se na forma de quatro estruturas cristalinas: α , β , γ e δ [7, 81].

Seguidamente, vão ser abordadas as características da fase β do PVDF, por ser a fase utilizada no decorrer do trabalho.

4.2.1.1. Fase β

A fase β é uma fase cristalina caracterizada por possuir boas propriedades electroactivas. A fase β , ou seja, uma forma polarizada do polímero, é obtida por um processo tecnológico de estiramento mecânico do polímero na fase α , de modo a obter um filme fino. O estiramento promove o alinhamento das cadeias moleculares na direcção do estiramento. Para que ocorra polarização, os dipolos no polímero devem ainda ser reorientados através da aplicação de um campo eléctrico forte (até 100 kV/mm) na direcção normal ao filme, a uma temperatura até 100° C. Posteriormente, é diminuída a temperatura ainda na presença do campo eléctrico, sem que a polarização seja alterada. O efeito piezoeléctrico observado está, por isso, directamente relacionado com o grau de polarização conseguido [75 – 76, 79, 81].

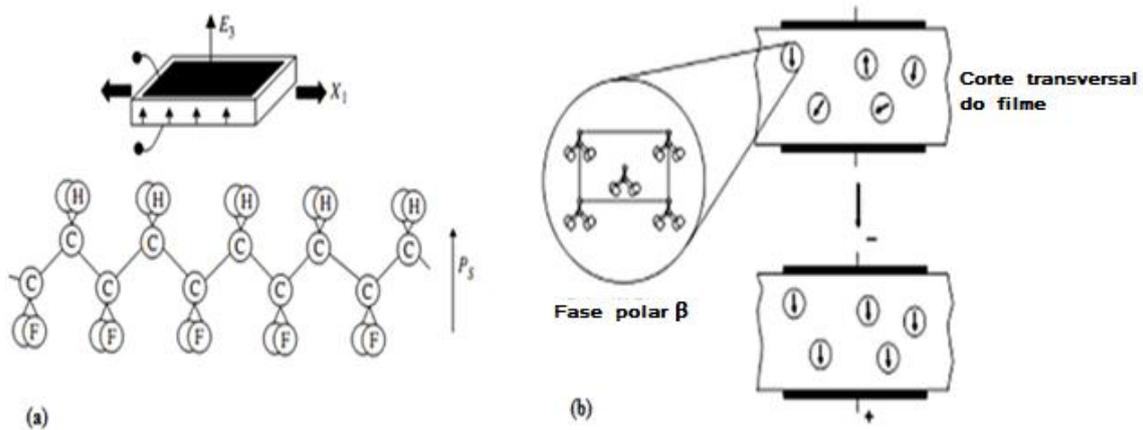


Figura 4.5 – (a) Representação das moléculas de PVDF estiradas e alinhadas, sujeitas a um campo eléctrico forte [83]. (b) Reorientação dos dipolos na fase β do polímero PVDF [79].

A nível de configuração, a fase β é polar e caracteriza-se pelos átomos de flúor se encontrarem todos dispostos do mesmo lado da cadeia e os átomos de hidrogénio se localizarem no lado oposto (figura 4.5 (a)). O momento dipolar do monómero é bastante

elevado e perpendicular à direcção das cadeias poliméricas, o que potencia as suas propriedades electroactivas. A célula unitária da fase β é constituída por duas macromoléculas dispostas numa estrutura ortorrômbica [7, 75 – 76, 78 – 79, 83].

O aquecimento dos filmes de β – PVDF a temperaturas elevadas, mesmo que inferiores à temperatura de fusão do material (171° C), provoca o aumento da fase apolar α do PVDF e a diminuição da fase β . Contudo, não ocorre uma transição completa da fase, pelo que o polímero não fica totalmente despolarizado e mantém parte das suas propriedades electroactivas [82]. A figura 4.6 representa esquematicamente a estrutura molecular das fases α e β do PVDF.

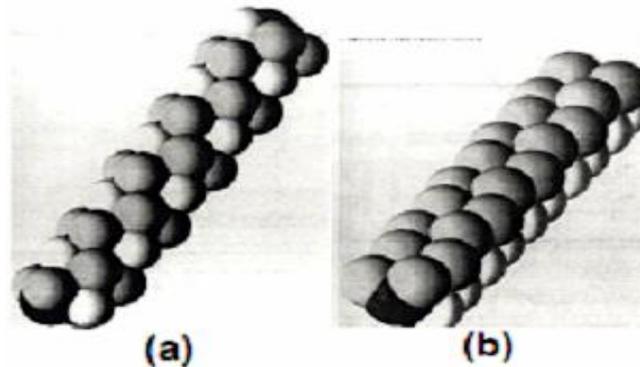


Figura 4.6 – Modelo de um segmento de uma molécula de PVDF na (a) fase α , e na (b) fase β [79].

São várias as transições possíveis, sob condições controladas, entre as várias fases do polímero PVDF. Pode efectuar-se a conversão entre as fases a partir da aplicação de energia térmica, eléctrica ou mecânica [85]. A figura 4.7 ilustra as várias transições de fases que permitem a obtenção da fase β .

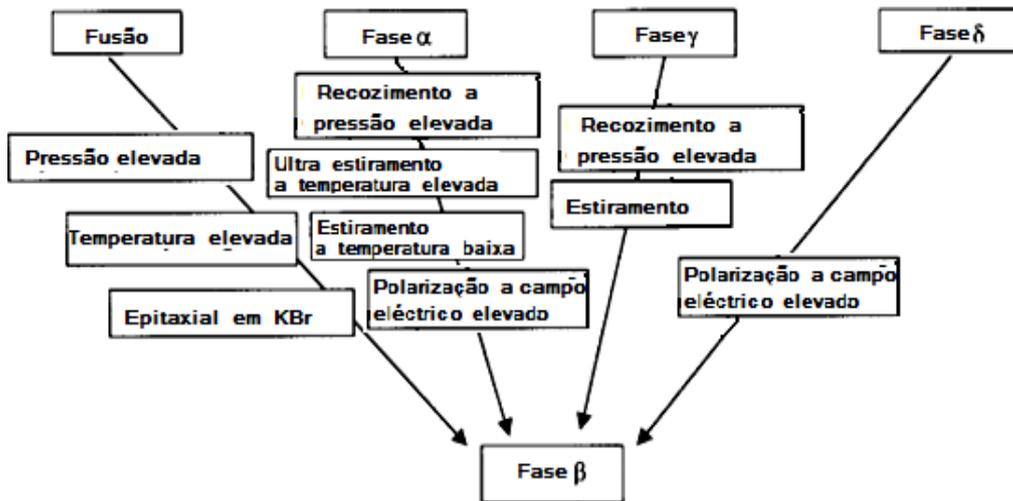


Figura 4.7 - Esquematização das transições de fases possíveis para a fase β do polímero PVDF, bem como os processos que são envolvidos nas transições [85].

4.2.2. Propriedades do PVDF

O PVDF é um polímero frequentemente utilizado em aplicações tecnológicas devido, essencialmente, às suas boas propriedades electroactivas (dielétricas, elásticas e piezoelétricas), e que o tornam proveitoso como transdutor piezoelétrico [82]. Além disso, este polímero apresenta as vantagens típicas de um plástico, ao nível do processamento, resistência mecânica, leveza, maleabilidade e baixo custo de produção. O PVDF é bastante resistente a agentes químicos e ao envelhecimento. Apresenta ainda como característica importante a transparência, o que o torna adequado ao uso em dispositivos ópticos. As propriedades apresentadas, aliadas à flexibilidade, baixa densidade, baixa impedância acústica e facilidade de produção de filmes finos, conferem ao PVDF algumas vantagens em relação aos transdutores piezoelétricos cerâmicos que, embora mais convencionais, são quebradiços, rígidos e densos [7, 76 – 77, 79].

Além disso, os piezoelétricos baseados em polímeros apresentam um coeficiente de diferença de potencial, g_{31} , superior aos cerâmicos, bem como melhor sensibilidade a variações mecânicas, em vários ambientes químicos, o que indica que são mais adequados para o uso em sensores e transdutores.

Os cerâmicos apresentam ainda uma limitação significativa em relação aos polímeros, no que concerne à sua capacidade de transmissão de ondas acústicas para o meio. Apesar de os transdutores piezoelétricos cerâmicos terem um valor elevado de coeficiente de acoplamento electromecânico (k_{em}), apresentam uma impedância acústica e mecânica muito elevada, pelo que a maior parte da energia acústica gerada é reflectida na camada limite entre o material piezoelétrico e o meio de propagação. Isto ocorre devido ao facto da impedância acústica do meio de propagação, líquido ou plástico, ser baixa (varia entre 1,5 e 3 x 10⁶ kg/m²s), e a impedância acústica do material cerâmico ser muito elevada, o que gera um coeficiente de reflexão na camada limite superior a 90%. Observa-se, deste modo, que apenas uma fracção reduzida da energia acústica gerada é deslocada para o meio de propagação. No caso de serem usados como transdutores materiais poliméricos, e uma vez que apresentam uma baixa impedância acústica, o coeficiente de reflexão na camada limite é mais reduzido, o que amplia o aproveitamento das ondas acústicas geradas [7]. A tabela 4.1 apresenta as principais propriedades electromecânicas do PVDF, que influenciam a sua capacidade electroactiva [7, 81].

Tabela 4.1 - Propriedades electromecânicas e térmicas do PVDF [7, 79, 86].

Parâmetro	Valor
Impedância acústica (Kg/m ² s)	2,7E6
Ponto de fusão (°C)	171
Temperatura de transição vítrea (°C)	-40
Capacidade térmica específica (J/g.K)	1,2
Condutividade térmica (W/m.k)	0,11
Constante piezoelétrica d_{31} (pC/N)	23
Constante piezoelétrica d_{33} (pC/N)	-33
Factor de acoplamento electromecânico $k_{em\ 31}$ (%)	12
Velocidade do som (m/s)	2,2E3
Coefficiente piroelétrico ($\mu\text{C}/\text{m}^2/\text{K}$)	30
Permissividade ϵ	106 – 113
Permissividade relativa ϵ/ϵ_0	12-13
Densidade (g/cm ³)	1,78

4.3. Eléctrodos a aplicar ao PVDF

Para que no microdispositivo seja possível a detecção óptica das biomoléculas, é importante que o transdutor piezoeléctrico apresente uma transmitância elevada. Assim, tanto o filme de PVDF como os eléctrodos nele depositados devem ser transparentes.

4.3.1. Propriedades dos óxidos condutores transparentes

Os óxidos condutores transparentes (TCO) são semicondutores caracterizados pela coexistência de condutividade eléctrica e transparência óptica (baixo índice de refração e coeficiente de extinção), que depende da natureza, número e arranjo atómico dos cátions metálicos nas estruturas amorfas ou cristalinas do óxido, bem como da morfologia e da presença de dopagem intrínseca ou intencionalmente introduzida no material [87].

Os semicondutores TCO são óxidos provenientes de metais de pós-transição como Zn, Cd, Sn e In [88]. Os materiais mais importantes são compostos binários, dopados com impurezas, compostos ternários ou óxidos de vários componentes, baseados em combinações de ZnO, In₂O₃ e SnO₂. Estes semicondutores podem apresentar valores de resistividade eléctrica (ρ) tão baixos quanto 10^{-4} Ω .cm, e o seu coeficiente de absorção (k_a) na gama visível e ultravioleta pode ser inferior a 10^4 cm⁻¹, apresentando ainda um hiato entre os vários níveis energéticos superior a 3 eV. Um filme fino TCO de 100 nm, com estas propriedades, apresenta uma transmitância óptica (T) próxima de 90% [87].

Uma combinação adequada de condutividade e transparência para os semicondutores TCO pode ser obtida através de uma composição do óxido não estequiométrica ou pela introdução de dopantes apropriados. A dopagem de filmes finos dos óxidos resulta, por isso, numa melhoria da condutividade eléctrica sem degradação da transmissão óptica. A utilidade dos filmes finos TCO depende da conjugação das propriedades ópticas e eléctricas do material, pelo que os parâmetros devem ser considerados e enquadrados no sistema em que se encontram. A opção por um

determinado óxido deve ser baseada numa optimização dos parâmetros envolvidos, nomeadamente transmitância, resistividade, reflectividade e absorvência [87, 89 – 90].

Além das características ópticas e eléctricas requeridas, os materiais TCOs devem, ainda, apresentar-se estáveis em ambientes ácidos ou alcalinos, bem como a elevadas temperaturas e em atmosferas oxidantes ou redutoras [87, 91].

4.3.1.1. Condutividade eléctrica

Os semicondutores TCO apresentam elevados hiatos energéticos (E_g), com condutividades (σ) na gama $10^2 - 1,2 \times 10^6$ S. A condutividade é devida, essencialmente, à dopagem por dopantes extrínsecos ou presença de lacunas. Na ausência de dopagem, os óxidos funcionam como isolantes, com $\rho > 10^{10}$ $\Omega \cdot \text{cm}$ [88]. Para que os filmes condutores transparentes sejam adequados para aplicações como eléctrodos, devem apresentar concentrações de transportadores na ordem dos 10^{20} cm^{-3} ou superior [92].

Na sua maioria, os TCOs são semicondutores do tipo-n. A condutividade eléctrica dos filmes finos deste tipo está relacionada com a densidade electrónica na banda de condução e com a sua mobilidade, sendo representada pela expressão:

$$\sigma = \mu n_e C_e \quad (4.13)$$

sendo μ a mobilidade dos electrões, C_e a carga dos electrões e n_e a sua densidade. A mobilidade é dada por:

$$\mu = \frac{C_e \tau}{m^*} \quad (4.14)$$

em que τ é o tempo médio entre colisões e m^* é a massa efectiva do electrão. Uma vez que n_e e τ se encontram inversamente relacionadas, a magnitude de μ é limitada.

Devido ao elevado hiato energético que separa as bandas de valência e de condução, à temperatura ambiente ($kT_C \sim 0,03$ eV, em que k é a constante de Boltzmann) não se encontram electrões na banda de condução, pelo que os TCOs não dopados são considerados bons isolantes. Os dopantes extrínsecos têm, por isso, um papel importante no preenchimento da banda de condução com electrões [87].

A condutividade eléctrica de um material é, como já foi visto, intrinsecamente limitada. Isto deve-se ao facto de n_e e μ não poderem aumentar independentemente. Elevadas concentrações de dopantes reduzem ainda a mobilidade para um grau na qual a condutividade não aumenta, e ocorre uma diminuição da transmissão óptica. O aumento da concentração de dopantes provoca a diminuição da resistividade até um valor mínimo limite, a partir do qual não diminui mais, enquanto que a janela óptica se estreita.

Sabe-se ainda que o desenvolvimento de TCOs com maior condutividade não implica, necessariamente, uma maior concentração de dopantes e respectiva maior densidade de transportadores, podendo ser atingida pelo aumento da mobilidade. Neste caso, e uma vez que a mobilidade é proporcional à largura das bandas de condução, é necessário um grande espaçamento entre as órbitas electrónicas relevantes [87]. Experimentalmente, podem ser determinadas a condutividade, a partir da resistividade superficial, e a densidade de transportadores, a partir do efeito de *Hall* [93].

Medição da Resistividade Superficial

A condutividade eléctrica de um filme condutor transparente relaciona-se com a sua resistividade. Deste modo, a medição deste parâmetro é importante para analisar a eficiência do filme, enquanto condutor. A resistividade pode ser determinada através do circuito esquematizado na figura 4.8. Este método, com quatro pontas de prova, assegura que os fios e as pontas de contacto não são incluídos na medida da resistência da amostra. A corrente I_B é fornecida pelo canal de referência do primeiro ramo do circuito e é medida pela queda de tensão na resistência de 10Ω . A resistência R_B deve ser suficientemente grande para que a corrente não seja afectada pela amostra. O segundo ramo do circuito mede a queda de tensão ΔV através de um segundo par de pontas. A técnica é válida apenas para eléctrodos com baixa resistividade e espessura muito inferior ao espaçamento entre as pontas de prova. A resistividade ρ é dada pela equação 4.15, em que l (em centímetros) é a espessura do eléctrodo [93].

$$\rho = l \frac{\pi \Delta V}{\ln 2 I_B} \quad (4.15)$$

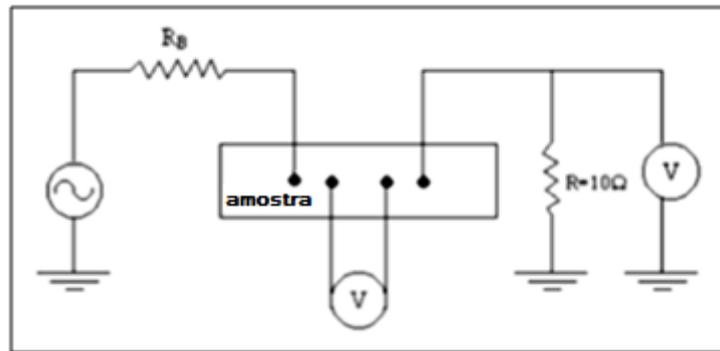


Figura 4.8 - Diagrama esquemático da medição da resistividade através de quatro pontas [93].

4.3.1.2. Propriedades ópticas

Uma vez que os materiais TCO são semicondutores com um hiato energético elevado, e, que no estado intrínseco são maus condutores, estes materiais apresentam uma elevada transmitância [88]. Mais ainda, para condutividades muito elevadas, os filmes finos de TCOs apresentam coeficientes de absorção muito baixos na gama visível, ultravioleta e infravermelha do espectro electromagnético.

A transmitância próxima da região ultravioleta é limitada pelo hiato energético E_g , uma vez que os fotões com energia superior a E_g são absorvidos. Idealmente, o intervalo entre as bandas de valência e condução de um TCO não deveria absorver fotões na zona do espectro para a qual a transmitância é máxima. Contudo, mesmo que a deposição fosse perfeita, acrescentar-se-ia a reflexão e interferências que iriam afectar a transmissão óptica. Deste modo, não é possível obter um filme com 100% de transparência.

As propriedades ópticas dos TCOs, nomeadamente a transmitância T , a reflexão R e a absorvência A , são determinadas pelo seu índice de refração n , coeficiente de extinção k_{ext} , hiato energético E_g e geometria. Na geometria, extrínseca ao material, estão incluídos a espessura do filme, a sua uniformidade e a rugosidade da superfície. T , R e A são intrínsecos ao filme, estando relacionados com a composição química e a estrutura sólida do material [87].

O espectro de transmissão, para um filme TCO depositado num substrato transparente, é afectado, não só pelos parâmetros ópticos do filme, mas também pelas propriedades ópticas do substrato. Para filmes com uma espessura superior a 100 nm,

formam-se várias bandas de interferência, produzindo valores máximos e mínimos de T , quando o comprimento de onda ou a espessura são alterados. Quando $k_{ext\ filme} \approx 0$, a transmissão de pico T_{max} corresponde à transmissão do substrato. Assumindo que o meio de incidência da radiação é o ar, $T_{max} = 90\%$ para filmes depositados em substratos de vidro. A transmitância mínima T_{min} dada por:

$$T_{min} = \frac{4n^2n_{sub}}{(1+n^2)(n^2+n_{sub}^2)} \quad (4.16)$$

em que n_{sub} representa o índice de refração do substrato, no caso do vidro 1,5.

Uma vez que a maioria dos filmes TCO apresenta valores de n na gama do visível entre 1,8 e 2,8, T_{min} encontrar-se-á no intervalo 0,8 – 0,52. Diminuindo a espessura do filme, observa-se o aumento de T [87].

Combinando as propriedades ópticas e eléctricas do material, é possível avaliar o desempenho dos materiais TCO, pela expressão 4.17, na qual se estabelece uma relação entre a condutividade eléctrica (σ) e a absorção óptica (α).

$$\frac{\sigma}{\alpha} = 1 [R_s \ln(T + R)]^{-1} \quad (4.17)$$

T e R correspondem aos valores totais de transmissão e reflexão, respectivamente, e R_s corresponde à resistência de folha. Estes valores são definidos pelas condições de deposição [88]. O desempenho do filme TCO pode ser avaliado, ainda, por uma figura de mérito Fm . Esta relaciona a transparência e a condutividade do filme, e é calculada pela expressão:

$$Fm = \frac{T}{R_s} \quad (4.18)$$

em que T corresponde à transmitância (em percentagem) e R_s à resistência de folha (Ω). Quanto maior o valor de Fm , melhor o desempenho do filme [94].

