

**Dinâmica de fluidos biomiméticos usados em dispositivos  
microfluídicos do tipo lab-on-a-chip**

**Cristiana da Silva Caldeira**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Engenharia Mecânica**

Orientador(es): Prof. António Luís Nobre Moreira

Dr. Ana Sofia Oliveira Henriques Moita

**Júri**

Presidente: Prof. Edgar Caetano Fernandes

Orientador: Dr. Ana Sofia Oliveira Henriques Moita

Vogal: Prof. Rui Alberto Madeira Macedo de Lima

**Novembro 2019**



## Agradecimentos

Em primeiro lugar, queria agradecer à minha orientadora Doutora Ana Moita por todo o apoio e confiança depositada em mim, por me ter ajudado a compreender o tema a desenvolver e por esclarecer qualquer dúvida que me surgiu.

Agradeço também ao Professor António Moreira por me aceitar no grupo de investigação e a todos os que me acolheram no laboratório. Agradeço ainda à Fundação para Ciência e Tecnologia (FCT), pelo financiamento de uma bolsa de investigação no âmbito do projeto IF-EXPLOR IF/00810/2015.

Ao professor Rui Lima, pela disponibilidade que teve para comigo, por me ter recebido na Universidade do Minho para conseguir concluir a minha dissertação, realizando os ensaios de deformação das partículas, e pela paciência e tempo que facultou. Sem esquecer, a minha colega Inês Maia, que me acompanhou nesta última fase do meu trabalho, sem ela não teria sido possível fechar este capítulo, o meu muito obrigada.

Ao Pedro Pontes, agradeço a partilha do seu conhecimento em algumas áreas que me foram úteis, e pela disponibilidade de me ajudar no tratamento de imagens para que fosse possível analisá-las.

À minha amiga Sofia Domingos, à minha irmã e ao meu irmão pôr estarem disponíveis quando precisei de realizar certos ensaios e me acompanharam na atividade, também por me apoiarem e nunca me deixarem desanimar.

Ao meu namorado, por me ter aturado nesta fase do meu percurso académico, por ter acreditado sempre em mim, por me ter ajudado quando mais precisei e pela disponibilidade que sempre mostrou, tendo participado também em algumas atividades desenvolvidas por mim.

Aos meus pais que sempre acreditaram nas minhas capacidades e nunca duvidaram por um segundo do meu valor, sem eles não teria chegado aqui.

Por fim, agradeço ao Técnico pela experiência que me facultou, a sua excelência e exigência no ensino, e em especial, pelos amigos que encontrei.



# Resumo

Esta dissertação apresenta a caracterização do comportamento dinâmico de gotas de fluidos análogos ao sangue, em superfícies hidrofóbicas sob atuação eletrostática (*electrowetting*), para avaliar o seu uso no desenvolvimento de dispositivos microfluídicos controlados por atuação eletrostática, para serem usados no futuro como auxiliares de diagnóstico. O enfoque do diagnóstico estará no estudo da deformação das células, pelo que a deformação das partículas que constituem os fluidos são analisados em pormenor. Analisaram-se soluções aquosas de goma xantana, para mimetizar o comportamento não-Newtoniano do sangue, soluções aquosas com partículas de PMMA e uma solução aquosa com um surfactante, com partículas semirrígidas.

A resposta dinâmica dos fluidos à atuação eletrostática foi avaliada em gotas, quantificando a variação do ângulo de contacto e a evolução temporal do diâmetro de espalhamento sob atuação. Os resultados mostram que a variação da concentração da goma e das partículas e/ou do seu tamanho não influencia a resposta dinâmica do fluido à atuação. As soluções de surfactante são as que apresentam a pior resposta à atuação, devido à sua baixa tensão superficial.

A deformação das partículas foi avaliada em microcanais com contrações hiperbólicas que permitiam uma deformação reprodutível e controlada, sendo caracterizada pelo Índice de Deformação e pela velocidade ao longo do microcanal. As partículas de PMMA revelaram-se mais rígidas, tendo um comportamento mais semelhante entre si, tanto ao nível do Índice de Deformação como da velocidade ao longo do microcanal. Porém as partículas de surfactante apresentam um comportamento de deformação mais próximo do das células reais.

**Palavras-chave:** molhabilidade, *electrowetting*, fluido biomiméticos, dispositivos microfluídicos, micropartículas deformáveis.



# Abstract

This dissertation presents the characterization of the dynamic behavior of blood-like fluid droplets on electrowetting hydrophobic surfaces to evaluate their use in the development of electrostatic-controlled microfluidic devices for future use as diagnostic aids. The focus of the diagnosis will be on the study of cell deformation, whereby the deformation of the particles that make up the fluids are analyzed in detail. aqueous xanthan gum solutions were analyzed to mimic non-Newtonian blood behavior, PMMA particle aqueous solutions and a semi-rigid particulate aqueous surfactant solution.

The fluid dynamic response to electrostatic actuation was evaluated in drops, quantifying the contact angle variation and the temporal evolution of the acting scattering diameter. The results show that the variation of gum and particle concentration and / or size does not influence the fluid dynamic response to actuation. Surfactant solutions have the worst response to actuation due to their low surface tension.

The deformation of the particles was evaluated in microchannels with hyperbolic contractions that allowed a reproducible and controlled deformation, being characterized by the deformation index and the velocity along the microchannel. PMMA particles were more rigid and had a more similar behavior in terms of both the deformation index and the velocity along the microchannel. However, the surfactant particles exhibit a deformation behavior closer to that of the actual cells.