4.3.2. Métodos de deposição dos filmes de TCO

Os filmes finos de TCO podem ser produzidos por deposição química em fase de vapor (CVD – *Chemical Vapor Deposition*) à pressão atmosférica (APCVD), num processo simples e de baixo custo, mas de reduzida flexibilidade [87]. Por outro lado, as deposições podem decorrer por *sputtering* de magnetrão por rádio – frequência (RF). Esta técnica, embora mais flexível, apresenta um custo mais elevado [87]. Os filmes TCO podem ainda ser produzidos por *vacuum arc plasma evaporation*, spray pirólise ou deposição a laser pulsado [96, 98].

Na actualidade, a maioria dos filmes tem vindo a ser produzida por *sputtering* de magnetrão, numa técnica que envolve uma câmara vácuo, emissores e um substrato móvel. Durante o processo, é aplicada uma elevada tensão negativa num ânodo do canhão emissor, montado sobre a base da câmara de vácuo. Isto cria um campo eléctrico entre o ânodo e o alvo suficientemente forte para ionizar o gás árgon. Os iões de árgon são, assim, acelerados para o alvo, onde ejectam os átomos metálicos para o substrato. A figura 4.9 representa a vista de topo da câmara de vácuo utilizada para *sputtering* [93]. Apesar do custo elevado desta técnica, o *sputtering* de magnetrão por RF apresenta vantagens ao nível do fabrico dos alvos, da velocidade de deposição e do controlo da pressão dos gases. A resistividade dos filmes produzidos por esta técnica é dependente da potência RF [89, 94].

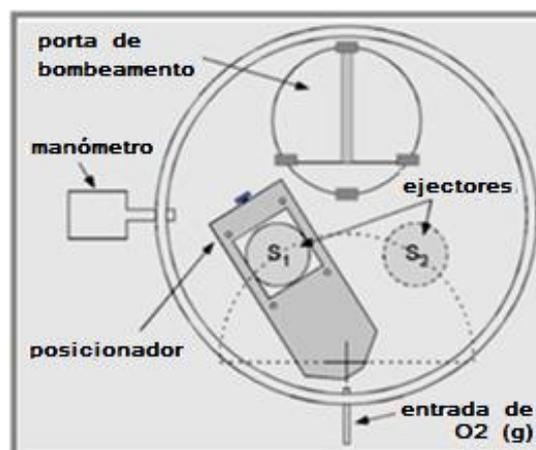


Figura 4.9 - Vista de topo de uma câmara de vácuo [93].

O controlo da espessura dos filmes TCO está dependente da sua taxa de deposição. A espessura diminui com o aumento da temperatura de deposição. À temperatura ambiente os filmes obtidos apresentam-se mais espessos [95]. Controlando a temperatura de deposição dos filmes, e conseqüentemente a espessura, é possível ainda minimizar a resistência dos filmes de TCO. Aumentando a espessura dos filmes formados, observa-se uma diminuição da resistência dos filmes, aumentando a condutividade. Contudo, a transparência dos filmes é prejudicada. Quanto maior a temperatura de deposição dos filmes, menor a resistência eléctrica que estes apresentam. Uma vez que este parâmetro se encontra relacionado com a densidade de transportadores e com a mobilidade electrónica, estes são também influenciados por alterações na temperatura de deposição [90].

Para além dos factores referidos que afectam a deposição de filmes TCO e, conseqüentemente, alteram as suas propriedades, existem ainda outros a serem considerados ao longo do processo de fabrico dos filmes, nomeadamente a pressão de trabalho, pressão parcial de O_2 , tensão e corrente de polarização do substrato, tempo de deposição, propriedades do plasma e temperatura do substrato. Estes parâmetros podem afectar a composição química, microestrutura e cristalinidade do revestimento, afectando as suas propriedades [88].

4.3.3. Eléctrodos de Óxido de Índio - Estanho

O óxido de índio (In_2O_3) dopado com estanho, ou ITO, é um dos materiais mais aptos para aplicações tecnológicas devido, essencialmente, às suas boas propriedades eléctricas e ópticas. Este material garante uma boa condutividade eléctrica, aliada a uma elevada transparência na região visível do espectro electromagnético e a uma boa estabilidade química. Contudo, o índio é um material raro, e cujo preço é elevado, o que limita a sua aplicabilidade. Os filmes de ITO apresentam também como inconvenientes a sua toxicidade e instabilidade em plasma de hidrogénio [87, 95 – 96].

O óxido de índio cristalino apresenta uma estrutura *bixbyite* (estrutura cúbica cristalina), e possui a vantagem de poder incorporar átomos de estanho como defeitos no lugar do índio sem modificações estruturais relevantes [88]. A condutividade deste

material provém das lacunas de oxigénio e da presença de um dopante Sn, que apresenta uma valência superior à do Índio [94]. O ITO é um semiconductor tipo – n com um hiato óptico de cerca de 3,75 eV.

Os filmes de ITO são normalmente depositados por *sputtering* a baixas temperaturas, factor que melhora as propriedades eléctricas e ópticas do filme depositado e, conseqüentemente, melhora a eficiência do filme. Nestas condições, com a deposição efectuada a uma temperatura inferior a 100 °C por *sputtering* de feixe iónico, podem ser obtidos filmes de ITO com resistividade de $5,5 \times 10^{-4} \Omega \cdot \text{cm}$ e transmitância superior a 80% [95].

Há alguns materiais que podem ser considerados boas alternativas ao ITO. O AZO, ou óxido de zinco dopado com alumínio, apresenta baixa resistividade, elevada transparência, facilidade de fabrico, baixo custo e reduzida toxicidade, além de elevada facilidade de dopagem. Contudo, as técnicas de deposição dos filmes de AZO necessitam de melhorias, de modo a permitir a sua produção em substratos de grande área e com uma elevada taxa de deposição [87, 89 – 91]. Quando comparado com o ITO, os filmes de AZO apresentam-se mais estáveis em atmosferas de elevadas temperaturas e presença de plasma de hidrogénio [92]. Este material tem, contudo, o inconveniente de, quando não – dopado, apresentar uma menor estabilidade eléctrica e química que o ITO não – dopado, quando se apresenta na forma de filmes finos [97].

5. Resultados experimentais

Este capítulo apresenta os resultados experimentais obtidos ao longo do trabalho laboratorial desenvolvido, bem como a sua discussão. São descritos ainda os procedimentos experimentais e as montagens utilizadas.

5.1. Instalação experimental

De modo a estudar o efeito da microagitação acústica na mistura de fluidos, recorreu-se à determinação do tempo de mistura e posterior quantificação de biomoléculas (na urina e saliva). Para tal, foram utilizados *standards* e efectuados vários ensaios espectrofotométricos, à escala macroscópica.

As medições foram efectuadas no Departamento de Electrónica Industrial na Universidade do Minho, recorrendo à montagem experimental, ilustrada na figura **5.1**. Foi utilizada, como fonte de luz, uma lâmpada de 250 W de quartzo / tungsténio / halogéneo. Utilizou-se um monocromador da *ORIEL*, modelo *Cornerstone 130TM*, ao qual foi conectada uma fibra óptica, com o intuito de direccionar a luz para as caixas onde as medições seriam efectuadas, e que incorporavam suportes para cuvetes e um fotodíodo comercial. Para medição das correntes no fotodíodo recorreu-se a um picoamperímetro da *KEYTHLEY*, modelo 487.

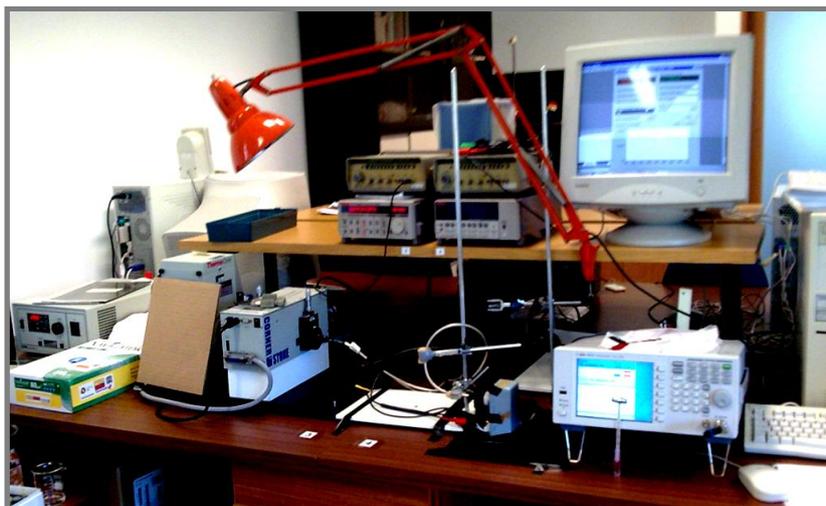


Figura 5.1 - Montagem experimental para medição de transmitâncias. Constituída por fonte de luz, monocromador, fibra óptica, caixa de medição, picoamperímetro, computador para aquisição de dados e gerador de sinais.

O fotodíodo utilizado é da *Hamamatsu*, modelo S1336-5BQ, encontrando-se incorporado na montagem ilustrada na figura 5.2. O monocromador e o picoamperímetro foram ligados a um computador para recolha de dados, através da interface gráfica *testpoint*, ilustrada na figura 5.3.

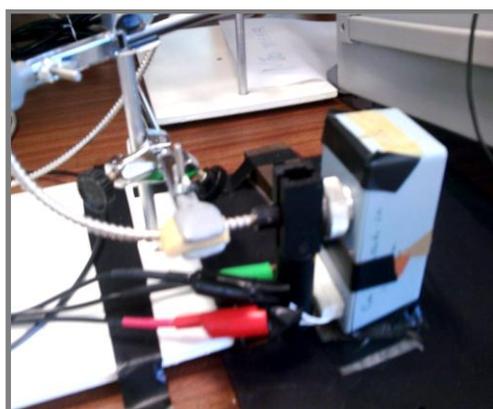


Figura 5.2 - Caixa com fotodíodo da *Hamamatsu* e suporte para medição da transmitância em macrocuvetes.

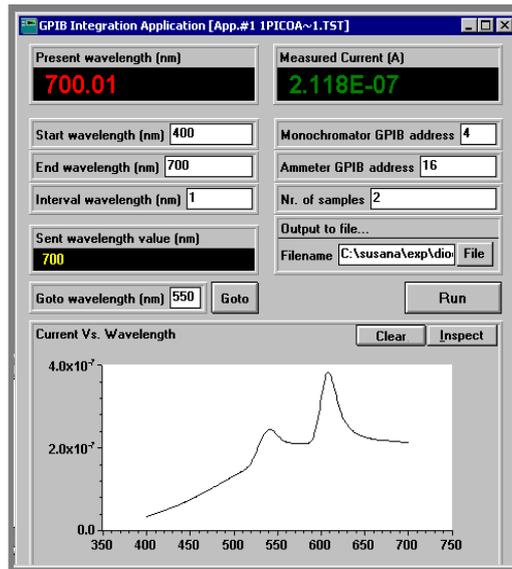


Figura 5.3 – Interface gráfica do *software testpoint*, com representação da curva da corrente no fotodíodo da *Hamamatsu*.

A figura 5.4 apresenta a curva da corrente no fotodíodo, gráfico de referência da transmitância máxima, a partir do qual se determinaram os gráficos das transmitâncias para todas as amostras analisadas. A curva foi determinada através da medição da corrente em função do comprimento de onda, varrendo o espectro entre os 400 e os 700 nm, com espaçamento de 1 nm. Os picos observados no gráfico devem-se à contribuição do espectro da lâmpada, da fibra óptica e da eficiência quântica do fotodíodo utilizado [12].

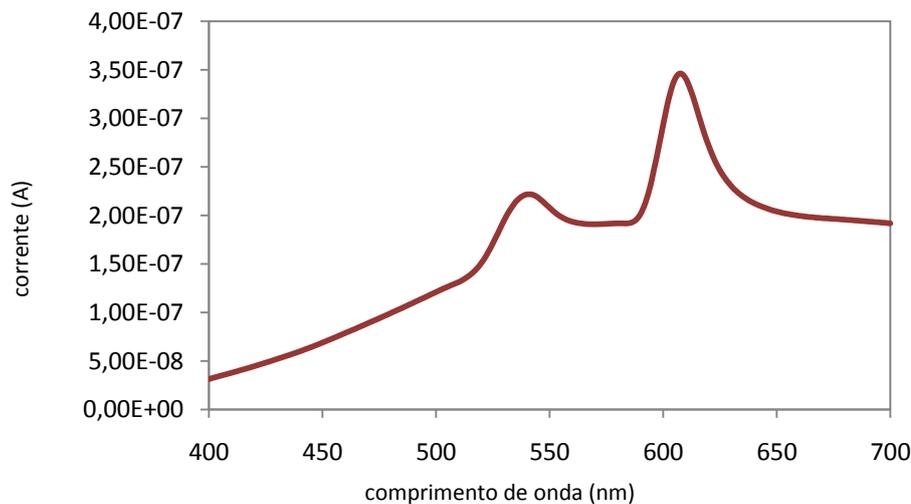


Figura 5.4 - Espectro do fotodíodo calibrado da *Hamamatsu*.

5.2. Estudo da microagitação acústica na optimização da reacção de ácido úrico

Pretendeu-se estudar o tempo de reacção para a detecção de biomoléculas de ácido úrico na saliva, visto ser uma reacção simples (envolve apenas a reacção de uma amostra com um reagente), e a análise do ácido úrico salivar ser um exame não rotineiro e com grande potencial para diagnóstico.

Para efectuar os ensaios e avaliar o tempo de reacção do ácido úrico foi utilizado o *kit* de teste da *Far Diagnostic*, com um *standard* de ácido úrico de 5 mg/dl. Este *kit* contém um reagente, constituído por etil-sulfopropil-toluidina (ESPT) na concentração de 1 mmol/l, 0,25 mmol/l de 4-aminofenazona, uricase numa concentração superior a 50 U/l, peroxidase (POD) numa concentração superior a 100 U/l, 180 mmol/l de buffer (pH 7,0) e 15 mmol/l de azido de sódio. O método baseia-se, como foi referido na secção **2.1.3.4**, na reacção de conversão do ácido úrico para alantoína e peróxido de hidrogénio, na presença da uricase. Na presença de POD, o peróxido de hidrogénio reage com ESPT e 4-aminofenazona, produzindo uma cor cuja intensidade, medida a 550 nm, é directamente proporcional à concentração de ácido úrico na amostra [44]. Na prática adicionaram-se, com o auxílio de micropipetas, a 15 μ l de amostra, 600 μ l de reagente, mantendo a relação adequada de 1/40.

Para as medições, utilizaram-se cuvetes com 1 cm de caminho óptico, às quais se colou um filme de β -PVDF com eléctrodos de alumínio depositados (numa espessura entre 200 e 500 nm), numa das faces exteriores das cuvetes, e fazendo um ângulo de 90° com as faces colocadas no caminho óptico. Ao longo dos ensaios efectuados, foram utilizados filmes de β -PVDF com espessuras de 110 μ m e 28 μ m, com uma área de 2,4 cm² (1 cm x 2,4 cm). A figura 5.5 representa uma cuvette utilizada nos ensaios, onde está colado um filme de β -PVDF com eléctrodos de alumínio depositados. Na figura, observam-se ainda fios de cobre, colados aos eléctrodos de alumínio com cola condutora de prata, utilizados para fazer o contacto do sinal eléctrico do gerador com os eléctrodos do filme piezoeléctrico. Nos ensaios em que foi utilizada microagitação acústica, foi utilizado o gerador *Agilent N9310A RF Signal Generator*, de modo a fornecer sinais sinusoidais, para promover a vibração do filme piezoeléctrico. O gerador

utilizado apresenta uma gama de frequências entre os 9 KHz e os 3 GHz, e de amplitudes entre os 0 e os 2,24 V.



Figura 5.5 - Fotografia de uma cuvette, com filme de β -PVDF colado e eléctrodos de alumínio, utilizada nos ensaios experimentais.

Uma vez que a instalação experimental fornece o valor da corrente medida pelo fotodíodo, para se obterem as curvas de transmitância e absorvência é necessário efectuar cálculos baseados na lei de *Lambert – Beer*.

A figura 5.6 apresenta a evolução da transmitância da reacção de ácido úrico em função do comprimento de onda, sem aplicação de microagitação acústica. Esta curva foi obtida pela divisão, em cada comprimento de onda, entre a curva da corrente da amostra e a curva do fotodíodo, medidas no picoamperímetro. Como se observa na figura, ocorre uma diminuição da transmitância em torno dos 550 nm, pelo que é neste comprimento de onda que se deve avaliar a absorvência das soluções, para quantificar o ácido úrico presente nas amostras. A figura 5.7 apresenta o espectro de absorvência do ácido úrico, para uma concentração *standard* de 5 mg/dl.

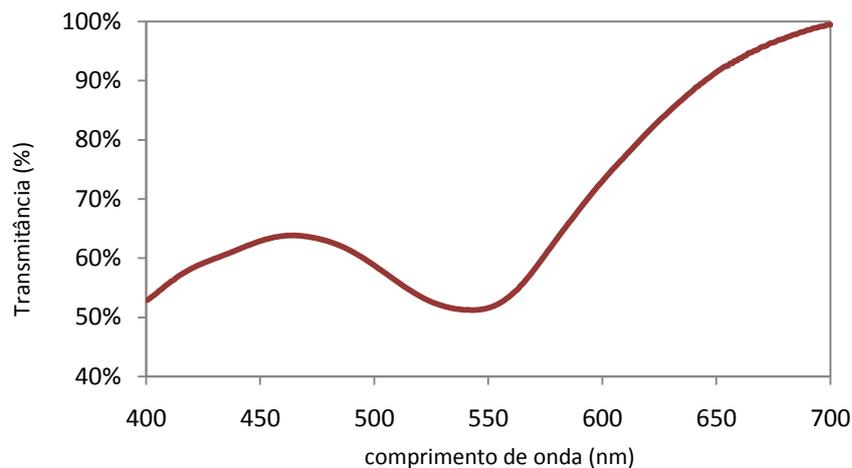


Figura 5.6 - Espectro de transmittância, em função do comprimento de onda, para uma concentração *standard* de ácido úrico de 5 mg/dl.

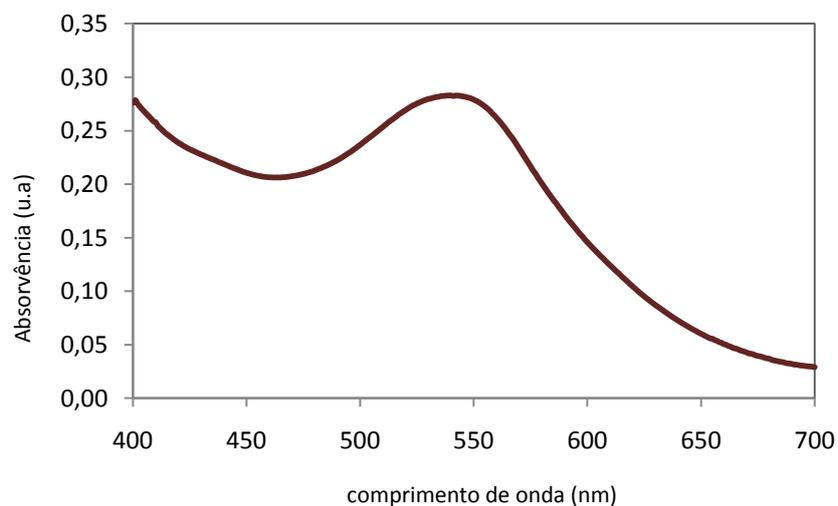


Figura 5.7 - Espectro de absorvência, em função do comprimento de onda, para uma concentração *standard* de ácido úrico de 5 mg/dl.