**Keywords:** wettability, electrowetting, biomimetic fluid, microfluidic devices, deformable microparticles.





# Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo .....	V
Abstract.....	VII
Índice .....	IX
Lista de Figuras .....	XI
Lista de Tabelas .....	XIII
Lista de Acrónimos .....	XV
Nomenclatura .....	XVII
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1. Contexto e motivação.....	1
1.2. Estado de arte .....	4
1.3. Objetivos.....	9
1.4. Estrutura .....	10
<b>2. Fundamentos teóricos .....</b>	<b>12</b>
2.1. Molhabilidade.....	12
2.2. <i>Electrowetting</i> .....	17
2.3. Deformação de partículas .....	21
<b>3. Metodologia e implementação experimental.....</b>	<b>26</b>
3.1. Instalação experimental para caracterização da molhabilidade e da tensão superficial, com e sem atuação eletrostática.....	26
3.1.1. Arranjo experimental para a caracterização da molhabilidade sem atuação eletrostática	26
3.1.2. Arranjo experimental para a realização da molhabilidade estática e comportamento dinâmico das gotas por atuação eletrostática .....	27
3.2. Instalação experimental e condições de funcionamentos usadas na caracterização da deformação das partículas nos fluidos biomiméticos.....	29
3.3. Procedimento experimental.....	30
3.3.1. Preparação das soluções e caracterização das propriedades suas termofísicas .....	30
3.3.2. Caracterização e seleção das superfícies .....	33
3.3.3. Medição dos ângulos de contacto estáticos com e sem atuação eletrostática .....	34

3.3.4.	Medição dos ângulos de contacto quasi-estáticos.....	35
3.3.5.	Medição do diâmetro de espalhamento da gota sob atuação eletrostática .....	35
3.3.6.	Medição do índice de deformação e da velocidade das partículas em microcanais ....	37
3.4.	Quantificação de incertezas .....	39
3.4.1.	Medição da tensão superficial, ângulos de contacto estáticos e quasi-estáticos .....	39
3.4.2.	Medição do diâmetro de espalhamento .....	40
3.4.3.	Medições associadas à deformação de partículas .....	40
<b>4.</b>	<b>Resultados e discussão.....</b>	<b>41</b>
4.1.	Caraterização da molhabilidade dos fluidos biomiméticos em relação ao material dielétrico que compõe o dispositivo microfluídico.....	41
4.2.	Caraterização da resposta das gotas dos fluidos biomiméticos à atuação eletrostática.....	44
4.3.	Comportamento dos fluidos biomiméticos em escoamento nos microcanais: Deformação das partículas .....	48
<b>5.</b>	<b>Conclusões e proposta para trabalhos futuros .....</b>	<b>57</b>
5.1.	Conclusões .....	57
5.2.	Proposta para trabalhos futuros .....	59
	<b>Referências .....</b>	<b>60</b>

# Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Classificação dos regimes de molhabilidade, consoante os ângulos de contacto. ....	4
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática de um a) sistema fechado, b) sistema aberto.....	8
<b>Figura 3:</b> Balanço das tensões interfaciais entre o sólido, o líquido e o ar envolvente. Definição do ângulo de contacto de equilíbrio. ....	12
<b>Figura 4:</b> Forças de interação de moléculas numa gota. Baseado em Yuan e Lee (2013).....	13
<b>Figura 5:</b> Molhabilidade (a) homogénea (regime de Wenzel) e (b) heterogénea (regime de Cassie e Baxter). ....	14
<b>Figura 6:</b> Determinação do ângulo de avanço e recuo pelo método da placa inclinada. ....	15
<b>Figura 7:</b> Determinação do ângulo de contacto de avanço e recuo pelo método de variação controlada do volume da gota, usado neste trabalho. ....	15
<b>Figura 8:</b> Dupla camada elétrica espontânea.....	18
<b>Figura 9:</b> Balanço de forças na linha de contacto da gota sob aplicação de força eletrostática. ....	20
<b>Figura 10:</b> Imagem ilustrativa da deformação de uma partícula. ....	21
<b>Figura 11:</b> Escoamento de um fluido em contrações com diferentes formas: (a) contração repentina, (b) contração suave e (c) contração hiperbólica. ....	25
<b>Figura 12:</b> Câmara de Perspex com janelas de quartzo. ....	26
<b>Figura 13:</b> Tensiómetro ótico Attension.....	27
<b>Figura 14:</b> Montagem para captação do diâmetro de espalhamento. ....	28
<b>Figura 15:</b> Esquemática da instalação experimental da atuação eletrostática. ....	28
<b>Figura 16:</b> Microcanais utilizados para caraterizar a deformação das partículas nos fluidos biomiméticos. (a) Foto ilustrativa do dispositivo microfluídico com os microcanais b) geometria do microcanal vista ao microscópio ótico (Ampliação da imagem) e c) tamanho dos microcanais. ....	29
<b>Figura 17:</b> Instalação experimental usada para determinar a deformação de partículas. ....	30
<b>Figura 18:</b> Esquema da gota pendente. ....	31
<b>Figura 19:</b> Visualização do Software One Attension. ....	32
<b>Figura 20:</b> Medição dos ângulos de contacto (à esquerda e à direita), pelo Software One Attension. ....	34
<b>Figura 21:</b> Medição dos ângulos de contacto quasi-estáticos, (a) avanço e (b) recuo.....	35
<b>Figura 22:</b> Análise do diâmetro de espalhamento da gota, Software Matlab, (a) processamento das imagens, (b) eliminação das interferências, gota superfície, (c) nivelar imagem e (d) seleção da fronteira gota superfície. ....	36

<b>Figura 23:</b> Etapas principais para calcular o Índice de Deformação (neste caso surfactante), (a) imagem inicial, (b) criado o <i>background</i> , (c) subtração do <i>background</i> em relação à imagem inicial, (d) ajuste de imagem, (e) cálculo do X e Y para determinar o ID e (f) Resultados obtidos. ....	38
<b>Figura 24:</b> Etapas principais para calcular a velocidade das partículas nos microcanais (neste caso PMMA), (a) imagem inicial, (b) imagem ajustada e (c) seleção de pontos para obter a velocidade e (d) comando para análise da velocidade. ....	39
<b>Figura 25:</b> Ângulos de contacto sobre atuação eletrostática das soluções: (a) gomas, (b) PMMA, (c) surfactante e d) goma 0,05wt%, PMMA 6 $\mu$ m e surfactante sem filtro. ....	45
<b>Figura 26:</b> Representação das gotas e do diâmetro de espalhamento das soluções PMMA: (a) 6 $\mu$ m, (b) 10 $\mu$ m e (c) 20 $\mu$ m. ....	47
<b>Figura 27:</b> Forma das partículas nos microcanais, onde existe o estreitamento (ampliação), (a) Surfactante e (b) PMMA. ....	49
<b>Figura 28:</b> Deslocamento de uma partícula PMMA em diferentes tempos: (a) 0,70 s, (b) 1,03 s, (c) 1,10 s e (d) 1,13 s. ....	50
<b>Figura 29:</b> Deslocamento de uma partícula de surfactante em diferentes tempos: (a) 6,37 s, (b) 6,60 s, (c) 6,70 s e (d) 6,73 s. ....	50
<b>Figura 30:</b> Imagens ampliadas dos microcanais ilustrativas da deformação, (a) surfactante e (b) PMMA. ....	51
<b>Figura 31:</b> Deformação de partículas de PMMA, (a) percurso de uma partícula no microcanal (b) e (d) gráficos da velocidade de partículas em função do deslocamento ao longo do canal e (c) e (e) gráficos do índice de deformação de partículas, em função do deslocamento ao longo do canal. ....	53
<b>Figura 32:</b> Deformação de partículas de Surfactante, (a) percurso de uma partícula no microcanal (b) e (d) gráficos da velocidade de partículas em função do deslocamento ao longo do canal e (c) e (e) gráficos do índice de deformação de partículas, em função do deslocamento ao longo do canal. ....	55
<b>Figura 33:</b> Índice de deformação máximo obtido em cada solução em estudo e das células reais (Pinho, 2018) com o diâmetro médio das partículas. ....	55