Todos os ensaios para avaliação dos parâmetros que influenciam a microagitação foram realizados à temperatura ambiente e durante um intervalo cronometrado de 20 minutos, tempo ao longo do qual foi registada a corrente eléctrica no fotodíodo, com intervalos de 10 segundos. Obtida a curva da corrente, foi determinada a evolução da absorvência, até a reacção ficar completa e a absorvência atingir um valor máximo. Todos os dados obtidos foram posteriormente tratados em *Excel* de modo a intersectarem-se, no momento inicial, as curvas de absorvência em função do tempo e assim facilitar a sua análise.

5.2.1. Análise da influência da frequência do sinal aplicado aos eléctrodos do β -PVDF

Começou por testar-se, em laboratório, a influência da frequência de sinal aplicado na eficiência da microagitação acústica. Utilizou-se, para isso, um filme de 110 μm com eléctrodos de alumínio.

Com base na equação 4.12, já abordada na secção 4.1.3, pode determinar-se que a frequência de ressonância teórica, para um filme de 110 μm , é de 10 MHz [7]. Sendo por isso expectável que, a esta frequência, a transmissão de ondas acústicas seja máxima e, por isso, a microagitação acústica seja mais eficiente.

Além de avaliar o tempo de mistura sem microagitação acústica, avaliou-se o tempo de mistura com microagitação acústica, aplicando sinais sinusoidais com 1 MHz, 5 MHz, 10 MHz e 40 MHz de frequências. Para todos os casos, o sinal aplicado tinha uma amplitude de 2,24 V. A figura 5.8 e a tabela 5.1 apresentam os resultados obtidos para a absorvência em função do tempo para diferentes frequências.

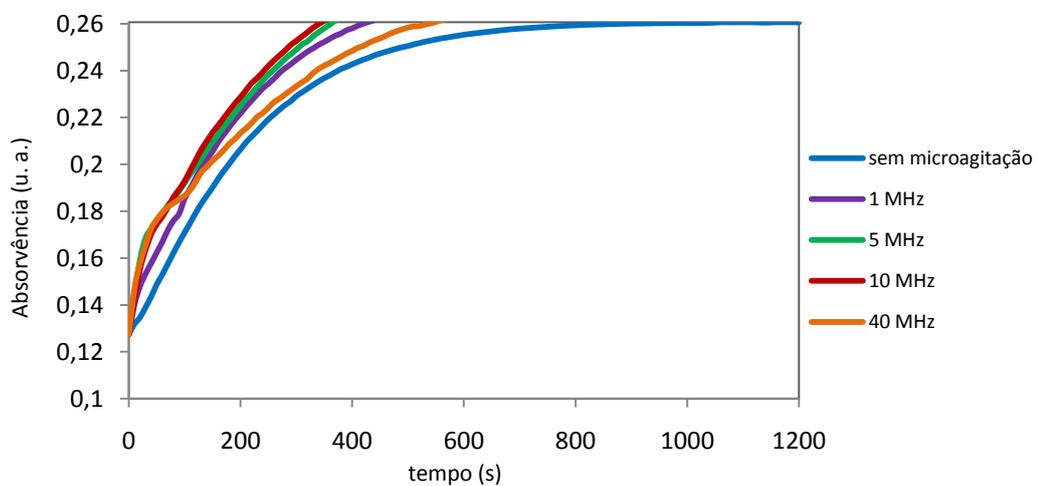


Figura 5.8 - Curva de absorvência em função do tempo para diferentes frequências do sinal sinusoidal de 2,24 V aplicado aos contactos de um filme de β -PVDF com 110 μm de espessura.

Tabela 5.1 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o ácido úrico, de 0,26 u.a., com microagitação acústica aplicada a um filme de β -PVDF de 110 μm de espessura, com um sinal sinusoidal de 2,24 V de amplitude e várias frequências.

Frequência (MHz)	0	1	5	10	40
Tempo (s)	1000	430	350	340	540
Ganho (%)	0	57	65	66	46

No gráfico da figura 5.8 observa-se que, para todas as curvas, ocorre um aumento da absorvência à medida que o tempo passa, isto é, à medida que a amostra e o reagente reagem, e o composto formado vai adquirindo uma cor mais intensa. Observa-se ainda que, para todos os casos, o declive das curvas é superior no início, decaindo à medida que a absorvência se aproxima do valor máximo, representativo do final da reacção. Da análise do gráfico, considera-se a reacção completa quando, na curva sem microagitação acústica, a absorvência atinge um valor constante, não se alterando a partir daí. Para a reacção sem microagitação verifica-se que este valor (absorvência 0,26 u.a.) é atingido aos 1000 segundos. Contudo, observa-se que o tempo para que a reacção se conclua difere das condições em que a reacção ocorre. Quando se aplica microagitação acústica, a absorvência máxima é obtida mais rapidamente e, dependendo da frequência de sinal aplicado, o ganho de tempo em percentagem varia.

Observa-se que a reacção se conclui mais rapidamente com o aumento da frequência de sinal aplicado aos contactos do filme piezoelétrico, até uma frequência de 10 MHz, onde a reacção é mais rápida. Para a frequência de 40 MHz, observa-se que, apesar de a reacção ser mais rápida do que na ausência de microagitação, o ganho de tempo é muito inferior aos das restantes frequências. Este facto vem comprovar a teoria, de acordo com a qual aos 10 MHz, frequência de ressonância, a transmissão das ondas acústicas é máxima.

De acordo com estes resultados, determinou-se que a frequência de 10 MHz seria utilizada ao longo do trabalho experimental, quando o filme de β -PVDF é de 110 μm de espessura, de modo a otimizar as outras variáveis intervenientes no processo de microagitação.

5.2.2. Análise da influência da amplitude do sinal aplicado aos eléctrodos do β -PVDF

A análise da influência da amplitude de sinal foi efectuada através da aplicação de microagitação acústica, com sinais sinusoidais de frequência igual à frequência de ressonância, 10 MHz, para um filme de β -PVDF com 110 μm de espessura. Sucessivamente, aplicaram-se sinais com amplitudes de 0,5 V, 1 V e 2,24 V. A figura 5.9 e a tabela 5.2 apresentam os resultados relativos ao estudo da influência da amplitude do sinal.

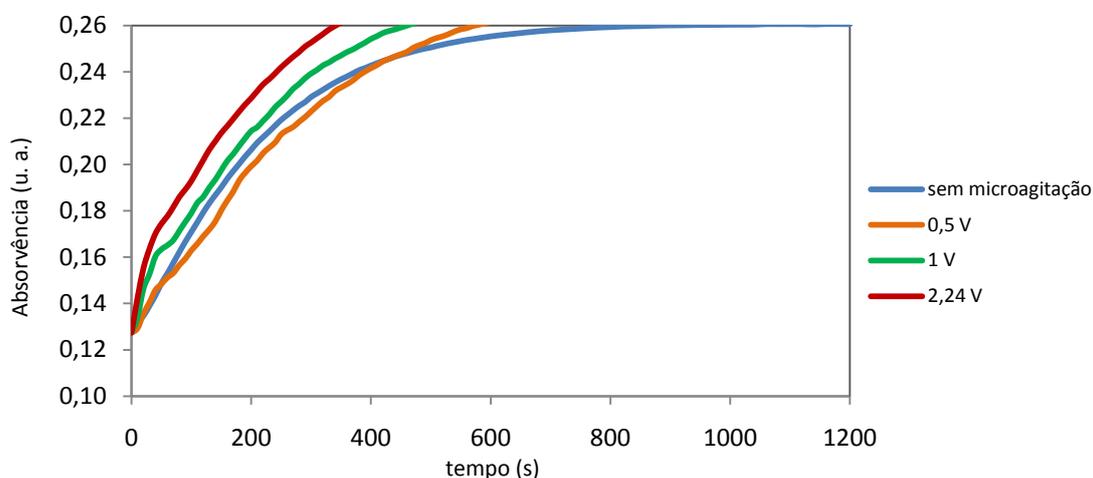


Figura 5.9 - Curva de absorvência em função do tempo para diferentes amplitudes do sinal sinusoidal de 10 MHz aplicado aos contactos de um filme de β -PVDF com 110 μm de espessura.

Tabela 5.2 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o ácido úrico, de 0,26 u. a., com microagitação acústica aplicada a um filme de β -PVDF de 110 μm de espessura, com um sinal sinusoidal de 10 MHz e várias amplitudes.

Amplitude (V)	0	0,5	1	2,24
Tempo (s)	1000	590	460	340
Ganho (%)	0	41	54	66

Como se observa, o aumento da amplitude do sinal é traduzido numa melhoria da mistura, ou seja, a absorvência máxima para a reacção ser considerada completa é atingida mais rapidamente.

O efeito piezoelétrico explica os resultados obtidos. A equação 4.2, que representa o efeito piezoelétrico inverso, permite observar que existe proporcionalidade directa entre a deformação conseguida pelo material e o campo eléctrico aplicado. Assim, uma amplitude de sinal mais elevada provoca uma deformação mais acentuada do material piezoelétrico, e consequentemente uma microagitação acústica mais eficaz.

Não foi possível estudar o efeito de amplitudes superiores, devido a limitações no gerador de sinal, sendo contudo expectável que amplitudes mais elevadas sejam responsáveis por ganhos mais acentuados no tempo de reacção.

5.2.3. Análise da influência da espessura do filme de β -PVDF

De modo a comparar a eficiência da microagitação acústica em função da espessura do filme piezoelétrico, efectuaram-se vários ensaios, a várias frequências, com um filme de β -PVDF de 28 μm de espessura e eléctrodos de alumínio depositados, com espessura algures entre 200 e 500 nm.

De acordo com a equação 4.12, para um filme de PVDF de 28 μm , a frequência de ressonância é de 40 MHz. Assim, avaliou-se o tempo necessário para que a reacção de ácido úrico se concluísse, para frequências de 10 MHz, 20 MHz e 40 MHz. A amplitude do sinal sinusoidal aplicado aos contactos do filme de β -PVDF de 28 μm foi de 2,24 V. A figura 5.10 e a tabela 5.3 apresentam os resultados relativos ao estudo da influência da frequência de sinal, para um filme de β -PVDF com 28 μm de espessura.

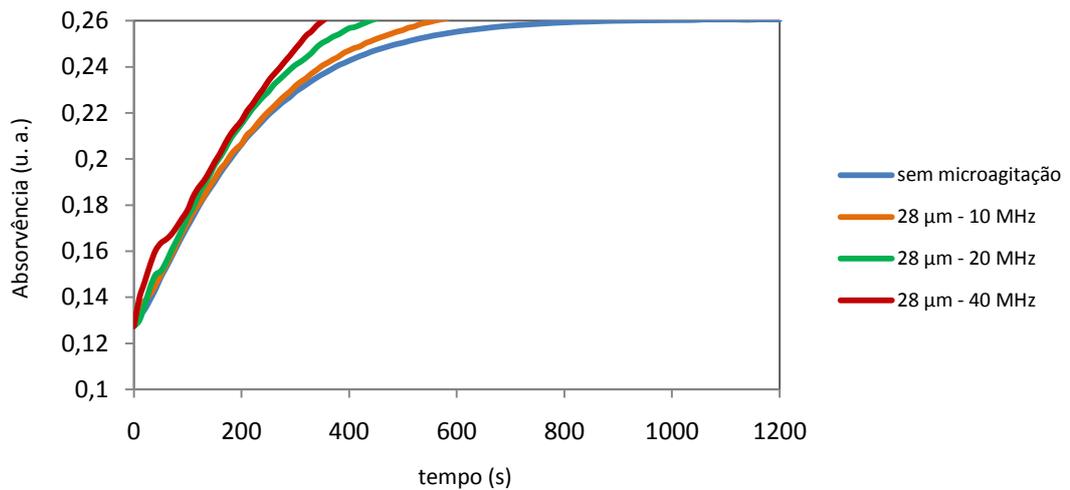


Figura 5.10 - Curva de absorvência em função do tempo para diferentes frequências do sinal sinusoidal de 2,24 V de amplitude aplicado aos contactos de um filme de β -PVDF com 28 μm de espessura.

Tabela 5.3 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o ácido úrico, de 0,26 u.a., com microagitação acústica aplicada a um filme de β -PVDF de 28 μm de espessura, com um sinal sinusoidal de 2,24 V de amplitude e várias frequências.

Frequência (MHz)	0	10	20	40
Tempo (s)	1000	520	430	340
Ganho (%)	0	48	57	66

Como se conclui da observação do gráfico, a aplicação de microagitação acústica diminui o tempo necessário até que a reacção ocorra na sua totalidade. Uma vez mais, o aumento da frequência de sinal até à frequência de ressonância, 40 MHz, promoveu a melhoria da microagitação, tornando a reacção mais rápida.

Analisou-se também o efeito da variação da amplitude sobre a eficiência da microagitação acústica. Para isso, aplicou-se aos contactos do filme piezoeléctrico de 28 μm um sinal sinusoidal de 40 MHz, com 1 V de amplitude. A figura 5.11 e a tabela 5.4 apresentam os resultados relativos ao estudo da influência da amplitude do sinal sinusoidal, para um filme de β -PVDF com 28 μm de espessura.

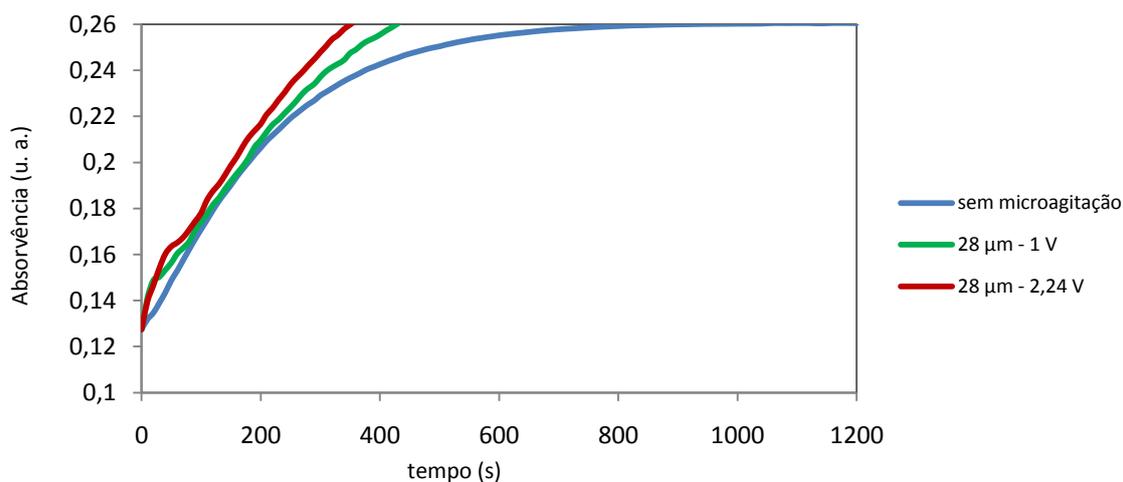


Figura 5.11 - Curva de absorvência em função do tempo para diferentes amplitudes do sinal sinusoidal de 40 MHz aplicado aos contactos de um filme de β -PVDF com 28 μm de espessura.

Tabela 5.4 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o ácido úrico, de 0,26 u.a., com microagitação acústica aplicada a um filme de β -PVDF de 28 μm de espessura, com um sinal sinusoidal de 40 MHz e várias amplitudes.

Amplitude (V)	0	1	2,24
Tempo (s)	1000	420	340
Ganho (%)	0	58	66

A observação do gráfico da figura 5.11 vem corroborar as conclusões já obtidas relativamente ao papel da amplitude de sinal na microagitação acústica. Uma vez mais, verifica-se que quanto maior a amplitude de sinal, maior a vibração produzida pelo piezoeléctrico, pelo que mais eficaz é a microagitação acústica, sendo por isso mais reduzido o tempo necessário até a reacção ficar completa.

A figura 5.12 ilustra uma comparação entre a microagitação promovida pelos filmes de 28 μm e 110 μm , às respectivas frequências de ressonância (40 MHz e 10 MHz), e com uma amplitude de 2,24 V. Observa-se que, às respectivas frequências de ressonância (no caso da quantificação de ácido úrico), o tempo de reacção é semelhante para os filmes de 28 μm e 110 μm . Deste modo, a escolha por um determinado filme de β -PVDF para aplicação em microagitação acústica deverá ser baseado noutros factores

(por exemplo custo de fabrico do filme, frequência de sinal necessária ou aquecimento produzido).

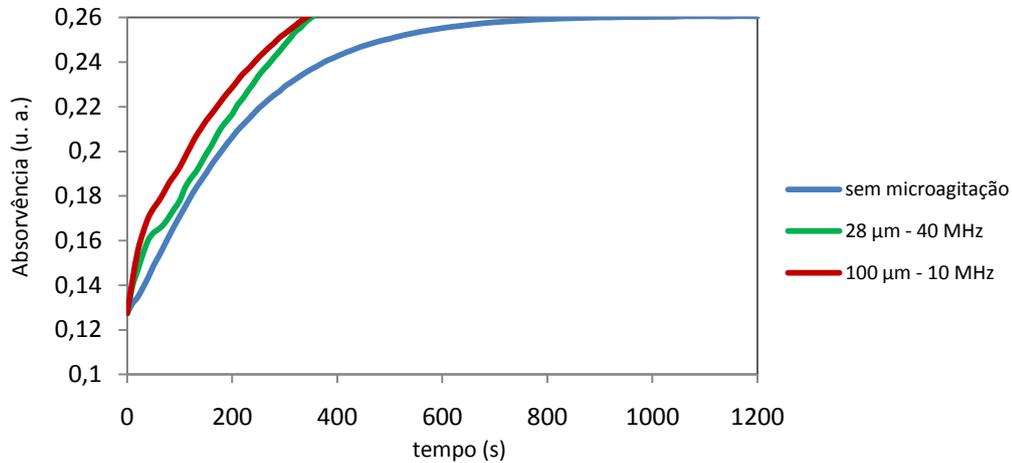


Figura 5.12 - Curva de absorvência em função do tempo para diferentes espessuras de filme de β -PVDF, com sinais sinusoidais de 2,24 V.

5.3. Estudo da microagitação acústica na optimização de outras reacções

Para que a microagitação acústica seja eficiente no *Lab-on-a-chip* a implementar, é importante que seja optimizada para diversos tipos de reacções, não só no caso do ácido úrico, já referido. Assim, e tendo comprovado a eficiência da microagitação acústica, foram efectuados vários ensaios experimentais espectrofotométricos com o intuito de avaliar a eficiência da microagitação para as reacções de magnésio e nitrito. Foi avaliado o magnésio devido à disponibilidade de reagente e à simplicidade da reacção. Avaliou-se também o nitrito, uma vez que a bula do reagente indica um valor óptimo de temperatura para a realização dos ensaios (22 °C) diferente do indicado para o ácido úrico (37 °C), o que possibilita o estudo do papel da temperatura na reacção dos fluidos.

As medições foram efectuadas nas mesmas condições utilizadas na quantificação do ácido úrico, recorrendo uma vez mais à montagem experimental presente no Departamento de Electrónica Industrial, e utilizando cuvetes iguais às utilizadas nos testes já referidos.

5.3.1. Magnésio

Os ensaios para estudo da eficiência da microagitação acústica no tempo de reacção do magnésio foram efectuados com base num *kit* de teste da *Olympus*, disponibilizado pelo IPO (Instituto Português de Oncologia). Como *standard*, foi usada uma solução, também disponibilizada, de calibrador da urina, com concentração de magnésio de 2,36 mg/dl.

O *kit* contém um reagente, constituído por ϵ -amino-n ácido capróico, numa concentração de 450 mmol/l, tris numa concentração de 100 mmol/l, glicoleterdiamina – N, N, N', N' ácido tetraacético, numa concentração de 0,12 mmol/l, 0,18 mmol/l de azul de xilidil e um conservante. O método baseia-se, como indicado na secção **2.1.3.10**, na reacção dos iões de magnésio com azul de xilidil, num pH básico, formando um complexo colorido de intensidade proporcional à concentração de magnésio na amostra, medido a 520 nm [54].