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Propriedades físicas das soluções estudadas neste trabalho e da água destilada. <sup>1</sup> Valor retirado de Ramos (2014). <sup>2</sup> Valores retirados de Moita et al. (2015). .....	33
<b>Tabela 2:</b> Propriedades de camadas dielétricas (Melai et al., 2009; Liu et al., 2010; Kumar & Sharma, 2012).....	33
<b>Tabela 3:</b> Ângulos de contacto estáticos em equilíbrio medidos para diferentes soluções na superfície de Teflon. <sup>3</sup> Valor retirado de Laurência (2015). .....	42
<b>Tabela 4:</b> Ângulo de contacto estático de equilíbrio da solução PMMA medidos nas superfícies de PDMS e Teflon. ....	42
<b>Tabela 5:</b> Ângulos quasi-estáticos de avanço e de recuo e valor da histerese para as soluções de PMMA nas diferentes superfícies em estudo (PDMS e Teflon).....	43



## Lista de Acrónimos

$\mu$ TAS	<i>micro-Total Anaysis Systems</i>
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
EWOD	<i>Electrowetting On Dielectric</i>
DC	Corrente contínua
LOC	<i>Lab-on-a-chip</i>
MEMS	<i>Microelectromechanical systems</i>
PDMS	<i>Polidimetilsiloxano</i>
PMMA	<i>Poli(metacrilato de metila) (em inglês poly(methyl methacrylate))</i>
PTFE	Politetrafluoretileno





## Nomenclatura

$C_f$	Fator de calibração ( <i>pixel/mm</i> ).
$C_H$	Capacitância da dupla camada (F)
$D$	Diâmetro da gota ao longo do tempo da atuação eletrostática ( $\mu\text{m}$ )
$D_0$	Diâmetro inicial da gota depositada (sem atuação eletrostática) ( $\mu\text{m}$ )
$d_H$	Espessura da dupla camada espontânea (m)
$dV$	Diferença de potencial
$e$	Erro relativo (%)
$e_{dgota}$	Erro da definição da fronteira da gota
$f_r$	Fração da área projetada na superfície sólida molhada pelo líquido
$f_{res}$	Força de resistência da superfície (N)
$F$	Força que atua sobre o fluido (N)
$F_e$	Força eletrostática (N)
$F_{ex}$	Componente horizontal da força eletrostática (N)
$F_{ey}$	Componente vertical da força eletrostática (N)
$F_{inercia}$	Força de inércia (N)
$F_{viscosa}$	Força viscosa (N)
$g$	Constante de aceleração gravitacional ( $\text{m/s}^2$ )
$ID$	Índice de Deformação
$L$	Comprimento característico da geometria (m)
$p$	Pressão (Pa)
$r_f$	Fator de rugosidade na superfície molhada
$R$	Raio da gota depositada (m)
$R_0$	Raio principal de curvatura na origem (m)
$R_1$	Raio principal de curvatura definido no plano xy (m)
$R_2$	Raio principal de curvatura definido no plano perpendicular ao plano xy (m)
$Re$	Número de Reynolds
$t$	Tempo (s)
$U$	Velocidade do fluido (m/s)
$\nu$	Viscosidade ( $\text{m}^2/\text{s}$ )
$\vec{v}$	Vetor de velocidade (m/s)
$V$	Tensão aplicada (V)
$V_{pcz}$	Diferença de potencial de carga zero (V)
$W_{ad}$	Trabalho de adesão (J)
$X$	Comprimento maior da partícula referente à coordenada x ( $\mu\text{m}$ )
$y$	Coordenada vertical (m)
$Y$	Comprimento menor da partícula referente à coordenada y ( $\mu\text{m}$ )

## Simbologia Grega

$\gamma_{LV}$	Tensão interfacial entre o líquido e o gás (N/m)
$\gamma_{SL}$	Tensão interfacial entre o sólido e o líquido (N/m)
$\gamma_{SV}$	Tensão interfacial entre o sólido e o gás (N/m)
$\beta$	Fator de forma
$\epsilon_0$	Contante dielétrica do vácuo (F/m)
$\epsilon_1$	Contante dielétrica da superfície (F/m)
$\eta$	Coefficiente de viscosidade dinâmica (kg/(ms))
$\eta p$	Soluto polimérico
$\eta s$	Solvente Newtoniano
$\theta$	Ângulo de contacto após a atuação eletrostática (°)
$\theta_Y$	Ângulo de contacto estático ou de equilíbrio (sem atuação eletrostática) (°)
$\theta_A$	Ângulo quasi-estático de avanço (°)
$\theta_R$	Ângulo quasi-estático de recuo (°)
$\theta_r$	Ângulo aparente que é medido na superfície (°)
$\theta_S$	Ângulo de contacto de saturação (°)
$\rho$	Massa específica do líquido (Kg/m <sup>3</sup> )
$\tau$	Tensão de corte do fluido (Pa)
$\sigma_{SL}$	Densidade de carga interfacial entre o sólido e o líquido (C/m)
$\Delta C_f$	Erro relativo cometido na calibração
$\Delta E_{ID}$	Incerteza de medidas
$\Delta lim/lim$	Erro relativo associado à seleção do utilizador
$\Delta p$	Diferença de pressão ao longo da interface (Pa)
$\Delta pre/pre$	Incerteza associada ao pré-processamento
$\Delta \theta$	Histerese (°)
$\Delta \rho$	Diferença de densidade ao longo da interface da gota (kg/m <sup>3</sup> )

# 1. Introdução

Este capítulo serve de enquadramento a esta dissertação, apresentado o contexto e motivação que conduziram ao seu desenvolvimento, bem como o estado de arte, no qual estão descritos os avanços na literatura dentro do tema deste trabalho, para melhor contextualizar o presente estudo. Neste capítulo introdutório também são apresentados os objetivos do trabalho e a estrutura da dissertação.