Apesar de na bula disponibilizada pela *Olympus* estar indicado um tempo de reacção de 8 minutos, observou-se que a reacção se completava muito mais rapidamente, pelo que os ensaios foram efectuados durante um intervalo de tempo de 120 segundos, à temperatura ambiente. Ao longo do tempo de reacção foi medida a evolução da absorvência, até esta atingir um valor máximo e a reacção ficar completa.

A figura **5.13** apresenta a evolução da absorvência relativa à reacção de magnésio em função do comprimento de onda, sem aplicação de microagitação acústica. Como se verifica, a absorvência atinge um pico perto dos 520 nm, pelo que é neste comprimento de onda que se deve avaliar a intensidade da cor produzida e quantificar o magnésio na amostra.

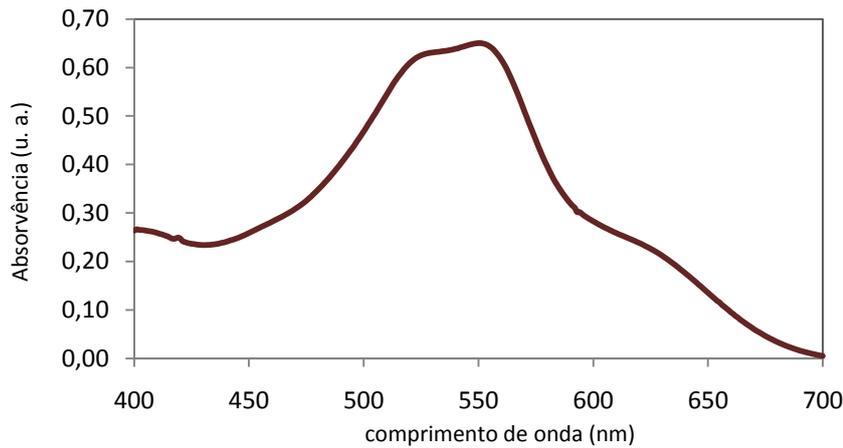


Figura 5.13 - Espectro de absorvência, em função do comprimento de onda, para uma concentração de 2,36 mg/dl de magnésio num calibrador de urina.

5.3.1.1. Análise da influência da frequência de sinal

Através da aplicação de sinais sinusoidais com 2,24 V de amplitude e várias frequências aos contactos de um filme de β -PVDF com 110 μm de espessura, é possível avaliar o efeito da microagitação acústica sobre os fluidos, e a sua capacidade para acelerar a reacção. Assim, a figura 5.14 e a tabela 5.5 apresentam os resultados obtidos para a absorvência medida ao longo da reacção de quantificação de magnésio.

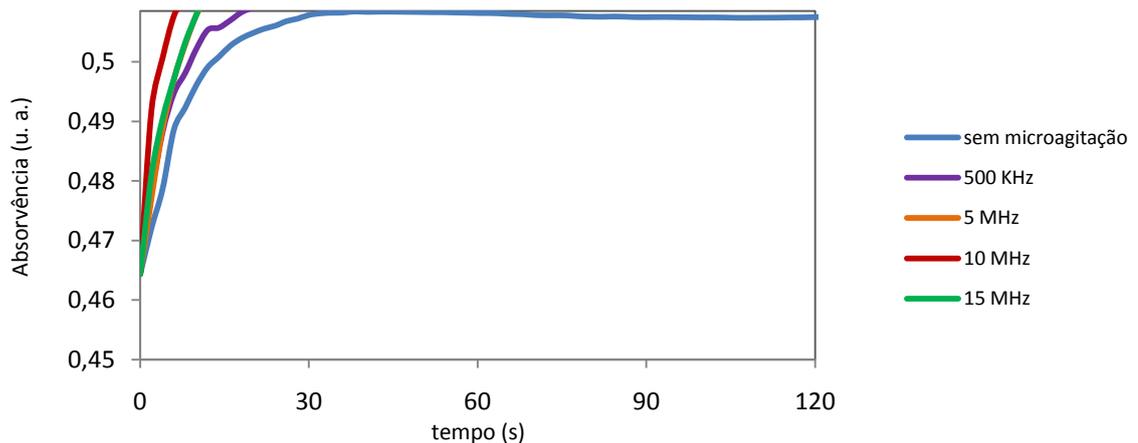


Figura 5.14 - Curva de absorvência do magnésio, em função do tempo, para diferentes frequências do sinal sinusoidal de 2,24 V de amplitude aplicado aos contactos de um filme de β -PVDF com 110 μm de espessura.

Tabela 5.5 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o magnésio, de 0,51 u.a., com microagitação acústica aplicada a um filme de β -PVDF de 110 μm de espessura, com um sinal sinusoidal de 2,24 V de amplitude e várias frequências.

Frequência (MHz)	0	0,5	5	10	15
Tempo (s)	36	18	10	6	10
Ganho (%)	0	50	72,22	83,33	72,22

Pela observação do gráfico da figura 5.14, observa-se que a aplicação de microagitação acústica tem um papel importante na diminuição do tempo necessário para a reacção ficar completa. Na ausência de microagitação, observa-se que a reacção termina por volta dos 36 segundos, momento em que a absorvência atinge 0,51 u.a. Recorrendo à microagitação, a reacção torna-se mais rápida. A velocidade de reacção aumenta à medida que é aumentada a frequência do sinal aplicado, até à frequência de ressonância. A partir desta frequência (10 MHz), o tempo necessário para concluir a reacção torna-se superior, o que permite tirar conclusões semelhantes às obtidas para o ácido úrico.

A nível académico, o uso de filmes piezoeléctricos pode ser vantajoso para aplicações de quantificação de magnésio em fluidos biológicos, visto minorar o tempo necessário para a sua detecção. Contudo, a nível comercial, e uma vez que a reacção, por si só, já é rápida, seria importante analisar a relação custo/benefício da utilização da microagitação acústica para o desenvolvimento de um novo dispositivo de análise.

Em relação a esta reacção, uma vez que o tempo necessário para a sua conclusão é muito reduzido, não se avaliou o ganho no tempo conseguido para amplitudes do sinal mais baixas.

5.3.2. Nitrito

Com o objectivo de estudar a microagitação acústica e o seu efeito sobre o tempo de reacção do nitrito foram realizados vários ensaios, baseados no *kit* de diagnóstico da *Fluka*, e usando como *standard* uma solução de nitrito com 100 μM de concentração. O *kit* é constituído por dois reagentes (reagentes de *Griess A* e *B*) e um *buffer*. A solução *buffer* apresenta-se numa concentração de 20 mM, a um pH de 7,6. A

detecção de nitrito ocorre com base na reacção de *Griess*. Esta baseia-se no acoplamento azo entre espécies diazónio e naftiletilediamina, que produz um complexo colorido. A intensidade da cor, medida a 540 nm, é proporcional à concentração de nitrito na amostra [19].

Os ensaios decorreram à temperatura ambiente, durante um intervalo de tempo de 10 minutos, tempo ao longo do qual a reacção se completou, atingindo a absorvência um valor máximo. A figura 5.15 ilustra o espectro de absorvência do nitrito, na região visível do espectro electromagnético, na ausência de microagitação acústica. O máximo de absorvência observa-se junto aos 540 nm, pelo que é neste comprimento de onda que devem ser medidas as absorvências para determinar a concentração de nitrito.

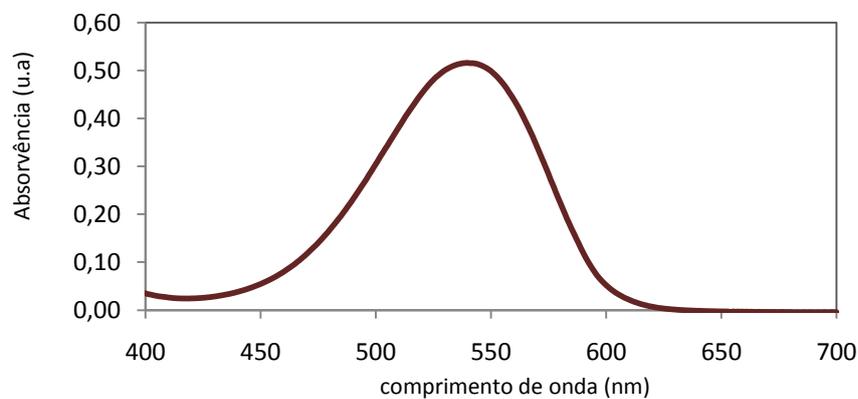


Figura 5.15 - Espectro de absorvência, em função do comprimento de onda, para uma concentração de nitrito de 100 μ M.

5.3.2.1. Análise da influência da frequência de sinal

Para avaliar o efeito da microagitação acústica no tempo de mistura na reacção do nitrito, e otimizar a frequência de sinal a aplicar de modo a obter os resultados mais satisfatórios, foram efectuados vários ensaios. Estes, consistiram na aplicação de sinais sinusoidais com 2,24 V de amplitude e várias frequências (1 MHz, 5 MHz, 10 MHz e 15 MHz) aos contactos de um filme de β -PVDF com 110 μ m de espessura. Assim, a figura 5.16 e a tabela 5.6 apresentam os resultados obtidos para a absorvência medida ao longo da reacção de nitrito.

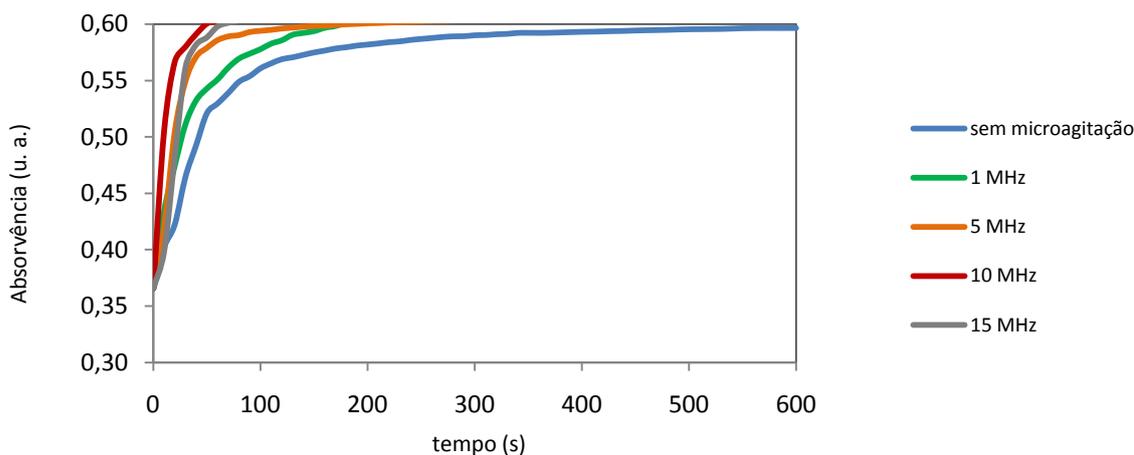


Figura 5.16 - Curva de absorvência do nitrito, em função do tempo, para diferentes frequências do sinal sinusoidal de 2,24 V de amplitude aplicado aos contactos de um filme de β -PVDF com 110 μ m de espessura.

Tabela 5.6 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o nitrito, de 0,60 u.a., com microagitação acústica aplicada a um filme de β -PVDF de 110 μ m de espessura, com um sinal sinusoidal de 2,24 V de amplitude e várias frequências.

Frequência (MHz)	0	1	5	10	15
Tempo (s)	400	140	100	50	60
Ganho (%)	0	65	75	87,5	85

Conclui-se, pela observação dos dados apresentados, que a aplicação de um sinal eléctrico aos contactos do filme piezoeléctrico resulta numa melhoria acentuada do tempo de reacção. Pela curva de absorvência sem microagitação, observa-se que a reacção do nitrito se concluiu por volta dos 400 segundos, ponto em que a absorvência atinge um valor de 0,60 u.a., mantendo-se aproximadamente constante a partir daí. Uma vez mais, verifica-se a diminuição do tempo de reacção com o aumento da frequência, até aos 10 MHz. A partir da frequência de ressonância a reacção volta a ficar mais lenta.

Observa-se ainda que, à temperatura ambiente e nas mesmas condições (mesmo filme piezoeléctrico e mesmo sinal aplicado) o ganho em tempo para o nitrito (87,5%) é superior ao conseguido para o ácido úrico (66%). Os resultados são explicados pelas características físicas dos fluidos (densidade e viscosidade), que afectam a sua capacidade de mistura, e pela dependência da temperatura para cada uma das reacções. A reacção de nitrito tem como temperatura ideal, segundo a bula do reagente, 22° C

(temperatura próxima daquela a que os ensaios foram efectuados), enquanto a do ácido úrico tem como temperatura ideal 37° C. Deste modo, seria possível otimizar a reacção do ácido úrico alterando a temperatura inicial da reacção. Na secção 5.7 esta observação será analisada com mais pormenor.

5.3.2.2. Análise da influência da amplitude de sinal

À semelhança do que foi efectuado para o ácido úrico, analisou-se também o efeito da variação da amplitude sobre a eficiência da microagitação acústica em amostras de nitrito. Para isso, aplicou-se aos contactos do mesmo filme piezoeléctrico um sinal de 10 MHz, com 1 V de amplitude. A figura 5.17 e a tabela 5.7 apresentam os resultados relativos ao estudo da influência da amplitude de sinal.

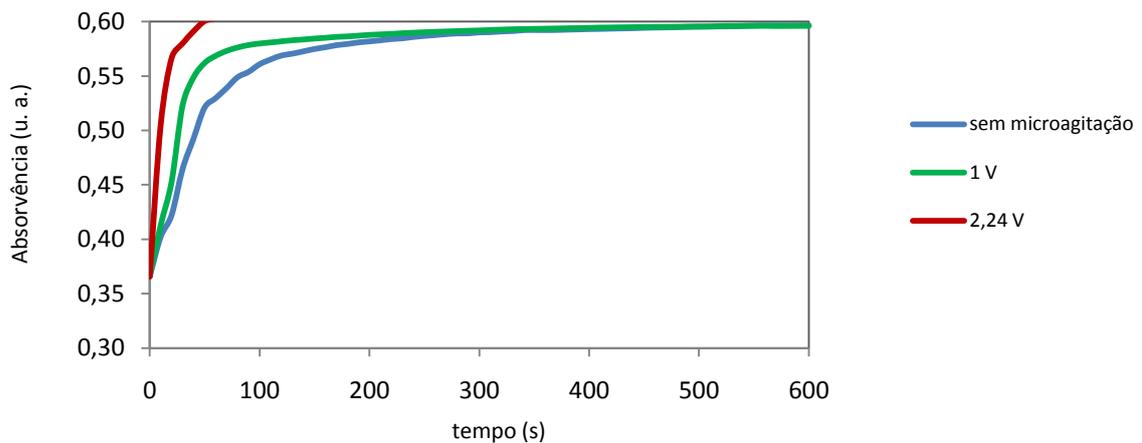


Figura 5.17 - Curva de absorvência do nitrito, em função do tempo, para diferentes amplitudes do sinal sinusoidal de 10 MHz aplicado aos contactos de um filme de β -PVDF com 110 μ m de espessura.

Tabela 5.7 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o nitrito, de 0,60 u.a., com microagitação acústica aplicada a um filme de β -PVDF de 110 μ m de espessura, com um sinal sinusoidal de 10 MHz de frequência e várias amplitudes.

Amplitude (V)	0	1	2,24
Tempo (s)	400	320	50
Ganho (%)	0	20	87,5

Pela figura **5.17** é possível concluir que o aumento da amplitude de sinal é responsável por maior deformação do material piezoelétrico, microagitação acústica mais eficaz e, por conseguinte, uma melhoria no tempo necessário para concluir a reacção.

5.4. Estudo da influência dos eléctrodos utilizados nos filmes de β -PVDF

Para que um filme piezoelétrico, no caso o β -PVDF, possa ser incorporado num dispositivo de leitura óptica, é essencial que tenha elevada transparência, ou seja, que apresente uma transmitância elevada ao longo do espectro electromagnético. Contudo, de modo a assegurar a transparência do transdutor acústico, não basta avaliar a sua transmitância, sendo também importante analisar a dos eléctrodos que nele estão depositados. O alumínio, utilizado como eléctrodo nos ensaios em cuvetes macroscópicas, é um material opaco, pelo que a sua aplicação num *Lab-on-a-chip* (figura **5.20**, adiante) se torna impraticável, visto o β -PVDF e os seus eléctrodos terem que estar no caminho óptico e assim impossibilitar a obtenção de resultados. Por isso, estudou-se a transmitância do óxido de índio dopado com estanho (ITO) depositado em filmes de PVDF.

Simultaneamente, é importante garantir uma elevada agitação do material piezoelétrico, pelo que uma optimização do ITO baseada também na avaliação da condutividade dos filmes piezoelétricos é extremamente útil para melhorar a microagitação acústica. Seleccionaram-se, por isso, alguns filmes de material piezoelétrico com ITO, dos quais se mediu a resistividade superficial.

5.4.1. Análise da transmitância

De modo a estudar a transmitância de filmes de β -PVDF com eléctrodos de ITO, seleccionaram-se vários filmes de β -PVDF com duas espessuras (6 μm e 28 μm) e com duas espessuras de eléctrodo de ITO depositado.

As medições foram efectuadas no Departamento de Electrónica Industrial, e as curvas da transmitância foram obtidas pela divisão das curvas da corrente de cada amostra, em cada comprimento de onda, pela curva da corrente no díodo (figura 5.4). Na figura 5.18 estão ilustradas as transmitâncias das várias amostras analisadas, para cada comprimento de onda do espectro visível.

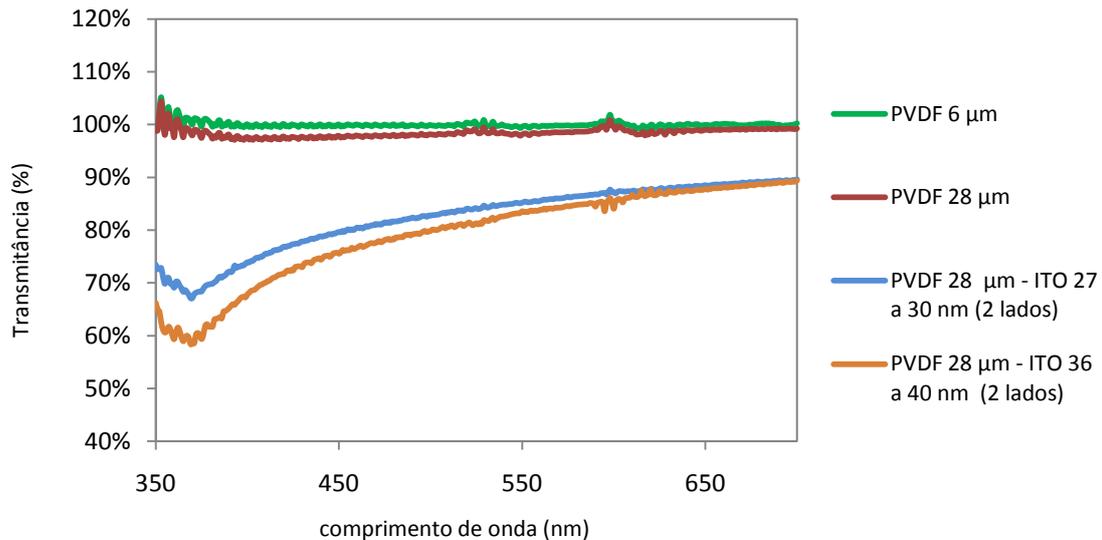


Figura 5.18 - Espectro de transmitância na zona do visível para várias amostras de β -PVDF, com e sem ITO depositado.

Pela análise do gráfico, pode observar-se que o polímero β -PVDF, sem ITO depositado, apresenta uma elevada transmitância, próxima dos 100%, pelo que se conclui que o β -PVDF apresenta uma transparência adequada ao uso em dispositivos ópticos.

A deposição de ITO implica uma diminuição da transmitância das amostras e, como se pode observar, quanto maior a espessura de ITO depositado, menor a transmitância.

Verifica-se ainda que, próximo da região ultra-violeta (UV), ocorre uma diminuição da transmitância das amostras com ITO, enquanto nas amostras de β -PVDF sem eléctrodo as transmitâncias se mantêm elevadas. Pode concluir-se, por isso, que a transmitância do ITO sofre uma quebra acentuada para comprimentos de onda na zona UV. Conclui-se também, por observação do gráfico, que a quebra é tanto maior quanto maior a espessura de ITO depositada. No entanto, e uma vez que no trabalho corrente

apenas são consideradas biomoléculas cuja análise é efectuada no espectro visível, a diminuição de transmitância na zona UV não é problemática. Por limitação no número de amostras disponível, não foi possível efectuar mais comparações.

Para os comprimentos de onda utilizados no trabalho (entre os 520 nm e os 550 nm), a transmitância verificada é sempre superior a 80%, pelo que a sua transparência é satisfatória.

5.4.2. Análise da resistividade superficial

Para avaliar a condutividade dos filmes de β -PVDF com ITO, efectuou-se experimentalmente a medição da resistividade superficial dos filmes, visto estas grandezas serem inversas. Esta foi realizada, no Departamento de Física, com base no método de quatro pontas de prova (secção 4.3). Aplicou-se uma sequência de correntes, medindo-se a diferença de potencial gerada. A resistividade superficial foi depois determinada, baseada na espessura do eléctrodo, e com factor de correcção, através da equação 4.15. Na tabela 5.8 apresentam-se os valores de corrente e diferença de potencial medidas para cada filme, bem como a resistividade superficial determinada.

Tabela 5.8 - Resistividade superficial determinada para dois filmes de β -PVDF de 28 μm , com ITO de duas espessuras diferentes.

Espessura do ITO					
27 a 30 nm			36 a 40 nm		
V (V)	I (mA)	ρ ($\Omega\cdot\text{cm}$)	V (V)	I (mA)	ρ ($\Omega\cdot\text{cm}$)
0,0572	1	7,79E-04	0,0366	1	6,66E-04
-0,0574	-1		-0,0366	-1	
0,5747	10		0,3686	10	
-0,5714	-10		-0,3694	-10	

De acordo com a tabela, verifica-se que o aumento da espessura de ITO depositado é responsável por uma menor resistividade superficial e, conseqüentemente, por uma condutividade eléctrica superior.

Estes resultados vêm de encontro ao esperado, em relação ao balanço condutividade vs transmitância. Confirma-se, deste modo, que o aumento da espessura dos eléctrodos é traduzido numa melhoria da condutividade e, como foi visto no ponto anterior, numa degradação da transmitância.

A selecção por um dos filmes em estudo deveria, portanto, ser baseada na optimização da condutividade e da transmitância, garantindo que os eléctrodos transmitissem com eficácia um sinal eléctrico, apresentando em simultâneo uma transparência adequada. Deve, contudo, ter-se em consideração que as condições de processamento e deposição dos filmes têm também influência nos valores destes parâmetros.

5.4.3. Estudo da eficiência da microagitação acústica, utilizando ITO como eléctrodo

Estudou-se a microagitação acústica promovida por filmes de β -PVDF de 28 μm com eléctrodos de ITO depositados, de modo a comparar o seu efeito com a microagitação obtida com eléctrodos de alumínio depositados em filmes de β -PVDF com a mesma espessura. A microagitação acústica foi, uma vez mais, avaliada com o *kit* de diagnóstico de ácido úrico, uma vez que este *kit* envolve um reagente apenas, sendo mais simples de utilizar.

Aplicaram-se aos contactos dos filmes de 28 μm de β -PVDF sinais de 40 MHz, com 2,24 V de amplitude. Os filmes de ITO têm espessuras de 27 a 30 nm e de 36 a 40 nm. A figura **5.19** e a tabela **5.9** apresentam o estudo da influência do eléctrodo utilizado, para um filme de β -PVDF com 28 μm de espessura.

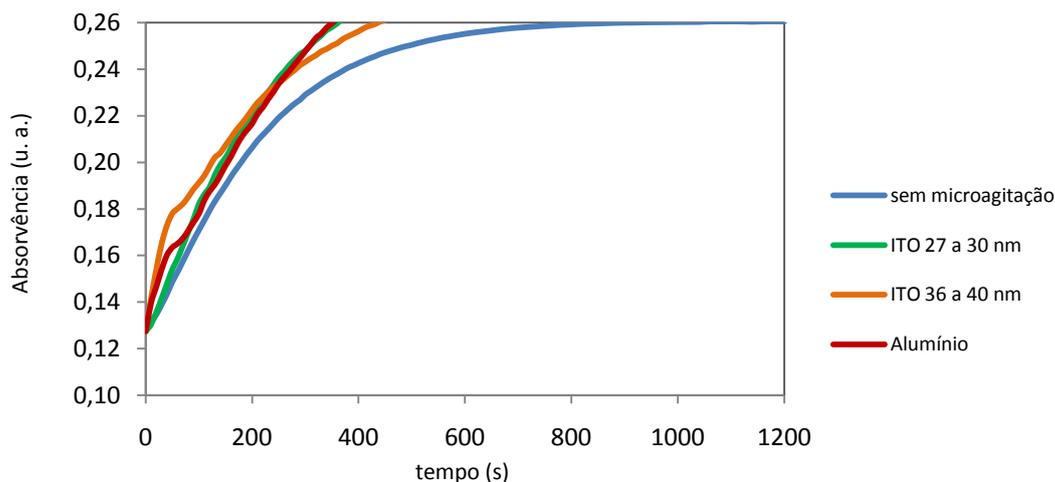


Figura 5.19 - Curva de absorvência do ácido úrico, em função do tempo, para diferentes eléctrodos depositados no filme de β -PVDF com 28 μm de espessura, com um sinal sinusoidal de 40 MHz e 2,24 V.

Tabela 5.9 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o ácido úrico, de 0,26 u.a., com microagitação acústica aplicada a um filme de β -PVDF de 28 μm de espessura, com um sinal sinusoidal de 40 MHz de frequência e 2,24 V de amplitude, e vários eléctrodos depositados.

Eléctrodo	Nenhum	ITO 27 a 30 nm	ITO 36 a 40 nm	Alumínio
Tempo (s)	1000	350	440	340
Ganho (%)	0	65	56	66

Da análise do gráfico, observa-se que o uso de ITO como eléctrodo resulta numa melhoria do tempo de reacção em relação ao tempo registado sem microagitação, pelo que se conclui que este eléctrodo é capaz de transmitir eficientemente o sinal eléctrico para a superfície do filme piezoeléctrico, permitindo microagitação acústica.

A curva registada para o ITO de 27 a 30 nm de espessura é semelhante à obtida com o alumínio. Pode concluir-se, daqui, que usando este eléctrodo conseguem-se bons resultados ao nível da microagitação.

Quanto à curva de absorvência para a reacção com ITO de 36 a 40 nm, observa-se um ganho no tempo ligeiramente inferior ao obtido com o ITO de 27 a 30 nm. Uma vez que o ITO nesta espessura apresenta menor resistividade, quando comparado com o ITO de 27 a 30 nm, seria expectável que a transmissão das ondas acústicas fosse favorecida em relação à conseguida com ITO de menor espessura, o que não se observou.

5.5. Estudo da microagitação acústica à escala microscópica

O estudo da microagitação acústica tem como objectivo a sua implementação em dispositivos miniaturizados. Assim, estando provada a eficiência da microagitação acústica a uma escala macroscópica, o passo seguinte do trabalho consistiu em prová-la a uma escala miniaturizada.

Utilizaram-se, para isso, microcuvetes fabricadas recorrendo a técnicas de micromaquinagem em SU-8 sobre vidro. As microcuvetes são quadrangulares e apresentam, como dimensões, 640 μm de profundidade e lados de 2 mm. Colou-se na parte inferior da lâmina um filme de β -PVDF de 110 μm de espessura, com eléctrodos de ITO de 115 nm de espessura, de modo a promover a microagitação nas microcuvetes. A figura 5.20 mostra uma fotografia das microcuvetes utilizadas para as medições espectrofotométricas.

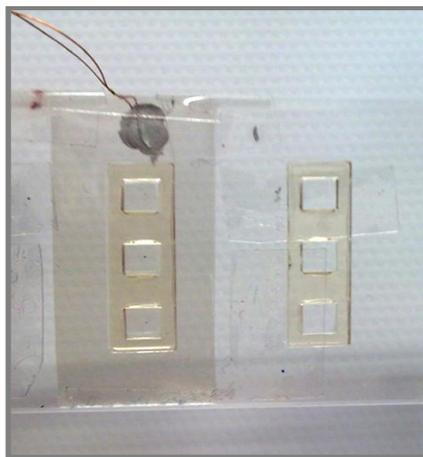


Figura 5.20 - Fotografia de microcuvetes (2 mm x 2 mm x 640 μm) com filme de PVDF (à esquerda) e sem filme (à direita).

Ao longo do estudo foram realizados ensaios com base no *kit* de ácido úrico, com ajuste de volumes devido às dimensões miniaturizadas da câmara de reacção, e à sua capacidade máxima de 2,56 μl , mantendo a mesma relação amostra / reagente. De notar que, devido aos volumes mínimos de amostra e reagente, foi utilizada uma microseringa para o controlo dos volumes. Tal como à macroescala, todos os ensaios foram realizados à temperatura ambiente e durante um intervalo de 20 minutos.

Os ensaios foram realizados no Departamento de Electrónica Industrial, com a montagem semelhante à utilizada nos ensaios à escala macroscópica, apenas com uma adaptação na caixa do fotodíodo, para permitir a incorporação da lâmina com as microcuvetes para as medições (figura 5.21).



Figura 5.21 - Caixa com fotodíodo e suporte para microcuvetes, para medição de transmitâncias.

O fotodíodo utilizado é um fotodíodo de junção pn fabricado em CMOS (disponível no laboratório). A figura 5.22 ilustra a curva da corrente no fotodíodo, gráfico de referência a partir do qual se determinaram os gráficos das transmitâncias para as amostras analisadas. Tal como anteriormente, a curva foi determinada através da medição da corrente, ao longo da zona visível do espectro electromagnético, entre os 400 e os 700 nm, com espaçamento de 1 nm.

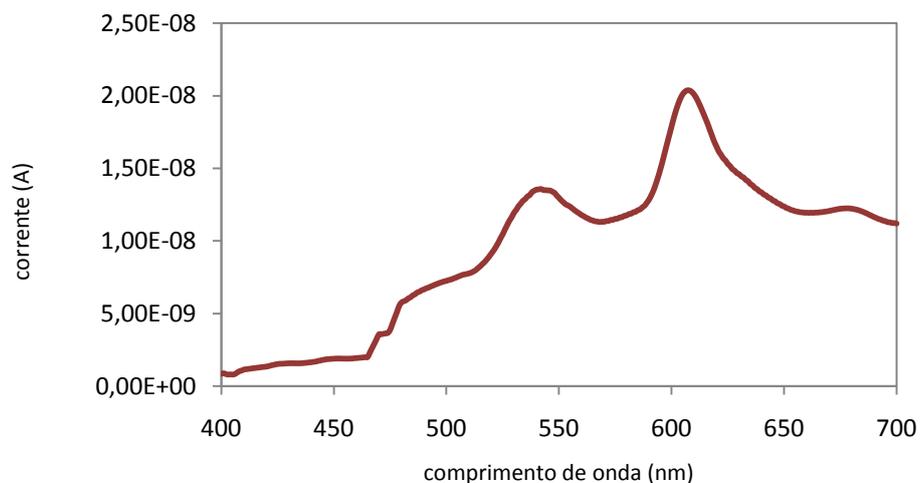


Figura 5.22 - Corrente do fotodíodo, fabricado em CMOS, em função do comprimento de onda, incorporado na montagem para leitura das transmitância em microcuvetes.

Observa-se que a curva do fotodíodo é semelhante à obtida na secção 5.1, apresentando também dois picos. Contudo, as correntes medidas estão numa ordem de grandeza inferior (10^{-8} A), pelo que o sistema se apresenta extremamente sensível às perturbações do meio (toques, luminosidade) e, por isso, a curva obtida experimentalmente apresenta muitas oscilações. Para colmatar as oscilações excessivas, a curva foi suavizada pela determinação, para cada ponto, da média dos valores circundantes.

A figura 5.23 apresenta a curva da corrente, determinada experimentalmente, para a reacção de ácido úrico, obtida em função do comprimento de onda, na ausência de microagitação.

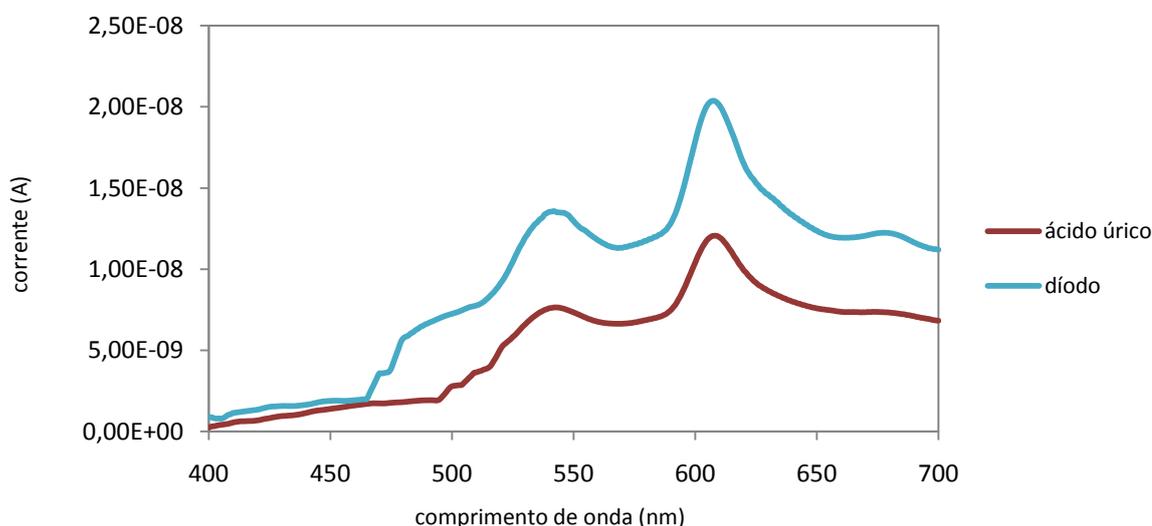


Figura 5.23 – Corrente, medida no fotodíodo, em função do comprimento de onda, para uma concentração *standard* de ácido úrico de 5 mg/dl.

A figura 5.24 apresenta o espectro de transmitância do ácido úrico, obtido a partir da divisão do espectro de corrente pela curva do fotodíodo. Como se observa na figura, ocorre uma diminuição da transmitância em torno dos 500 nm. Seria esperado que a queda na transmitância ocorresse aos 550 nm, como indicado na bula da *Far Diagnostics*. A figura 5.25 apresenta o espectro de absorvência do ácido úrico, determinado a partir do espectro de transmitância, tendo em conta a lei de *Lambert – Beer*. Na prática, e de modo a comparar os resultados com os obtidos à escala macroscópica, todos os ensaios para obtenção de curvas de absorvência ao longo do tempo foram realizados a 550 nm.

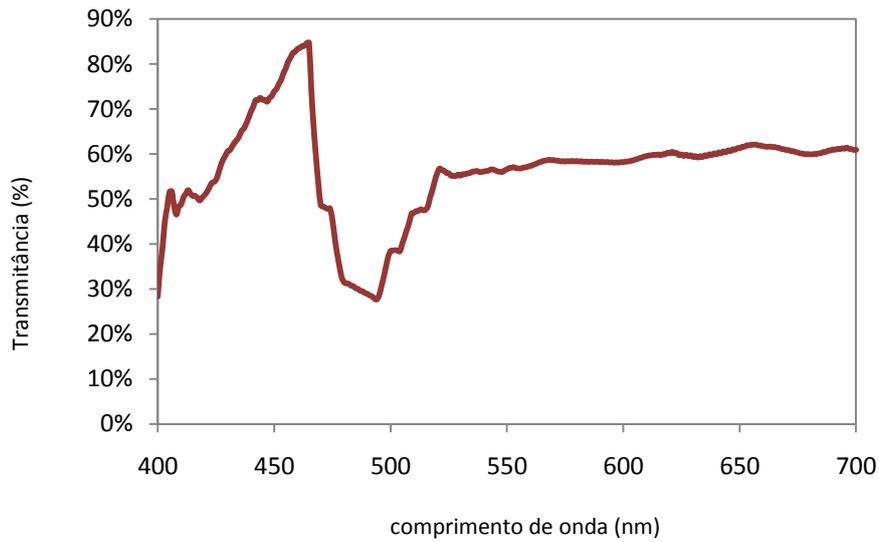


Figura 5.24 - Espectro de transmitância, determinado numa escala miniaturizada, em função do comprimento de onda, para uma concentração *standard* de ácido úrico de 5 mg/dl.

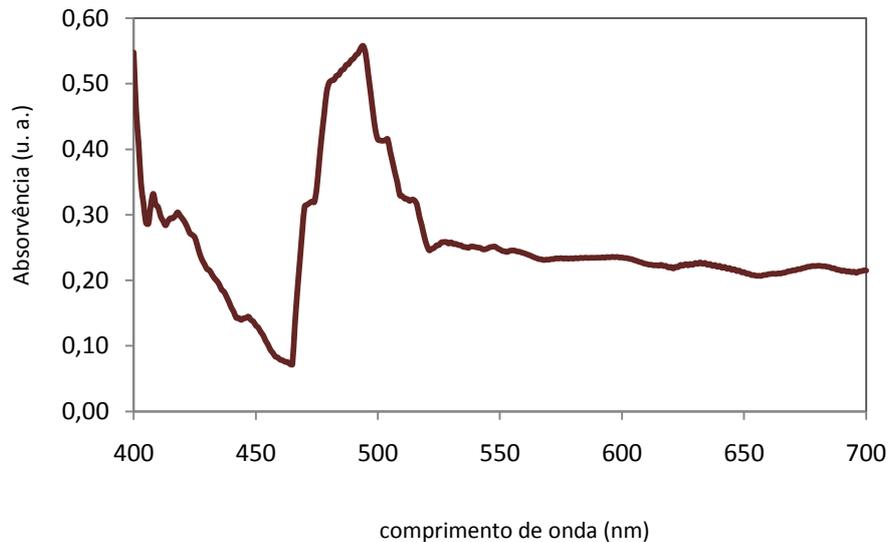


Figura 5.25 - Espectro de absorvência, determinado numa escala miniaturizada, em função do comprimento de onda, para uma concentração *standard* de ácido úrico de 5 mg/dl.

Estudou-se o efeito da microagitação acústica, gerada por um transdutor piezoeléctrico, no tempo necessário para que a reacção de ácido úrico se concluísse. Deste modo, procedeu-se à leitura da absorvência ao longo do tempo, com e sem activação do filme de β -PVDF. O filme foi activado por um sinal eléctrico sinusoidal,

de 2,24 V de amplitude e 10 MHz de frequência. A figura 5.26 e a tabela 5.10 ilustram os resultados obtidos para a absorvência sem e com microagitação, com um filme de β -PVDF com 110 μm de espessura.

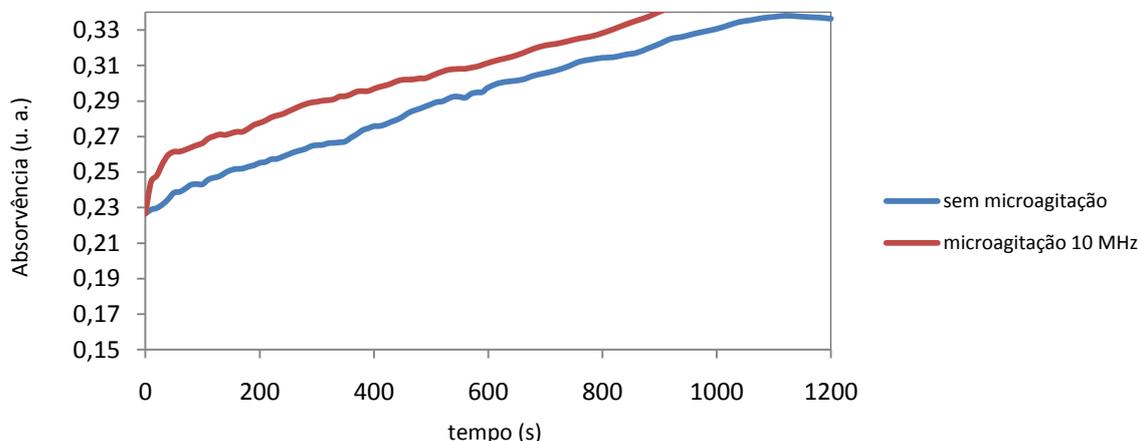


Figura 5.26 - Curva de absorvência do ácido úrico, em função do tempo, numa escala miniaturizada, sem e com microagitação, com um sinal de 2,24 V e 10 MHz aplicado aos contactos de um filme de β -PVDF de 110 μm de espessura.