## 1.1. Contexto e motivação

A minimização de recursos tem sido, ao longo dos anos, um tema bastante discutido na sociedade, tanto ao nível de recursos económicos como energéticos e materiais. Surgiu assim, o interesse em novas tecnologias, em particular a exploração das micro e nanotecnologias que têm desempenhado um papel crucial na nossa sociedade. Nos últimos anos, constata-se um crescente desenvolvimento de microssistemas para diversas aplicações, tais como em sistemas de conversão de energia ou sistemas para análises bioquímicas.

Assim, os dispositivos microfluídicos têm-se tornado numa das novas ferramentas mais promissoras para diagnóstico clínico e tratamento de várias doenças crónicas, dando origem ao seu desenvolvimento (Dance, 2017). Nos últimos anos, estes dispositivos têm sido explorados (Lee *et al.*, 2010), nomeadamente na manipulação de pequenas amostras biológicas em sistemas microeletromecânicos (*microelectromechanical systems*) (MEMS), que são capazes de realizar todo um trabalho de laboratório, tal como preparação e manipulação da amostra, separação, reações para análise e deteção, sendo estes dispositivos designados por *lab-on-a-chip* (LOC), (Takahashi *et al.*, 2004; Gossett *et al.*, 2010; Vergeuwe *et al.*, 2011; Chim, 2015; Shields *et al.*, 2015).

Estes dispositivos são aplicáveis em várias áreas, mas é na área da saúde e da Bioengenharia que a sua aplicação tem suscitado maior interesse na comunidade científica, na miniaturização de sistemas para análises clínicas e bioquímicas (Pollack *et al.*, 2011). Essa tecnologia, LOC, oferece novas perspetivas para análises químicas de rotina, bioensaios, assistência médica e dispositivos de diagnóstico, incluindo deteção não invasiva e precoce de cancro (Kaler *et al.*, 2010).

O *lab-on-a-chip* também conhecido por *micro-Total Analysis Systems*, o  $\mu$ TAS (Manz *et al.*, 1990) é um sistema miniaturizado que automatiza uma série de funções de laboratório dentro de um único dispositivo. Os seus benefícios incluem para além da integração funcional, a redução do consumo de amostras e reagentes, proporcionando também uma análise mais rápida, uma maior reprodutibilidade, um maior rendimento e uma maior portabilidade (Pollack *et al.*, 2011). Além disso, esta tecnologia é propícia à automação, o que reduz o erro humano (Dance, 2017), e minimiza os problemas de contaminação (Lin *et al.*, 2010). Por outro lado, estes microssistemas permitem um controlo mais eficaz das reações devido às reduzidas escalas temporais e espaciais.

Existem várias vertentes onde estes dispositivos são aplicados. Por exemplo, há um grande interesse em usar essa tecnologia para investigar o fluxo sanguíneo, melhorar o conhecimento sobre o

comportamento saudável e patológico do sangue, ou melhorar os exames médicos e desenvolver melhores dispositivos para um monitoramento mais amplo dos parâmetros de saúde no *point-of-care* (POC) (Lanotte, 2013). As aplicações *point-of-care* são úteis em áreas específicas onde é necessário um rápido monitoramento e detecção para melhorar as decisões médicas e os tratamentos, como em unidades de terapia intensiva, ambientes operacionais ou residências de pacientes (Lanotte, 2013). Também pela sua flexibilidade, simplicidade, portabilidade e automação, são cada vez mais importantes nos dias de hoje, devido aos poucos recursos necessários tanto energéticos como materiais (Yi & Kim, 2006), principalmente nos países em desenvolvimento (Yager *et al.*, 2008).

Por outro lado, pela reduzida dimensão dos sistemas microfluídicos, os processos de transporte e manipulação das amostras são controlados a uma escala onde são facilmente afetados pelas propriedades do próprio escoamento e das próprias amostras, que podem ser assim usadas no diagnóstico clínico.

A maioria dos dispositivos microfluídicos existentes baseia o transporte das amostras biológicas em escoamentos contínuos no interior de microcanais (segundo a classificação de Sharp e Adrian (2004), i.e., canais com diâmetros hidráulicos inferiores a 1 milímetro e superiores a 1 microm). Apesar de funcionais, estes dispositivos apresentam diversos problemas devido ao facto de usarem bombas, sensores, válvulas e outros elementos auxiliares complexos, que podem originar microbolhas de desgaseificação, uma vez que, é difícil controlar vários reagentes simultaneamente com uma rede complexa de canais conectados, mesmo usando arquiteturas de microválvulas (Kaler *et al.*, 2010). A manipulação de fluidos em microcanais requer a utilização das tais bombas e elementos auxiliares complexos, referido anteriormente, que consomem energia elétrica e mecânica, e necessitam de elevadas pressões ou tensões para transportar as soluções pelo sistema (Gilmore & Seah, 2000; Hetsroni *et al.*, 2005; Taylor & Krupenkin, 2011; Rokade *et al.*, 2014). Outros inconvenientes destes sistemas são as oscilações no escoamento, o entupimento dos canais e o difícil acesso às amostras (Pollack *et al.*, 2002; Cooney *et al.*, 2006; Mohamed, *et al.*, 2007; Kaler *et al.*, 2010). Algumas destas desvantagens foram comprovadas no presente trabalho, nos ensaios de deformação das partículas, onde o entupimento dos canais, o acesso às amostras e a limpeza levantaram diversos obstáculos à realização dos ensaios.