Tabela 5.10 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o ácido úrico, de 0,34 u.a., em microcuvetes, com microagitação acústica aplicada a um filme de β -PVDF de 110 μm de espessura, com um sinal de 2,24 V de amplitude e 10 MHz de frequência.

Frequência (MHz)	0	10
Tempo (s)	1060	840
Ganho (%)	0	20,75

Do gráfico da figura 5.26 pode observar-se que ocorre um aumento da absorvência à medida que o tempo passa, isto é, à medida que a reacção vai ocorrendo. Verifica-se que a reacção se conclui aos 1060 segundos, ponto em que a absorvência da curva sem microagitação atinge o valor máximo de 0,34 u.a., não se alterando a partir desse momento. Observa-se que, em comparação com o tempo necessário para completar a reacção à escala macro, sem microagitação acústica, a reacção em microcuvetes ocorre mais lentamente. Isto deve-se ao menor volume e consequente elevada viscosidade, que se traduz numa reacção limitada.

Na presença de microagitação acústica, a absorvência máxima de referência é obtida mais rapidamente (aos 840 segundos), pelo que se pode concluir que a aplicação de microagitação acústica é traduzida num ganho de 20,75% em tempo de reacção.

Comparando, em percentagem, o ganho conseguido com a aplicação de microagitação à escala macro e à escala micro, verifica-se que, nas mesmas condições, à escala micro o ganho é muito inferior (ganho de 66% à escala macro e 20,75% à escala micro). A menor eficácia da microagitação pode ser explicada pelas dimensões reduzidas das cuvetes. Para um volume tão reduzido quanto o estudado, o número de *Reynolds* muito baixo, o que indica um aumento da viscosidade e complica o deslocamento dos fluidos no processo de mistura. A microagitação promovida por um transdutor piezoeléctrico elimina parte deste problema, no entanto, não consegue atingir o mesmo sucesso que a agitação à escala macro, em que a viscosidade é muito inferior e os fluidos se deslocam mais facilmente.

5.6. Estudo do aquecimento dos fluidos

Quando se aplica um sinal eléctrico aos contactos de um filme piezoeléctrico, uma parte da energia eléctrica é convertida em energia mecânica, que se traduz em energia cinética das moléculas, enquanto outra parte é convertida em energia térmica, ou seja, calor dissipado pelo sistema. Há ainda uma pequena fracção de energia residual que fica armazenada no próprio transdutor.

A temperatura dos fluidos sujeitos a microagitação acústica aumenta devido à transferência de calor do transdutor para o meio de propagação. Contudo, devido à energia cinética, o movimento das biomoléculas nos fluidos é responsável, ainda, por variações na energia térmica das moléculas, contribuindo também para o aquecimento.

Deste modo, torna-se preponderante compreender de que forma é que a activação de um transdutor piezoeléctrico afecta a dissipação de calor para os fluidos, e de que modo é que as condições experimentais (amplitude e frequência do sinal, espessura do filme piezoeléctrico e do eléctrodo) influenciam esse aquecimento. Assim, efectuaram-se vários ensaios para cada parâmetro em análise, ao longo de um intervalo de tempo de vinte minutos, tendo sido registada a temperatura minuto a minuto com um

termómetro comercial. Foram utilizadas cuvets à escala macroscópica, semelhantes à representada na figura 5.5.

Estudou-se o aumento de temperatura inerente à aplicação de microagitação acústica na reacção de detecção de ácido úrico.

5.6.1. Análise da influência da frequência de sinal aplicado ao β -PVDF

Para estudar a influência da microagitação acústica no aquecimento dos fluidos, na reacção de ácido úrico, utilizou-se o filme de β -PVDF de 110 μm com eléctrodos de alumínio, activado por um sinal sinusoidal de amplitude de 2,24 V. Aplicaram-se duas frequências diferentes (1 MHz e 10 MHz) e compararam-se os resultados com a variação de temperatura da reacção de ácido úrico obtida na ausência de microagitação. A figura 5.27 apresenta a variação da temperatura média da reacção, na ausência e na presença de efeito piezoeléctrico, ao longo de vinte minutos.

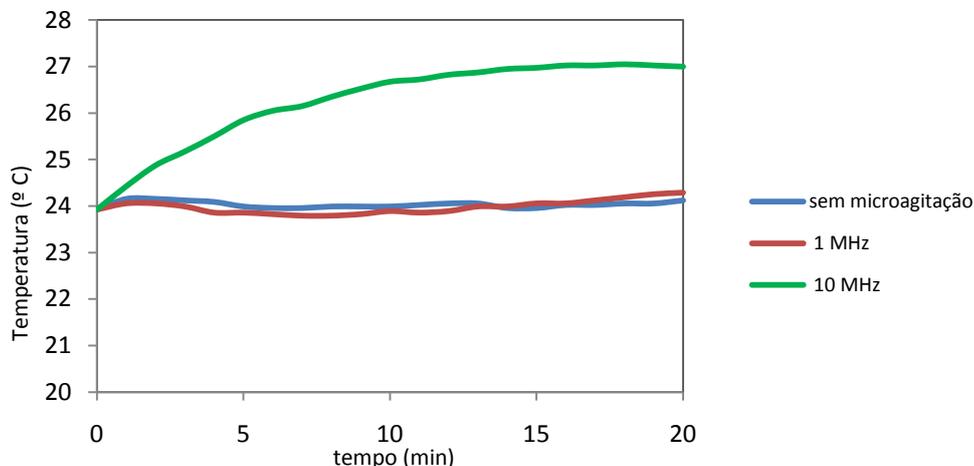


Figura 5.27 - Curva da temperatura em função do tempo, sem microagitação e com microagitação, para um sinal eléctrico de 2,24 V e frequências de 1 e 10 MHz, num filme de β -PVDF de 110 μm .

Da análise do gráfico acima representado, verifica-se que, na ausência de microagitação, não há qualquer variação da temperatura da solução contida na cuvete. A reacção de detecção de ácido úrico é endotérmica (absorve energia) pelo que não seria expectável um aumento da temperatura da reacção nestas circunstâncias. Pode concluir-se então que a reacção química não tem qualquer papel no aumento da temperatura dos

líquidos, sendo este causado, por isso, pelo calor libertado devido ao efeito piezoeléctrico e microagitação acústica.

De facto, a temperatura do ácido úrico, ao longo de vinte minutos, aumenta gradualmente, quando é aplicado um sinal eléctrico com a frequência de ressonância do filme (no caso, 10 MHz). Verifica-se um aumento total de aproximadamente 3,1° C na temperatura dos fluidos. Nos primeiros minutos o aumento de temperatura é mais rápido, tornando-se menos vincado à medida que o tempo passa, tendendo para um valor estável e praticamente invariável.

Quando se aplica um sinal eléctrico de baixa frequência, 1 MHz, verifica-se que não ocorre qualquer variação significativa da temperatura, tendo aumentado apenas 0,3 °C. O facto de ser aplicada uma frequência baixa implica uma produção de ondas acústicas menos eficiente, o que gera menor energia cinética nos fluidos e, por conseguinte, menor aquecimento.

Deste modo, pode concluir-se que o uso de polímeros piezoeléctricos activados, a vibrar à frequência de ressonância, provoca o aquecimento dos líquidos na cuvete. Contudo, não é possível concluir acerca do contributo do aquecimento conseguido para a microagitação, visto o aumento de temperatura ter sido limitado, e a temperatura atingida situar-se longe dos 37° C, que seria a temperatura ideal de reacção, à qual o papel do aquecimento seria significativo.

5.6.2. Análise da influência da amplitude do sinal aplicado ao β -PVDF

Para estudar a influência da amplitude de sinal no aquecimento dos fluidos na cuvete de reacção, utilizou-se, uma vez mais, um filme de β -PVDF de 110 μ m, ao qual se aplicou um sinal sinusoidal de 10 MHz e 1 V de amplitude, de modo a comparar com a curva obtida para 2,24 V (obtida no ponto anterior). A figura **5.28** apresenta a variação da temperatura média da reacção, medida durante vinte minutos.

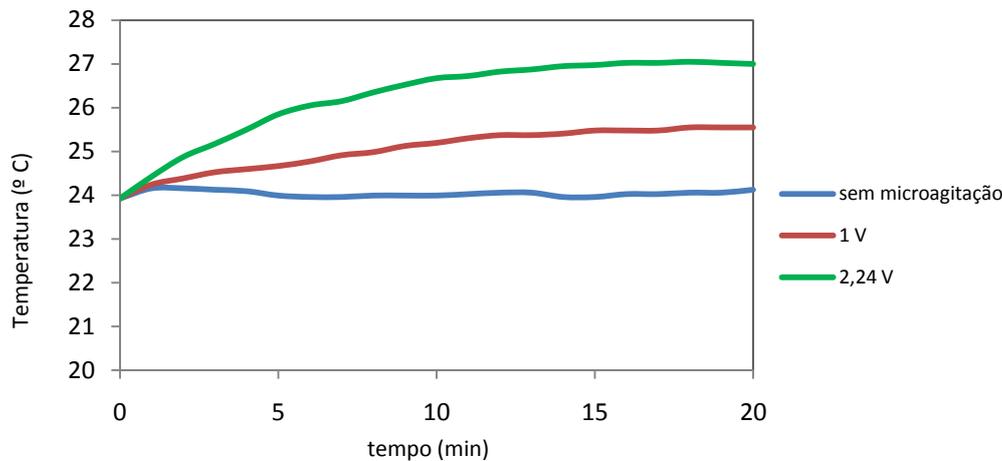


Figura 5.28 - Curva da temperatura em função do tempo, sem microagitação e com microagitação, para um sinal eléctrico de 10 MHz, com uma amplitude de 1 V e 2,24 V, num filme de β -PVDF de 110 μm .

Do gráfico observa-se que, para uma amplitude de 1 V, ocorre um aumento de temperatura de 1,6° C. Observa-se ainda que, mesmo após os 20 minutos de ensaio, a temperatura continua a aumentar, embora de um modo muito lento.

Pode concluir-se que a amplitude de sinal tem um papel preponderante no aquecimento dos fluidos e, quanto maior a amplitude, maior o calor transferido.

Seria vantajoso, no entanto, seleccionar uma amplitude que permitisse o aumento de temperatura dos fluidos até aos 37° C, visto esta ser a temperatura ideal para a reacção de ácido úrico. Contudo, não foi possível efectuar esta selecção visto a amplitude máxima permitida pelo gerador de sinal (2,24 V) garantir apenas um aquecimento de 3,1° C.

5.6.3. Análise da influência da espessura do filme de β -PVDF

Para estudar o papel da espessura do filme piezoeléctrico no aumento de temperatura dos fluidos na reacção de ácido úrico, aplicaram-se sinais sinusoidais de 2,24 V a dois filmes de β -PVDF com espessuras de 28 μm e 110 μm , sendo a cada um deles aplicado um sinal com a frequência de ressonância, 40 MHz e 10 MHz, respectivamente. Mediu-se a temperatura ao longo de vinte minutos para cada um dos casos, estando o resultado apresentado na figura 5.29.

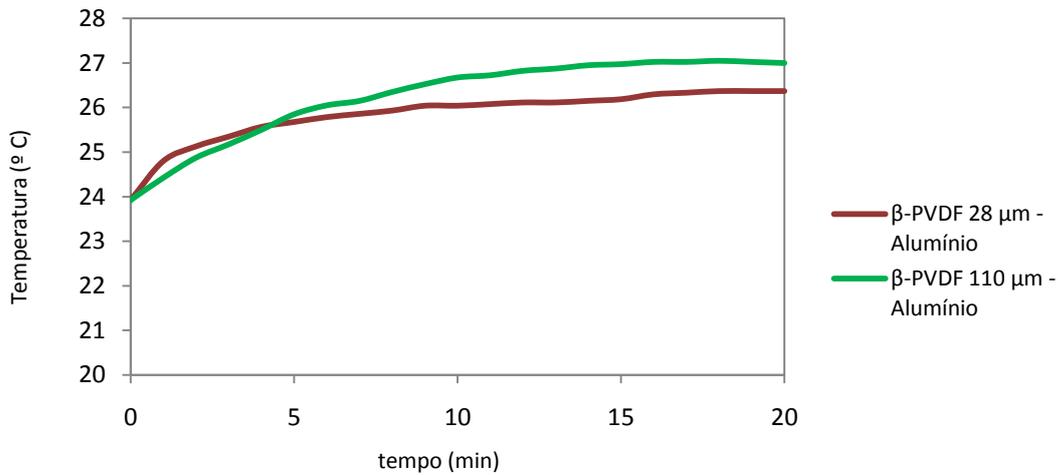


Figura 5.29 - Curva da temperatura em função do tempo, para um sinal eléctrico de amplitude 2,24 V, para filmes de β -PVDF de 28 μm e 110 μm , actuados a 40 MHz e 10 MHz, respectivamente.

Observa-se, pela figura, que para o filme de β -PVDF de 28 μm ocorre um aumento de 2,4 $^{\circ}\text{C}$ na temperatura no interior da cuvete. Esta variação de temperatura é inferior à verificada para o filme de 110 μm .

Como foi analisado na secção 5.2.3, a microagitação acústica promovida pelos dois filmes, às suas frequências de ressonância, é semelhante, pelo que as variações de temperatura que ocorrem não dependem das ondas acústicas produzidas.

As discrepâncias na temperatura final são resultado das diferenças de espessura do filme de β -PVDF depositado. Além disso, podem ter ocorrido ainda diferenças no aquecimento dos eléctrodos depositados no filme. Os dois filmes analisados têm alumínio depositado. Contudo, não foi possível conhecer com exactidão a espessura do eléctrodo depositada, visto o seu controlo aquando da deposição não ser preciso, sabendo-se apenas que esta varia entre 200 e 500 nm. A condutividade térmica (273 W/m.K, no caso do alumínio) é afectada pela espessura do eléctrodo. Assim, é possível que aquando da deposição de alumínio as espessuras depositadas tenham sido díspares, provocando diferenças no aquecimento.

5.6.4. Análise da influência dos eléctrodos utilizados

Os eléctrodos têm um papel importante na transmissão de calor para os fluidos, pelo que é importante estudar como se comportam no aquecimento. Deste modo, mediu-se a temperatura, ao longo de 20 minutos, no interior de duas cuvets, sujeitas a microagitação acústica. Utilizaram-se filmes de β -PVDF de 28 μm , com ITO depositado com duas espessuras diferentes, e actuados por sinais sinusoidais de 40 MHz e 2,24 V. Os resultados foram comparados com os obtidos para filmes com eléctrodos de alumínio, e as curvas de temperatura estão ilustradas na figura 5.30.

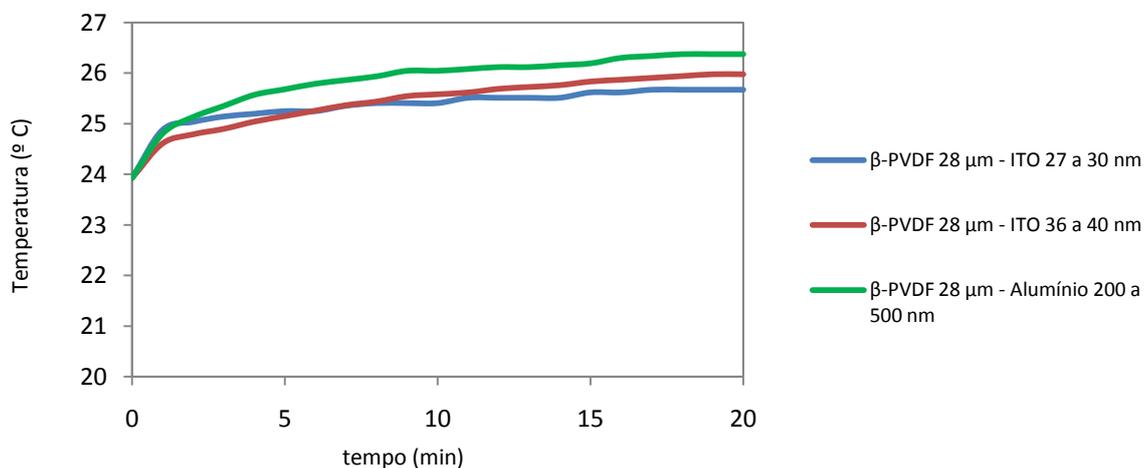


Figura 5.30 - Curva da temperatura em função do tempo, para um sinal eléctrico de 2,24 V de amplitude e 10 MHz de frequência, para filmes de β -PVDF de 28 μm , com diferentes eléctrodos depositados.

Verifica-se que, no caso dos filmes com eléctrodos de ITO, a variação de temperatura é inferior à registada no caso do filme de β -PVDF com eléctrodos de alumínio. O alumínio é melhor condutor térmico que o ITO pelo que garante um aquecimento superior dos fluidos (2,4° C).

Comparando os dois filmes com ITO, observa-se que o filme de maior espessura (36 a 40 nm) apresenta um aquecimento de 2° C, ligeiramente superior ao verificado para o filme com ITO de espessura 27 a 30 nm (1,7° C). As diferenças não são significativas e, uma vez que as espessuras dos dois filmes são muito próximas, seriam já expectáveis curvas de aquecimento semelhantes.

5.7. Estudo do aquecimento na optimização das reacções

É importante conhecer o efeito do aquecimento no processo de reacção de fluidos e consequentemente, no tempo necessário para que as reacções químicas se concluam. Assim, efectuou-se um estudo desse efeito, designado por termoagitação, tendo sido estudadas as reacções de detecção do ácido úrico e do nitrito.

A opção recaiu sobre estas duas moléculas visto as suas reacções envolverem características distintas ao nível da temperatura ideal para a sua ocorrência (37° C para o ácido úrico e 22°C para o nitrito), pelo que poderão permitir uma distinção entre o efeito do aquecimento gerado pelo efeito piezolétrico e microagitação acústica e o próprio efeito da microagitação acústica. Uma vez que o filme piezoelétrico, os eléctrodos, a frequência, a amplitude de sinal e a temperatura inicial seriam iguais para as duas reacções, quaisquer diferenças nos ganhos seriam resultado apenas do efeito da temperatura.

Através da realização dos ensaios que se descrevem a seguir pretendeu-se analisar a contribuição individual da microagitação e do aquecimento para as próprias reacções das moléculas ao longo dos tempos de reacção. Assim, pretendeu-se estudar o que ocorreria, ao nível do espectro de absorvência, se a mistura fosse efectuada à temperatura de 37° C, temperatura recomendada para a reacção de ácido úrico, por exemplo. Teoricamente, a termoagitação seria vantajosa na optimização de reacções, uma vez que uma temperatura mais elevada seria responsável por um aumento da cinética das biomoléculas, promovendo a sua reacção. Contudo, através da aplicação de microagitação acústica, não foi possível optimizar a reacção de modo a atingir esta temperatura ideal, uma vez que os sinais aplicados só permitiram aumentos de temperatura de 3,1° C, como explicado anteriormente.

Devido à importância deste estudo, e à necessidade de equipamento de aquecimento dos líquidos e controlo preciso da temperatura (figura **5.31**), as medições foram efectuadas no Departamento de Física da Universidade do Minho.



Figura 5.31 - Montagem experimental para medição de absorvências. Constituída por espectrofotómetro, forno para controlo da temperatura das cuvets e computador para aquisição de dados.

Foi utilizado um espectrofotómetro da *Shimadzu*, modelo UV-3101PC e um computador para aquisição de dados, através do *software* UVPC. A aquisição dos dados para o computador foi efectuada recorrendo ao método de aquisição *Time Course*, com registo de dados ao longo de 1200 segundos para o ácido úrico e 600 segundos para o nitrito, e um período de amostragem de 0,7 segundos. Antes de todos os ensaios, o espectrofotómetro foi calibrado para uma absorvência 0, utilizando como referência uma cuvete com água desionizada. Recorreu-se ainda ao forno da *Shimadzu*, modelo TCC – 260, 220 V, disponibilizado com o equipamento do espectrofotómetro, de modo a seleccionar e controlar a temperatura inicial dos reagentes nos ensaios, no caso 37° C. Na secção **5.6.1**, determinou-se que a máxima temperatura atingida pelos fluidos devido ao efeito piezoeléctrico foi 27 °C, pelo que também devia ser estudado o ganho em tempo conseguido se as reacções ocorressem a esta temperatura. Contudo, os ensaios no Departamento de Física foram efectuados antes de serem conhecidos os resultados da variação da temperatura, descritos na secção anterior, e não foi possível o regresso ao laboratório de espectrofotometria para efectuar novos ensaios.

5.7.1. Ácido úrico

Determinou-se a absorvência, ao longo do tempo, para a reacção de ácido úrico, com condições experimentais diferentes. Por um lado, mediu-se a absorvência à temperatura ambiente e, por outro, a medição foi efectuada pré-aquecendo e mantendo

os líquidos a 37° C. A figura 5.32 ilustra a variação da absorvência ao longo do tempo, para a reacção do ácido úrico, à temperatura ambiente e com pré-aquecimento a 37° C.

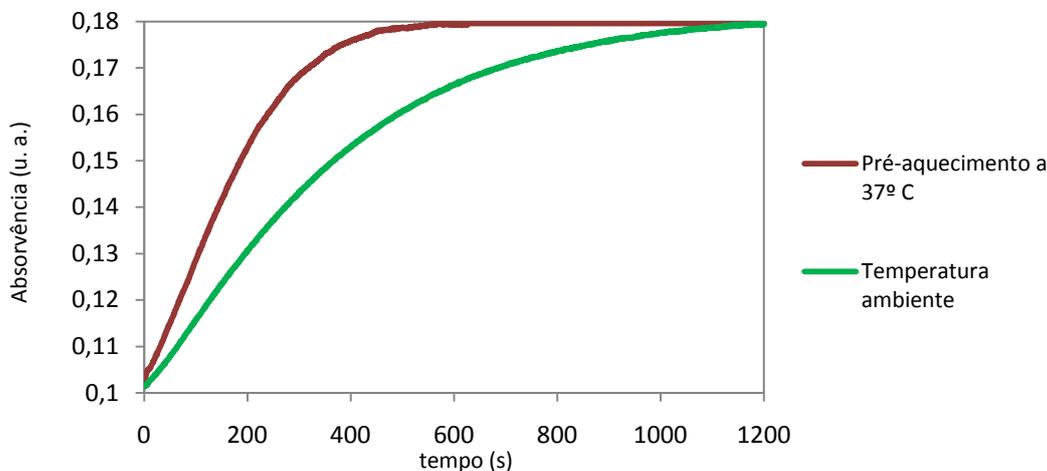


Figura 5.32 - Variação da absorvência ao longo do tempo, para a reacção de ácido úrico, à temperatura ambiente e com pré-aquecimento dos líquidos a 37° C.

Tabela 5.11 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o ácido úrico, de 0,179 u.a., com pré-aquecimento dos fluidos a 37° C.

Temperatura inicial (° C)	22	37
Tempo (s)	1150	513
Ganho (%)	0	55,39

Da análise do gráfico, pode concluir-se que, aquecendo amostras e reagentes a 37° C, e mantendo essa temperatura ao longo do tempo de ensaio, o tempo necessário para que a mistura se complete é muito menor. Sem aquecimento, a reacção fica concluída aos 1150 segundos, ponto em que a absorvência atinge o valor de 0,179 u.a., não se alterando a partir daí. Com aquecimento a 37° C, a reacção completa-se em 513 segundos. O ganho em tempo é muito elevado, o que permite concluir que o aquecimento favorece a reacção.

Seria também interessante medir a absorvência ao longo do tempo, para um pré-aquecimento a 27° C. Esta foi a temperatura realmente atingida pelos líquidos, através dos sinais eléctricos aplicados, pelo que a medida da absorvência a esta temperatura,

sem microagitação, seria muito útil para compreender e distinguir a contribuição individual da microagitação e do aquecimento no processo de mistura.

Não é possível comparar com fidelidade os ganhos em tempo obtidos pelo aquecimento e pela microagitação acústica, uma vez que a curva de aquecimento foi elaborada para uma temperatura de 37° C, apesar de a temperatura máxima conseguida com o piezoeléctrico ter sido 27° C. Sabe-se, contudo, que o ganho em tempo conseguido pela activação do piezoeléctrico (66%) é a soma da contribuição da cinética gerada pelas ondas acústicas, e da contribuição do aquecimento.

5.7.2. Nitrito

Efectuou-se a medida da absorvência para a reacção do nitrito, com diferentes condições experimentais, tal como havia sido feito para o ácido úrico. Mediu-se a absorvência à temperatura ambiente e com pré-aquecimento dos líquidos a 37° C. A figura 5.33 mostra a curva da absorvência ao longo do tempo, para a reacção do nitrito, à temperatura ambiente e com pré-aquecimento a 37° C.

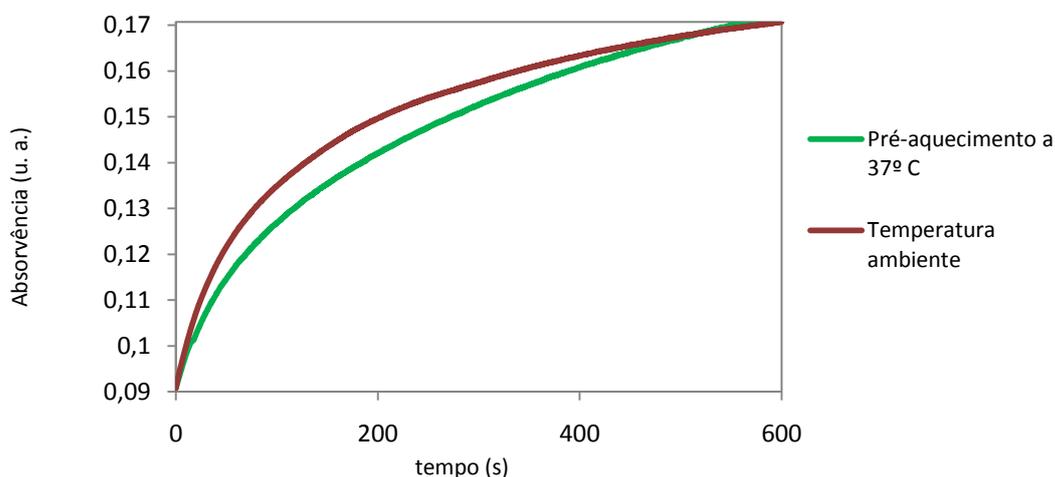


Figura 5.33 - Variação da absorvência ao longo do tempo, para a reacção de nitrito, à temperatura ambiente e com pré-aquecimento dos líquidos a 37° C.

Tabela 5.12 - Tempos e ganhos no tempo para atingir uma absorvência, para o nitrito, de 0,17 u.a., com pré-aquecimento dos fluidos a 37° C.

Temperatura inicial (° C)	22	37
Tempo (s)	570	552
Ganho (%)	0	3,16

Observando o gráfico, verifica-se que, aquecendo os líquidos a 37° C, a reacção completa-se num intervalo de tempo praticamente igual ao tempo necessário para completar a reacção à temperatura ambiente, apenas com uns segundos de ganho. Sem aquecimento a reacção completa-se aos 570 segundos, quando a absorvência atinge os 0,17 u.a., enquanto a 37° C a reacção termina aos 552 segundos. O ganho em tempo é muito reduzido, pelo que, nesta reacção específica, o aumento de temperatura não se traduz em melhoria da reacção dos fluidos. Este resultado vem confirmar o facto de a reacção do nitrito ser óptima a 22° C, não melhorando significativamente com o aumento da temperatura.

Pode concluir-se então que, quando é utilizado um filme piezoeléctrico e é activada microagitação acústica para a mistura na reacção de nitrito (secção 5.3.2), qualquer aceleração da reacção é devida à cinética das biomoléculas e não ao aquecimento gerado pelo transdutor piezoeléctrico.

5.7.3. Comparação

Comparando as reacções de detecção do nitrito e do ácido úrico, ocorridas à temperatura ambiente e nas mesmas condições de microagitação acústica (secções 5.2 e 5.3.2), conclui-se que o ganho em tempo devido à microagitação acústica é muito superior no caso do nitrito (uma vez que no caso do ácido úrico o aquecimento tem também um contributo essencial). Observa-se também que o aquecimento dos fluidos não tem qualquer efeito sobre a mistura no caso da reacção de quantificação do nitrito.

Uma vez que as ondas acústicas geradas pelos transdutores piezoeléctricos são semelhantes, as diferenças observadas devem-se às características dos próprios fluidos

envolvidos. Sabe-se que as propriedades físicas dos fluidos, nomeadamente a viscosidade e a densidade, influenciam o movimento das biomoléculas nos fluidos e, conseqüentemente, a sua capacidade de mistura. Estas propriedades são afectadas pela temperatura, o que justifica o facto de as reacções do ácido úrico e do nitrito apresentarem temperaturas ideais diferentes.

Não foram encontradas informações relativas aos valores da viscosidade para os fluidos referidos. Contudo, sabe-se que o aumento da temperatura (proveniente da dissipação de energia térmica pelo transdutor piezoeléctrico) é responsável por uma diminuição da viscosidade e melhoria da mistura.

6. Conclusões e trabalho futuro

O presente capítulo apresenta as principais conclusões retiradas do trabalho realizado, e expõe algumas sugestões para trabalho a desenvolver no futuro, de modo a complementar os resultados obtidos.

6.1. Conclusões

A implementação deste trabalho permitiu estudar várias biomoléculas com interesse clínico, e avaliar a sua aplicabilidade para análises espectrofotométricas recorrendo à microagitação acústica para a mistura dos fluidos. Verificou-se que a microagitação acústica produz resultados positivos para a melhoria da mistura nas reacções do ácido úrico, magnésio e nitrito.

Estudaram-se vários parâmetros que influenciam a microagitação acústica, com o intuito de otimizar as reacções químicas. Concluiu-se, inicialmente, que fazendo vibrar um filme de β -PVDF posicionado nas cuvetes de reacção, a mistura dos fluidos foi completada num tempo menor, diminuindo assim o tempo de reacção. Verificou-se ainda que o menor tempo de reacção foi obtido quando se aplicava ao β -PVDF um sinal sinusoidal à frequência de ressonância do filme. Concluiu-se ainda que, quanto maior a amplitude dos sinais, menor o tempo de reacção obtido.

Quando se comparou a eficiência da microagitação para filmes de β -PVDF com diferentes espessuras, verificou-se que o ganho em termos de tempo de reacção foi

semelhante para filmes com espessuras de 28 μm e 110 μm , desde que se aplicassem sinais com a frequência de ressonância adequada, pelo que a opção por uma determinada espessura de β -PVDF deverá ser baseada noutros factores (custo de produção, aquecimento gerado, entre outros).

Estudou-se também o papel dos eléctrodos no processo de microagitação acústica. Concluiu-se que a transparência é uma condição fundamental para que o eléctrodo possa ser incorporado em dispositivos ópticos (no caminho óptico), e que os filmes de ITO apresentam uma transparência elevada. Verificou-se que a transmitância é tanto menor quanto maior a espessura de ITO depositada, e varia com o comprimento de onda, apresentando quebras na região ultra-violeta. Relativamente à análise da resistividade superficial, concluiu-se que quanto maior a espessura de ITO menor a resistividade superficial e, por isso, maior a condutividade eléctrica. Concluiu-se também que usando como eléctrodo ITO com espessura entre 27 e 30 nm consegue-se uma mistura semelhante à obtida com eléctrodos de alumínio.

Em relação à microagitação acústica em microcuvetes, concluiu-se que o uso de um filme de β -PVDF contendo eléctrodos de ITO permite uma melhoria na mistura (de ácido úrico), com um ganho de cerca 20% no tempo de reacção. Concluiu-se ainda que, nas mesmas condições, o ganho conseguido com microagitação à escala micro é bastante inferior ao obtido à escala macroscópica.

Quanto ao aquecimento dos fluidos, verificou-se que a microagitação acústica provoca um aumento da temperatura dos fluidos, sendo tanto maior quanto maior a amplitude do sinal de actuação e quanto mais próxima esteja a frequência do sinal eléctrico aplicado da frequência de ressonância do material. Verificou-se ainda que aquecendo amostras e reagentes a 37° C, a reacção de detecção de ácido úrico completa-se mais rapidamente, enquanto a de nitrito não sofre alterações, concluindo que o aquecimento não favorece a mistura nesta reacção. Concluiu-se assim que, quando são usados filmes piezoeléctricos na reacção de nitrito, qualquer ganho no tempo é devido à microagitação acústica e não ao aquecimento.

6.2. Trabalho a desenvolver

Ao longo do trabalho surgiram limitações que impediram o estudo pormenorizado de alguns aspectos.

Não foi possível avaliar a microagitação acústica gerada por sinais com amplitudes elevadas, por limitação do gerador de sinais utilizado. A utilização de amplitudes mais elevadas permitiria atingir aumentos de temperatura mais significativos, mais próximos da temperatura ideal para a reacção de detecção do ácido úrico, possibilitando desse modo distinguir com clareza a contribuição da microagitação e do aquecimento para a optimização da reacção.

Dever-se-ia estudar mais aprofundadamente a termoagitação. No caso dos filmes de β -PVDF, o aquecimento é a soma da contribuição da dissipação de energia térmica pelo filme, e do aquecimento provocado pelo movimento das partículas. Usando, por exemplo, transdutores cerâmicos, seria possível concluir qual o aquecimento gerado nos fluidos apenas devido à cinética das biomoléculas.

Seria importante estudar também o aquecimento a uma escala miniaturizada, para avaliar de que modo o aumento de temperatura nas microcuvetes contribui para a reacção, tendo em atenção a elevada viscosidade dos fluidos para volumes tão diminutos.

Directamente relacionado com o papel do aquecimento, torna-se assim importante um estudo da influência da viscosidade e da densidade dos fluidos. Estes parâmetros influenciam as temperaturas ideais de mistura e, como consequência, é relevante analisar de que modo variações destas propriedades influenciam a microagitação acústica.

As curvas experimentais obtidas apresentaram grandes oscilações, pelo que seria importante promover o isolamento do sistema em relação às interferências das condições exteriores nas medições, de modo a conseguir um sistema menos influenciável, e curvas mais próximas das ideais.

Por fim, seria interessante, no futuro, alargar o estudo da microagitação acústica a outras moléculas de interesse, com diferentes propriedades físicas, de modo a provar a sua flexibilidade. Seria importante estudar outras moléculas de elevado interesse em diagnóstico e presentes nos fluidos em concentrações muito reduzidas, o que põe de pé o desafio de melhorar a sensibilidade dos métodos de detecção.

Referências

- [1] Oliveira, H. C.; Miranda, J. M.; Teixeira, J. A.; Vicente, A. A.; Correia, J. H.; Minas, G. *Oscillatory and alternate flows in a microfluidic device*. University of Minho.
- [2] Weigl, B. H.; Yager, P.; Brody, J. P.; Holl, M. R.; Forster, F. K.; Altendorf, E.; Galambos, P. C.; Kenny, M.; Schutte, D.; Hixson, G.; Zebert, D.; Kamholz, A.; Wu, C. *Microfabricated devices and methods*. Patent no. US 6,454,945 B1. (2002).
- [3] Brennan, D.; O'Neill, A.; Kruger, J.; O'Brien, P. *Development of a microfluidic system for integration with an optical detection chip*. Eurosensors XVII - The 17th European Conference on Solid-State Transducers. (2003). Guimarães, Portugal.
- [4] Figeys, D.; Pinto, D. *Lab-on-a-Chip: A Revolution in Biological and Medical Sciences*. *Analytical chemistry*. May 1. (2000). p. 330-335.
- [5] Sritharan, K.; Strobl, C. J.; Schneider, M. F.; Wixforth, A. *Acoustic mixing at low Reynold's numbers*. *Applied Physics Letters*. Vol. 88, (2006).
- [6] Wixforth, A. *Acoustically Driven Programmable Microfluidics for Biological and Chemical Applications*. *JALA*. Vol. 11. (2006). p. 399-405.
- [7] Cardoso, V. F. *Microagitação acústica de fluidos baseada em polímeros electroactivos*. Departamento de Electrónica Industrial, Universidade do Minho. (2008). Tese de Mestrado.

- [8] Urban, G. A. *Micro – and nanobiosensors – state of the art and trends*. Measurement Science and Technology. Vol. 20. (2009). p. 1-18.
- [9] Srinivasan, V.; Pamula, V. K.; Fair, R. B. *An integrated digital microfluidic lab-on-a-chip for clinical diagnostics on human physiological fluids*. Lab Chip. Vol. 4. (2004). p. 310-315.
- [10] Polson, N. A.; Hayes, M. A. *Microfluidics Controlling Fluids in Small Places*. Analytical chemistry. June 1. (2001). p. 312-319.
- [11] Chow, A. W. *Lab-on-a-Chip: Opportunities for Chemical Engineering*. AIChE Journal. Vol. 48 (8). (2002). p. 1590-1595.
- [12] Minas, G. M. *Microsistema laboratorial para análise de fluidos biológicos*. Departamento de Electrónica Industrial, Universidade do Minho. (2004). Tese de Doutorado.
- [13] Van de Graaff, K. M.; Rhees, R. W. *Human Anatomy and Physiology – Schaum’s Outline Series*. McGraw-Hill, New York (2001).
- [14] Brickell, J.; Arneson, W. *Clinical Chemistry – A laboratory perspective*. F. A. Davis Company, Philadelphia (2007).
- [15] Hammett, F. S. *Studies of variations in the chemical composition of human blood*. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 41 (4). (1920). p. 599-615.
- [16] Nagler, R. M. *Editorial - Saliva Analysis for Monitoring Dialysis and Renal Function*. Clinical Chemistry. Vol. 54 (9). (2008). p. 1415-1417.
- [17] Bigler, L. R.; Streckfus, C. F. *Saliva as a diagnostic fluid*. Oral Diseases. Vol. 8. (2002). P. 69-76.
- [18] Barreiros, R.; Bossolan, G.; Trindade, C. *Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados*. Revista de Nutrição. Vol. 18(3). (2005). p. 377-389.
- [19] Sigma – Aldrich. [ONLINE] Consultado a 18 de Outubro de 2008 (url: <http://www.sigmaaldrich.com/>).

[20] Sigma – Aldrich. *Kits and Reagents for Metabolomic and Dietary Research*. [ONLINE] Consultado a 6 de Outubro de 2008 (url: <http://www.sigmaaldrich.com/>).

[21] Speciality Laboratories. [ONLINE] Consultado a 22 de Setembro de 2008 (url: <http://www.specialtylabs.com>).

[22] Arup Laboratories. [ONLINE] Consultado a 22 de Setembro de 2008 (url: <http://www.aruplab.com>).

[23] Akçay, T.; Konukodlu, D.; Kural, A. R. *Urinary Citrate Excretion in Patients with Urolithiasis*. T Klin J Med Sci. Vol. 16. (1996). p. 448-450.

[24] Ferguson, D. B. *Current Diagnostic Uses of Saliva*. J Dent Res. Vol. 66(2). (1987). p. 420-424.

[25] Hold, K. M. *Saliva as an analytical tool in toxicology*. Department of analysis and toxicology, Utrecht University. The Netherlands.

[26] Kaufman, E.; Lamster, I. B. *The diagnostic applications of saliva – a review*. Crit Rev Oral Biol Med. Vol. 13(2). (2002). p. 197-212.

[27] Nama, R.; Unnikrishnan, M; Babu, H. *Salivary nitrite levels as biomarker of antioxidant status in human volunteers*. College of Pharmaceutical Sciences, Manipal, Karnataka. India.