Como alternativa a esta configuração com microcanais, surgiu um interesse em sistemas que usam microgotas para manuseamento e análise das amostras biológicas. Devido ao impacto destas tecnologias e estudos realizados é possível separar, transportar e misturar microgotas ao longo de superfícies com percursos programáveis (Mugele & Baret, 2005). Esta configuração diminui a necessidade de equipamentos auxiliares, devido ao domínio das forças de tensão superficial em relação às forças de pressão e de dissipação. Esta solução permite também que o tempo necessário para a análise seja menor e reduz o consumo de reagentes, amostras e energia (Brassard *et al.*, 2008; Shamai *et al.*, 2008). Esta configuração permite assim o transporte de amostras em microgotas apenas por alteração da molhabilidade na interface gota-superfície, sem recorrer a qualquer contacto mecânico, ou seja, por meio de atuação eletrostática (Orejon *et al.*, 2013). Este processo, de alteração da molhabilidade designa-se por *electrowetting* e permite movimentar, transportar, misturar e separar

gotas de volumes na ordem dos micro ou nanolitros de uma forma rápida e eficiente, com consumos de potência relativamente baixo (Kang, 2002). Esta configuração favorece por exemplo o diagnóstico do tipo *point-of-care*, que em países em desenvolvimento é uma mais valia para a realização de análises biológicas em condições extremas. A grande taxa de mortalidade nestes países não só depende da falta de tratamento como tanto do diagnóstico atempado da doença, pois em algumas regiões é praticamente impossível a realização destas análises (Urdea *et al.*, 2006; Yager *et al.*, 2006; Yager *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010).

A análise da composição química de fluidos, por exemplo, fisiológicos (sangue, urina) tem sido fortemente explorada, por ação eletrostática, através do transporte de gotas do fluido no chip para exame de células (Shamai *et al.*, 2008). Considera-se que até os microssistemas baseados em microgotas controlado por *electrowetting*, para transporte e análise de fluidos fisiológicos sejam a solução mais promissora, pois este método é pouco invasivo e é necessário um volume reduzido da amostra (Srinivasan *et al.*, 2004). O objetivo futuro é diminuir a tensão aplicada para que ocorra alteração da molhabilidade da gota até uma gama de valores entre 10 a 20 V. Mugele e Baret (2005) referem que é necessária uma tensão na ordem das dezenas de volts, no entanto, Novo (2016) considera que a tensão aplicada no transporte de fluidos biológicos é geralmente superior, atingindo valores da ordem das centenas de volts. Assim, apesar do *electrowetting* ser atualmente utilizado em diversas aplicações, a configuração ótima de dispositivos microfluídicos para análise de amostras biológicas é ainda uma incógnita que depende de inúmeros parâmetros ainda por compreender.

Dispositivos microfabricados podem ser usados para desenvolver e melhorar a compreensão do comportamento do fluxo sanguíneo e de suas populações hematológicas, realizando a separação e classificação dos subtipos de células. As técnicas de separação são uma aplicação importante de dispositivos microfluídicos que desempenham um papel importante em ensaios biomédicos (Bhagat *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014; Siddhartha *et al.*, 2015). A manipulação do sangue real é muitas vezes difícil devido a questões éticas, económicas e de contaminação, principalmente para trabalhos de laboratório envolvendo sangue patológico.

Neste contexto, é importante desenvolver fluidos biomiméticos. Estes fluidos são também importantes para o desenvolvimento dos dispositivos microfluídicos dado que o seu projeto, tanto para o transporte das amostras como para o diagnóstico, depende da compreensão das características do fluido e do seu escoamento. A literatura compila o comportamento de diferentes fluidos análogos ao sangue, para posteriormente ser mais acessível compreender o comportamento do próprio sangue, ou mesmo, de outros fluidos fisiológicos, através da atuação eletrostática e o estudo da deformação de partículas em microcanais. No entanto, seria mais interessante desenvolver um análogo do sangue tanto ao nível de viscosidade, como do tamanho e características das partículas, capaz de imitar, simultaneamente, o comportamento reológico do sangue real e sua natureza multifásica heterogênea, atingindo a resposta Hemo reológica das diferentes populações sanguíneas hematológicas. Neste contexto, o presente trabalho pretende contribuir para o desenvolvimento de fluidos análogos, avaliando o seu comportamento e o seu potencial uso em dispositivos microfluídicos para diagnóstico atuados eletrostaticamente.

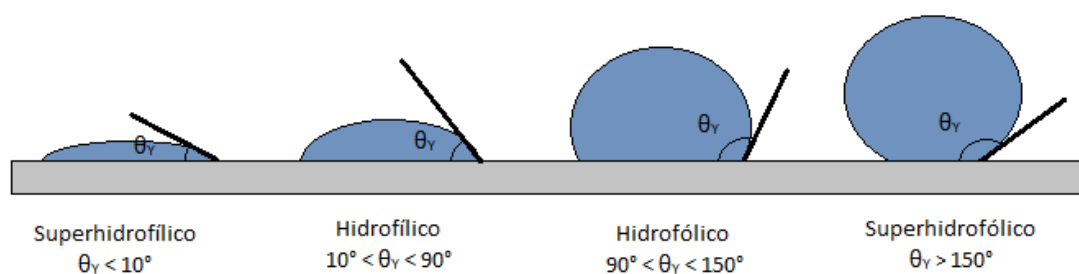
## 1.2. Estado de arte

De modo a estudar o comportamento do fluido e a avaliar a melhor forma de realizar a manipulação de gotas nos microdispositivos que se pretende desenvolver, é necessário ter em conta as propriedades do líquido e da superfície em que está em contacto. Assim, a molhabilidade é uma propriedade importante que está associada à facilidade com que um líquido se espalha sobre uma superfície, ou seja, é a capacidade de um líquido manter contacto com uma superfície sólida, resultante de interações intermoleculares. Existem, essencialmente, duas estratégias de manipulação capilar de microfluidos: através da alteração da tensão superficial entre o líquido e o sólido,  $\gamma_{SL}$ , ou pela indução de um gradiente na tensão superficial entre o líquido e o gás,  $\gamma_{LV}$ . A primeira pode alcançar-se com a utilização de superfícies não homogêneas, ou seja, com regiões de diferentes molhabilidades, que podem ser obtidas por modificação da química e/ou da topografia das superfícies. A segunda resulta essencialmente da modificação das propriedades do líquido (por exemplo pela adição de um surfactante). A molhabilidade pode também alterar-se por atuação externa de um campo elétrico ou magnético, como usado neste trabalho. Quando uma gota de líquido é depositada sobre uma superfície sólida, esta encontra uma posição de equilíbrio, definido pelo balanço de tensões interfaciais entre a superfície sólida, o líquido e o gás/vapor que envolve a gota. Thomaz Young (1805) define que a relação entre estas tensões e o ângulo de contacto de equilíbrio ou ângulo estático,  $\theta_Y$ , é dada por:

$$\gamma_{LV} \cdot \cos\theta_Y + \gamma_{SL} = \gamma_{SV} \quad (1)$$

onde  $\gamma_{LV}$  é a tensão interfacial entre o líquido e o gás/vapor envolvente,  $\gamma_{SL}$  a tensão superficial entre o sólido e o líquido e  $\gamma_{SV}$  a tensão interfacial entre o sólido e o gás.

Em termos de molhabilidade, podem distinguir-se essencialmente dois tipos de superfície, liofóbica quando repele o líquido em contacto com ela, ou liofílica quando o atrai, ou seja, para ângulos de contacto estáticos superiores ou inferiores a 90, respetivamente. No caso de o líquido ser água ou solução aquosa a superfície denomina-se hidrofóbica ou hidrofílica. Uma gota de líquido quando depositada numa superfície, atinge o estado de equilíbrio, como referido anteriormente, quando as tensões interfaciais se equilibram, resultando então o ângulo de contacto, representado na Figura 1.



**Figura 1:** Classificação dos regimes de molhabilidade, consoante os ângulos de contacto.

Embora exista ainda alguma controvérsia sobre a definição dos diversos regimes de molhabilidade, é habitualmente aceite na literatura (Ramos, 2014) que uma superfície é hidrofílica (parcialmente

molhável, indicador de uma superfície com elevada molhabilidade, o fluido tem tendência a espalhar-se facilmente) quando o ângulo de contacto de equilíbrio é inferior a  $90^\circ$  e hidrofóbica (parcialmente não molhável, maior dificuldade do líquido em molhar a superfície, o que implica menos área de contacto entre o fluido e o sólido) quando o ângulo de contacto é superior a  $90^\circ$ . Nos extremos, que não existem numa situação real, encontram-se as superfícies completamente molháveis ( $\theta_Y=0^\circ$ ) ou completamente não molháveis ( $\theta_Y=180^\circ$ ). A maioria dos autores (Koch & Barthlott, 2009) caracteriza uma superfície como superhidrofílica para ângulos de contacto menores que  $10^\circ$  e superhidrofóbica para ângulos de contacto superiores a  $150^\circ$ . A classificação destes ângulos é obtida em situação estática, isto é, sem movimento da linha de contacto entre o sólido, o líquido e o meio envolvente. Para pequenas oscilações da gota, este ângulo pode variar, sendo necessário avaliar grandezas complementares, nomeadamente os ângulos quasi-estáticos de avanço e de recuo. De facto, a medição do ângulo de contacto estático não é suficiente para classificar as superfícies quanto à sua hidrofobicidade, sendo importante considerar a avaliação da histerese (irreversibilidade da gota após o seu espalhamento e retração), que está associada a irregularidades e imogeneidades da superfície (Li & Amirfazil, 2007), tanto químicas como geométricas. As superfícies superhidrofóbicas estão associados a baixos valores de histerese, ou seja, quando a diferença entre o ângulo quasi-estático de avanço e o de recuo para pequenos movimentos da linha de contacto, é geralmente inferior a  $10^\circ$  (Koch & Barthlott, 2009).

É de salientar que o conceito de superhidrofobicidade não tem uma definição concreta, amplamente aceite pela comunidade científica. Assim, após o espalhamento espontâneo ou por ação de força externa, a gota consegue regressar a uma posição mais próxima inicial, quanto mais hidrofóbica for e quanto menor for a sua histerese (Koch & Barthlott, 2009).

Os primeiros modelos utilizados para o estudo da superhidrofobicidade de superfícies surgiram na primeira metade do século XX a partir dos trabalhos de Wenzel (1936), Cassie e Baxter (1944) e Johnson e Dettre (1964). No entanto só na década de 90 com a publicação dos trabalhos de Onda *et al.*, (1996) e de Barthlott e Neinhuis (1997), se revelou interesse por esta área. Mais tarde Burkarter (2010) desenvolve um dos trabalhos mais importantes, onde descreve as características superhidrofóbicas da flor de Lotus. A maioria dos trabalhos desenvolvidos entre os anos de 2006 e 2009, teve uma relevância importante, devido ao facto de se identificar formas de microestruturar artificialmente as superfícies para as tornar superhidrofóbicas. A molhabilidade pode-se modificar alterando as propriedades da superfície (que alteram o balanço das forças interfaciais) e/ou devido a uma atuação externa. Existem vários métodos que têm sido utilizados de forma a variar o ângulo de contacto da gota, tais como atuação térmica (Sammarco & Burns, 2000), dielectroforética (Jones 2002; Jones *et al.*, 2003), através de ondas acústicas de superfície (Guttenberg *et al.*, 2005), magnética e, mais frequente, e estudado nesta dissertação por *electrowetting* (Torkkeli *et al.*, 2001; Pollack *et al.*, 2002).

O *electrowetting* permite alterar o ângulo de contacto de uma gota por atuação de um campo magnético numa superfície (Kang, 2002) em função da diferença de potencial elétrico aplicada (Squires & Quake, 2005). Lippmann (1875) descobriu que a molhabilidade podia ser controlada através de aplicação de campos elétricos, fazendo variar o ângulo de contacto de uma gota de mercúrio em

contacto com um eletrólito. Aristizábal (2012) formulou a teoria básica da eletrocapilaridade. A observação de Lippmann combinada com o conceito de ângulo de contacto introduzido por Thomas Young permite obter a equação que governa o mecanismo de *electrowetting* e que relaciona a variação do ângulo de contacto de uma gota com a aplicação de uma diferença de potencial, a chamada equação de Young-Lippmann:

$$\cos\theta = \cos\theta_Y - \frac{1}{2} \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_1}{d_H \gamma_{LV}} (V - V_{pcz})^2 \quad (2)$$

onde  $\theta$  é o ângulo de contacto após a atuação,  $\varepsilon_0$  e  $\varepsilon_1$  são, as constantes dielétricas do vácuo e da superfície, respetivamente,  $\gamma_{LV}$  a tensão interfacial entre o líquido e o gás e  $d_H$  a espessura da dupla camada espontânea que surge aquando da criação do campo elétrico. Esta camada dupla forma-se espontaneamente na interface sólido-líquido, constituída por cargas positivas no lado do metal e cargas negativas no lado do líquido (Mugele & Baret, 2005).  $V$  é a tensão aplicada e  $V_{pcz}$  a diferença de potencial de carga zero. Porém, só em 1981 é que este fenómeno foi denominado por *electrowetting*, pela observação do comportamento da linha de contacto da gota com a superfície quando aplicada a uma diferença de potencial entre o líquido e o substrato (Beni & Harckwood, 1981).