[28] Hillestad, J.; Brodin, P.; Bockman, O.; Mortensen, B.; Bjornland, T.; Olsen, I. *Relationship between nitrate/nitrite concentration in saliva and oral candidosis*. Microbial Ecology in Health and Disease. Vol. 17. (2005). p. 83-87.

[29] Tanaka, Y.; Naruishi, N.; Fukuya, H.; Sakata, J.; Saito, K.; Wakida, S. *Simultaneous determination of nitrite, nitrate, thiocyanate and uric acid in human saliva by capillary zone electrophoresis and its application to the study of daily variations*. Journal of Chromatography A. Vol. 1051. (2004). p. 193-197.

[30] Ellis, G.; Adatia, I.; Yazdanpanah, M; Makela, S. K. *Nitrite and Nitrate Analyses: A Clinical Biochemistry Perspective*. Clinical Biochemistry. Vol. 31(4). (1998). p. 195-220.

- [31] Bjorne, H.; Petersson, J.; Phillipson, M.; Weitzberg, E.; Holm, L.; Lundberg, J. O. *Nitrite in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness*. J. Clin. Invest. Vol. 113. (2004). p. 106-114.
- [32] Ames, B. N.; Cathcart, R.; Schwiers, E.; Hochstein, P. *Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant - and radical - caused aging and cancer: A hypothesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 78(11). (1981). p. 6858-6862.
- [33] Almadori, G.; Bussu, F.; Galli, J.; Limongelli, A.; Persichilli, S.; Zappacosta, B.; Minucci, A.; Paludetti, G.; Giardina, B. *Salivary glutathione and uric acid levels in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. Wiley InterScience. (2007).
- [34] Moore, S.; Calder, K. A. C.; Miller, N. J.; Rice-Evans, C. A. *Antioxidant activity of saliva and periodontal disease*. Free Rad. Res. Vol. 21(6). (1994). p. 417-425.
- [35] Pietraforte, D.; Castelli, M.; Metere, A.; Scorza, G.; Samoggia, P.; Menditto, A.; Minetti, M. *Salivary uric acid at the acidic pH of the stomach is the principal defense against nitrite-derived reactive species: Sparing effects of chlorogenic acid and serum albumin*. Free Radical Biology & Medicine. Vol. 41. (2006). p. 1753–1763.
- [36] Castagnola, M.; Cabras, S.; Denotti, G.; Fadda, M. B.; Gambarini, G.; Lupi, A.; Manca, I.; Onnis, G.; Piras, V.; Soro, V.; Tambaro, S.; Messana, I. *Circadian Rhythms of Histatin 1, Histatin 3, Histatin 5, Statherin and Uric Acid in Whole Human Saliva Secretion*. Biological Rhythm Research. Vol. 33(2). (2002). p. 213-222.
- [37] Mason, D. K.; Boyle, J. A.; Harden, R. M.; Duncan, A. M.; Greig, W. R. *The influence of flow rate on the concentration of uric acid in human parotid and submandibular saliva*. J. Dent. Res. September – October. (1966). p. 1439-1444.
- [38] Inoue, K.; Namiki, T.; Iwasaki, Y.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H. *Determination of uric acid in human saliva by high-performance liquid chromatography with amperometric electrochemical detection*. Journal of Chromatography B. Vol. 785. (2003). p. 57–63.

- [39] Guan, Y.; Chu, Q.; Ye, J. *Determination of uric acid in human saliva by capillary electrophoresis with electrochemical detection: potential application in fast diagnosis of gout*. *Anal Bioanal Chem.* Vol. (380). (2004). p. 913–917.
- [40] Guan, Y.; Wu, T.; Ye, J. *Determination of uric acid and p-aminohippuric acid in human saliva and urine using capillary electrophoresis with electrochemical detection: Potential application in fast diagnosis of renal disease*. *Journal of Chromatography B.* Vol. 821. (2005). p. 229-234.
- [41] Updegraff, H.; Lewis, H. B. *A quantitative study of some organic constituents of the saliva*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* (1924). p. 633-648.
- [42] Hawkins, G. R.; Zipkin, I.; Marshall, L. M. *Determination of Uric Acid, Tyrosine, Tryptophan, and Protein in Whole Human Parotid Saliva by Ultraviolet Absorption Spectrophotometry*. *J. dent. Res.* July – August. (1963). p. 1015-1022.
- [43] Hopkins, T. B. *Lab Notes – Guide to lab and diagnostic tests*. F. A. Davis Company, Philadelphia (2005).
- [44] Far Diagnostics. [ONLINE] Consultado a 6 de Outubro de 2008 (url: <http://www.fardiag.com/>).
- [45] Xing, X.; Shi, X.; Zhang, M.; Jin, W.; Ye, J. *CE determination of creatinine and uric acid in saliva and urine during exercise*. *Chromatographia.* Vol. 67. (2008). p. 985-988.
- [46] Wetzels, J. F. M.; Hafkenscheid, J. C. M.; Hessels, M.; Holtsma, A. J.; Koene, R. A. *Renal clearance of pancreatic and salivary amylase relative to creatinine clearance in patients with renal disease and proteinuria*. *Clin. Chem.* Vol. 34 (3). (1988). p. 589-591.
- [47] Hegarty, J. E.; O'Donnell, M. D.; McGeeney, K. F.; Fitzgerald, O. *Pancreatic and salivary amylase / creatinine clearance ratios in normal subjects and in patients with chronic pancreatitis*. *Gut.* Vol. 19. (1978). p. 350-354.
- [48] Keogh, J. B.; McGeeney, K. F.; Drury, M. I.; Counihan, T. B.; O'Donnell, M. D. *Renal clearance of pancreatic and salivary amylase relative to creatinine in patients with chronic renal insufficiency*. *Gut.* Vol. 19. (1978). p. 1125-1130.

- [49] Kang, M. S.; Kim, H. C. *Examining a possibility of usage of saliva for blood sugar tests*. IEEE. (2006). p. 235–238.
- [50] Yamaguchi, M.; Mitsumori, M.; Kano, Y. *Noninvasively Measuring Blood Glucose Using Saliva - A Bloodless Procedure Based on an Enzyme-Sensor System*. IEEE Engineering in medicine and biology. May / June. (1998). p. 59-63.
- [51] Englander, H. R.; Jeffay, A. I.; Fuller, I. B.; Chauncey, H. H. *Glucose Concentrations in Blood Plasma and Parotid Saliva of Individuals with and without Diabetes Mellitus*. Colleges of Medicine and Dentistry, University of Illinois, Chicago. (1963).
- [52] Burgen, A. S. V. *The secretion of potassium in saliva*. J. Physiol. Vol. 132. (1956). p. 20-39.
- [53] Akai, T.; Naka, K.; Yoshikawa, C.; Okuda, K.; Okamoto, T.; Yamagami, S.; Inoue, T.; Yamao, Y.; Yamada, S. *Salivary urea nitrogen as an index to renal function: a test-strip method*. Clinical Chemistry. Vol. 29 (10). (1983). p. 1825-1827.
- [54] Olympus. [ONLINE] Consultado a 30 de Julho de 2009 (url: [http:// www.olympus-global.com/en/corc/profile/company.cfm](http://www.olympus-global.com/en/corc/profile/company.cfm)).
- [55] Holme, D.; Peck, H. *Analytical biochemistry*, Third Edition. Prentice Hall, Edinburgh (1998).
- [56] Harvey, D. *Modern Analytical Chemistry*. McGraw – Hill, New York (2000).
- [57] Bass, M.; Van Stryland, E. W.; Williams, D. R.; Wolfe, W. L. *Handbook of Optics – Volume II: Devices, Measurements and Properties*, Second Edition. McGraw – Hill, United States of America (1995).
- [58] Gauglitz, G.; Vo - Dinh, T. *Handbook of Spectroscopy*. Wiley VCH, Weinheim (2003).
- [59] Patnaik, P. *Dean's Analytical Chemistry Handbook*, Second Edition. McGraw – Hill, New York (2004).

- [60] *Clinical Chemistry – Learning Guide*. Immunochemistry Diagnostics. Abbott laboratories. (2003).
- [61] Sinclair, I. R. *Sensors and Transducers*, Third Edition. Newnes, Oxford (2001).
- [62] Frampton, K. D.; Martin, S. E.; Minor, K. *The scaling of acoustic streaming for application in micro-fluidic devices*. Applied Acoustics. Vol. 64. (2003). p. 681-692.
- [63] Rife, J. C.; Bell, M. I.; Horwitz, J. S.; Kabler, M. N.; Auyeung, R. C. Y.; Kim, W. J. *Miniature valveless ultrasonic pumps and mixers*. Sensors and actuators. Vol. 86. (2000). p. 135-140.
- [64] Yaralioglu, G. G.; Wygant, I. O.; Marentis, T. C.; Khuri-Yakub, B. T. *Ultrasonic mixing in microfluidic channels using integrated transducers*. Anal. Chem. Vol. 76. (2004). p. 3694-3698.
- [65] Riley, N. *Steady Streaming*. Annu. Rev. Fluid Mechanics. Vol. 33. (2001). p. 43-65.
- [66] Loh, B. G.; Lee, D. R.; Kwon, K. *Acoustic streaming pattern induced by longitudinal ultrasonic vibration in an open channel using particle imaging velocimetry*. Applied Physics Letters. Vol. 89. (2006).
- [67] Hyun, S.; Lee, D. R.; Loh, B. G. *Investigation of convective heat transfer augmentation using acoustic streaming generated by ultrasonic vibrations*. International Journal of Heat and Mass Transfer. Vol. 48. (2005). p. 703-718.
- [68] Frampton, K. D.; Minor, K.; Martin, S. *Acoustic streaming in micro-scale cylindrical channels*. Applied Acoustics. Vol. 65. (2004). p. 1121-1129.
- [69] Riley, N. *Acoustic Streaming*. Theoretical and Computational Fluid Dynamics. Vol. 10. (1998). p. 349-356.
- [70] Squires, T. M.; Quake, S. R. *Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale*. Reviews of modern physics. Vol. 77(3). (2005). p. 977-1026.
- [71] Bur, A. J.; Roth, S. C. *Measurements of a piezoelectric d constant for poly(vinylidene fluoride) transducers using pressure pulses*. J. Appl. Phys. Vol. 57(1). (1985). p. 113-118.

- [72] Ahn, C. H.; Choi, J. W.; Beaucage, G.; Nevin, J. H.; Lee, J. B.; Puntambekar, A.; Lee, J. Y. *Disposable Smart Lab on a Chip for Point-of-care Clinical Diagnostics*. Proceedings of the IEEE. Vol. 92 (1). (2004).
- [73] Minas, G.; Wolffenbuttel, R. F.; Correia, J. H. *A lab-on-a-chip for spectrophotometric analysis of biological fluids*. Lab Chip. Vol. 5. (2005). p. 1303-1309.
- [74] Haeberle, S.; Zengerle, R. *Microfluidic platform for lab-on-a-chip applications*. Lab on a Chip. Vol. 7 (9). (2007). p. 1094-1110.
- [75] Kutz, M. *Handbook of Materials Selection*. John Wiley & Sons, New York (2002).
- [76] Heywang, W.; Lubitz, K.; Wersing, W. *Piezoelectricity - Evolution and Future of a Technology*. Springer, Berlin (2008).
- [77] Moulson, A. J.; Herbert, J. M. *Electroceramics – Materials, Properties, Applications*, Second Edition. Wiley, England (2003).
- [78] Castro, H. F. A. *Sensores e actuadores baseados em polímeros piezoelétricos*. Departamento de Electrónica Industrial, Universidade do Minho. (2006). Tese de Mestrado.
- [79] Dargaville, T.; Celina, M.; Elliott, J.; Chaplya, P.; Jones, G.; Mowery, D.; Assink, R.; Clough, R.; Martin, J. *Characterization, performance and optimization of PVDF as a piezoelectric film for advanced space mirror concepts*. Sandia National Laboratories, United States of America (2005).
- [80] Gantner, A. *Mathematical modeling and numerical simulation of piezoelectrical agitated surface acoustic waves*. Universidade de Augsburg. (2005). Tese de Doutorado.
- [81] Vinogradov, A.; Holloway, F. *Electro-mechanical properties of the piezoelectric polymer PVDF*. Ferroelectrics. Vol. 226. (1999). p. 169-181.
- [82] Sencadas, V.; Barbosa, R.; Mano, J. F.; Lanceros-Méndez, S. *Mechanical characterization and influence of the high temperature shrinkage of β -PVDF films on its electromechanical properties*. Ferroelectrics. Vol. 294. (2003). p. 61-71.

- [83] Newnham, R. E. *Properties of Materials - Anisotropy, Symmetry, Structure*. Oxford University Press, New York (2005).
- [84] Gregorio, R.; Ueno, E. M. *Effect of crystalline phase, orientation and temperature on the dielectric properties of poly(vinylidene fluoride) (PVDF)*. Journal of materials science. Vol. 34. (1999). p. 4489-4500.
- [85] Mohajir, B. E.; Heymans, N. *Changes in structural and mechanical behaviour of PVDF with processing and thermomechanical treatments. 1. Change in structure*. Polymer. Vol. 42. (2001). p. 5661-5667.
- [86] VICK. *Propriedades do PVDF*. [ONLINE] Consultado a 29 de Janeiro de 2009 (url: <http://www.vick.com.br/vick/produtos/pvdf/pvdf.htm>).
- [87] Boxman, R. *Review of TCO Thin Films*. Electrical Discharge and Plasma Laboratory, Tel Aviv University. [ONLINE] Consultado a 10 de Fevereiro de 2009 (url: <http://www.eng.tau.ac.il/~boxman/>).
- [88] Oliveira, C. *Influência das condições de deposição por DC magnetron*. Departamento de Física, Universidade do Minho. (2007). Tese de Mestrado.
- [89] Park, J. H.; Shin, J. M.; Cha, S. Y.; Park, J. W.; Jeong, S. Y.; Pak, H. K.; Cho, C. R. *Deposition – temperature effects on AZO thin films prepared by RF magnetron sputtering and their physical properties*. Journal of the Korean Physical Society. Vol. 49. (2006), p. 584-588.
- [90] Fang, G.; Li, D.; Yao, B. L. *Magnetron sputtered AZO thin films on commercial ITO glass for application of a very low resistance transparent electrode*. Journal of Physics D: Applied Physics. Vol. 35. (2002), p. 3096-3100.
- [91] Sutthana, S.; Sae-Kung, C.; Pratontep, S.; Mangkorntong, P.; Mangkorntong, N.; Choopun, S. *Electrical and Optical Properties of AZO/Ag/AZO Multilayer Thin Films Prepared by DC Magnetron Sputtering*. J. Nat. Sci. Special Issue on Nanotechnology. Vol. 7(1). (2008), p. 105-111.

[92] Minami, T. *Transparent conducting oxide semiconductors for transparent electrodes*. *Semicond. Sci. Technol.* Vol. 20 (4). (2005), p. 35-44.

[93] Stockett, M. *Optical Properties of Thin Transparent Conducting Oxide Films on Glass for Photovoltaic Applications*. College of Arts and Sciences, Oberlin College. (2006).

[94] Tvarozek, V.; Novotny, I.; Sutta, P.; Flickyngerova, S.; Harmatha, L.; Vavrinsky, E.; Nigrovicova, M.; Mullerova, J. *Physical properties of transparent conductive oxides prepared by RF reactive sputtering*. *Advanced Semiconductor Devices and Microsystems, 2006. ASDAM '06.* (2006).

[95] Singh, V.; Suman, C. K.; Kumar, S. *Indium Tin Oxide (ITO) films on flexible substrates for organic light emitting diodes*. *Proc. of ASID '06, New Delhi.* (2006), p. 388-391.

[96] Kim, S. M.; Rim, Y. S.; Keum, M. J.; Kim, K. H. *Study on the electrical and optical properties of ITO and AZO thin film by oxygen gas flow rate*. *Journal of Electroceramics.* (2008).

[97] Minami, T. *Present status of transparent conducting oxide thin-film development for Indium-Tin-Oxide (ITO) substitutes*. *Thin Solid Films.* Vol. 516. (2008), p. 5822-5828.

[98] Minami, T.; Ida, S.; Miyata, T. *High rate deposition of transparent conducting oxide thin films by vacuum arc plasma evaporation*. *Thin Solid Films.* Vol. 416. (2002), p. 92-96.

Anexo

Anexo 1 – Características de detecção por espectrofotometria

Tabela A. 1 - Características técnicas da detecção das várias biomoléculas por espectrofotometria.

Biomolécula	Referência	Método de detecção	Reagentes	Comprimento de onda	Tempo de reação	Temperatura ótima	Linearidade	Sensibilidade	Razão amostra/reagente	Standard
Frutose	Sigma Aldrich Ref. FA - 20	endpoint enzimático	Fosfoglucose isomerase, Sulfato de amónia, NAD, ATP, Hexocinase, Glicose 6-fosfato desidrogenase.	340 nm	15 minutos	18 - 35 ° C	-	-	-	-
Citrato	Far Diagnostics Ref. 7046	endpoint enzimático UV	Buffer (pH 7.8), NADH, L-LDH, L-MDH, Citrato Liase.	340 nm	5 + 10 minutos	37 ° C	até aos 250 mg/l	-	1/40/10	250 mg/l
Nitrito	Fluka Ref. 23479	-	Buffer (pH 7.6), Nitrito redutase, Co-factores enzimáticos, Sulfanilamida, Naftiletilenediamina.	540 nm	5 + 10 minutos	22 ° C	10 até 100 μ mol/l	-	-	100 μ M
Ácido úrico	Far Diagnostics Ref. 7148	endpoint positivo	Buffer de fosfato /borato (pH 7.0), ESPT, 4-aminofenazona, Uricase, POD, Azido de sódio.	550 nm	10 minutos	37 ° C	até 1487.5 μ mol/l (25 mg/dl)	0,2 mg/dl	1/40	Ácido úrico 297.5 μ mol/l; Azido de sódio, 15 mmol/l
Albumina	Far Diagnostics Ref. 7008	endpoint positivo	Buffer de citrato (pH 8,3), BCG, Triton X-100.	628 nm	Imediato	20 - 37 ° C	até 6 g/dl	0,1 g/dl	1/150	4 g/dl
Creatinina	Far Diagnostics Ref. 7074	endpoint positivo	Hidróxido de sódio, ácido pícrico.	510 nm	30 segundos + 1 minuto	30 ou 37 ° C	até 884 μ mol/l (10 mg/dl)	0,07 mg/dl	1/10	176,8 μ mol/l
Glicose	Far Diagnostics Ref. 7082	endpoint positivo	Buffer fosfato (pH 7,4), Fenol, 4-aminofenazona, GOD, POD, Azido de sódio.	510 nm	10 minutos	37 ° C	até 500 mg/dl	3 mg/dl	1/125	Glicose 5,55 mmol/l; Ácido benzóico 15 mmol/l
Potássio	Far Diagnostics Ref. 7118	endpoint enzimático UV	Buffer (pH 8,2), Fosfoenolpiruvato, ADP, Piruvato cinase, NADH, Buffer (pH 7,3), LDH.	340 nm	2 + 2 minutos	37 ° C	2 até 10 mmol/l (7,8 – 39,0 mg/dl)	-	1/35/15	2,5 mmol/l
Ureia de nitrogénio	Far Diagnostics Ref. 7142	endpoint negativo	NADH, ADP, Urease, GLDH, Tris buffer (pH 8,0), A-cetoglutarato, Azido de sódio.	340 nm	30 + 30 segundos	37 ° C	até 300 mg/dl	3 mg/dl	1/100	Ureia 6,65 mmol/l; Ácido benzóico 15 mmol/l
Magnésio	Olympus Ref. 0SR6189	endpoint positivo	ϵ – Amino-n Ácido Capróico, Tris, Azul de xilidil, Glicoleterdiamina – N, N, N', N'ácido tetraacético.	520 nm	8 minutos	37° C	0,2 até 9,25 mmol/l (0,5 – 22,5 mg/dl)	0,02 mmol/l	1/200	Magnésio 0,97 mmol/l (2,36 mg/dl)