Depois do trabalho de Lippmann, a descrição e aplicação do *electrowetting* foram alteradas, principalmente, devido à eletrolise (passagem de corrente elétrica pelo eletrólito que conduz a reação química de decomposição da solução aquosa em hidrogénio e oxigénio) que ocorre mesmo com aplicação de tensões na ordem dos milivolts (Virgilio, 2015) e que impossibilita o uso do *electrowetting* em situações de interesse prático.

Este obstáculo foi contornado por Berge em 1993 (citado em Cho *et al.*, 2003), que propôs a utilização de uma camada dielétrica que permite a utilização de tensões elétricas elevadas, na ordem das centenas de volts, denominado por *Electrowetting On Dielectric* (EWOD), que permite simplificar a equação (2) em:

$$\cos\theta = \cos\theta_Y - \frac{1}{2} \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_1}{d \gamma_{LV}} V^2 \quad (3)$$

onde  $d$  é a espessura da camada dielétrica. Segundo a equação (3) o ângulo de contacto tende a diminuir com a atuação eletrostática, assim, pretende-se que a superfície seja o mais liofóbica possível, para que os ângulos de contacto sejam superiores a 90°. Por outro lado, a espessura da camada dielétrica,  $d$ , deve ser a menor possível, pelo que frequentemente se utilizam superfícies dielétricas já com propriedades liofóbicas. Os materiais mais utilizados têm sido os fluoropolímeros tais como Politetrafluoretilene (PTFE) mais conhecido por Teflon, Cytos, parylene, Polidimetilsiloxane (PDMS), Nitrato de silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ), SU8 *resist*, entre outros (Mugele & Baret, 2005; Herbertson *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2010).

A arquitetura dos sistemas microfluídicos para manipulação e análise de amostras biológicas, designados por lab-on-a-chip têm evoluído de encontro com as necessidades, também conhecidos por

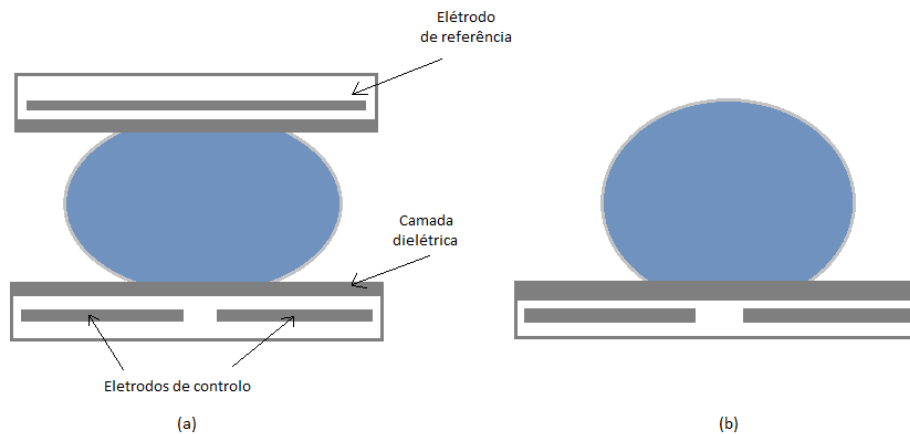


*micro-total analysis systems* ( $\mu$ -TAS). As pesquisas relacionadas com este tema começam com Manz (1990), mais tarde Srinivasn *et al.* (2004) também contribuiu para a implementação de um sistema totalmente integrado automatizado que permite a mistura de amostras, formação de gotas e transporte multifásico. Estas funções foram estudadas posteriormente por Paik *et al.* (2005), Haeberle *et al.* (2007) e Pollack *et al.* (2011). Também Cho *et al.* (2003) e Yi e Kim (2006) deram o seu contributo, onde conseguiram realizar tarefas mais complexas, como dividir, criar, detetar soluções e controlar a sua concentração.

Devido à rápida evolução das técnicas de microfabrico, têm-se desenvolvido rapidamente estes sistemas complexos, no entanto, a sua aplicabilidade tem sido posta em causa, pois existe um forte constrangimento criado pelas geometrias e configurações implementadas e pelo número reduzido de trabalhos que focam o dimensionamento dos sistemas e a sua resposta com biofluidos. Assim, Srinivasan *et al.* (2004) utilizou pela primeira vez o *eletrowetting* para transportar fluidos fisiológicos humanos e relatou que fluidos com maior teor em proteínas (sangue ou *serum*) apresentaram maior dificuldade em movimentar-se, possivelmente por estas soluções contaminarem a superfície, por absorção. As moléculas absorvidas poderão desencadear cada vez mais absorção e comprometer o fenómeno de *electrowetting* de gotas em contacto com as zonas já contaminadas (Yoon & Garrell, 2003). A absorção de biomoléculas em superfícies sólidas altera as propriedades das mesmas, aumentando localmente a sua molhabilidade, o que pode dificultar a variação do ângulo com atuação eletrostática, comprometendo o movimento da gota (Garza, 2011; Ramos, 2014; Laurência, 2015; Moita *et al.*, 2016). No entanto, Yoon e Garrell (2003) demonstraram que a absorção pode ser minimizada se as superfícies foram hidrofóbicas e se for diminuído o tempo que o potencial está aplicado à gota. Cooney *et al.* (2006) são dos poucos autores que estudam o efeito das concentrações do soluto, que posteriormente foi explorado em soluções proteicas em Moita *et al.* (2016).

Existem, assim, duas configurações principais usadas na realização de ensaios de EWO: o sistema fechado (Figura 2a), onde os elétrodos e contra elétrodos estão colocados em faces opostas das gotas e o sistema aberto (Figura 2b), onde os elétrodos e os contras elétrodos estão todos no mesmo chip, por baixo da gota (Pollack *et al.*, 2002). A configuração mais usual é a fechada, apesar de não ser tão funcional, não permite o contacto direto à amostra, embora que a configuração aberta não tenha esse inconveniente é mais difícil de implementar devido à limitação do tamanho e ao posicionamento dos elétrodos, não estando ainda otimizada (Pollack *et al.*, 2011)

Na configuração aberta, tem-se explorado padrões hidrofóbico em substratos hidrofóbicos ou vice-versa com a finalidade de controlar, com elevada precisão, a adesão e histerese dos fluidos aos substratos e facilitar assim a atuação eletrostática (Falconnet *et al.*, 2006; Hong & Pan, 2011; Singh *et al.*, 2013). É esta a configuração que se pretende implementar no sistema microfluídico a desenvolver no projeto onde se insere este trabalho.



**Figura 2:** Representação esquemática de um a) sistema fechado, b) sistema aberto.

Outra questão relevante no uso da configuração aberta é a evaporação da gota durante o transporte, verificada essencialmente em sistemas abertos, alterando a concentração da amostra, que tem sido método de estudo (Davoust & Theisen, 2012; Laurência, 2015; Moita *et al.*, 2016). Porém, nos sistemas fechados este problema tem sido minimizado pelo uso de óleos de silicone que envolvem as gotas, pois permite diminuir a contaminação dos substratos, a dissipação de energia e consequentemente, a histerese (Srinivasan *et al.*, 2004; Brassard *et al.*, 2008), reduzindo também o potencial mínimo necessário a aplicar à gota, de forma a espalhar-se (Park *et al.*, 2010).

Todas as questões discutidas até aqui têm de alguma forma limitado o uso de sistemas microfluídicos, de uma forma sistemática, para aplicações médicas e biomédicas e de facto, apenas estudos mais recentes mostram o desenvolvimento de chips microfluidicos para a efetiva manipulação e diagnóstico em fluidos fisiológicos como o sangue (e.g. Dance, 2017).

Porém, estes dispositivos têm um enorme potencial para explorarem características particulares do escoamento e dos fluidos, tendo em conta a sua escala característica reduzida que permite avaliar a influência no escoamento de características como a deformação das células, que em dispositivos de maiores dimensões passariam despercebidas. Alguns autores têm considerado estudos relacionados com estas propriedades, principalmente associados a constituintes do sangue.

As células sanguíneas são classificadas em três grupos básicos: os leucócitos ou glóbulos brancos, que são células de defesa integrantes do sistema imunitário; as hemácias, ou glóbulos vermelhos, responsáveis pelo transporte de oxigênio e as plaquetas, responsáveis pela coagulação sanguínea. A deformação das hemácias tem uma grande importância no sentido clínico, pois está relacionada a várias doenças, como diabetes (Sabo *et al.*, 1993), malária (Suwanarusk *et al.*, 2004), além de distúrbios cardiovasculares (Yaylali *et al.*, 2013). Nesse sentido, a deformação das hemácias poderá ser um novo indicador de deteção de doenças, logo é necessário existirem métodos de medição rápidos e fáceis de diagnóstico a partir desta característica, que poderão ter um interesse de exploração potencialmente elevado nos dispositivos microfluídicos. Em estudos anteriores sobre deformação de hemácias foram introduzidas algumas metodologias, como aspiração por micropipeta (Kim *et al.*, 2012) e pinças óticas (Musielak, 2009), onde as hemácias são esticadas e a pressão ou força para a sua

extensão é medida (Shiga *et al.*, 1990; Musielak, 2009). Estes estudos revelaram propriedades mecânicas úteis das hemácias, porém requerem amostras grandes e ainda necessitam de um processo inicial de separação de células. Neste sentido, os dispositivos microfluídicos mostram-se potencialmente mais adequados para esse fim.

Um microdispositivo para estudos de deformação de hemácias usa um microcanal que contém uma zona de estreitamento, seguidamente de expansão para alongar as células, alguns autores (Zhao *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Yaginuma *et al.*, 2013; Faustino *et al.*, 2014b) usaram microcanais com uma contração hiperbólica seguida por uma região de expansão repentina e demonstraram que essa configuração é mais precisa para determinar a deformação dos glóbulos vermelhos do que as metodologias no fluxo de cisalhamento, pois a contração parabólica aumentou os efeitos de extensão em detrimento do fluxo de cisalhamento. Também foi demonstrado a alta deformação das hemácias ao escoar pela região de contração hiperbólica (Oliveira *et al.*, 2007; Faustino *et al.*, 2014a; Rodrigues *et al.*, 2016) e a alta sensibilidade a pequenas alterações de forma, como ocorre nas hemácias em contacto com células cancerígenas (Faustino *et al.*, 2014a). No entanto, esses estudos realizados não incluíram o processo de separação celular, foram apenas realizadas as medições de deformação após uma preparação adicional da amostra. Pinho *et al.* (2013) já utilizaram microcanais com constrições para separar as hemácias do plasma e, posteriormente, analisaram o índice de deformação de forma repentina e suave. Rodrigues *et al.* (2015) desenvolveram um método contínuo para análises de separação e deformação celular em microcanais com características hiperbólicas.

Uma dificuldade acrescida na realização destes estudos consiste na obtenção de fluidos reais de trabalho. As propriedades de um fluido próximo do real, nomeadamente contendo partículas deformáveis e com propriedades termofísicas semelhantes, é fundamental, tanto na exploração dos mecanismos de deformação das células como métodos de diagnóstico (Pinho, 2028), como no próprio desenvolvimento dos sistemas microfluídicos para os quais essas propriedades são relevantes, tanto no desenvolvimento de soluções eficazes no transporte das amostras como no desenho de sistemas capazes de permitir o estudo e caracterização adequadas da deformação das células. Neste contexto o desenvolvimento e caracterização de fluidos biomiméticos torna-se quase tão relevante quanto o desenvolvimento dos sistemas microfluídicos.

### 1.3. Objetivos

Esta dissertação surge no âmbito de um projeto mais amplo destinado a desenvolver dispositivos microfluídicos controlados por atuação electrostática, para diagnóstico baseado no estudo das propriedades das células e em particular da sua deformação.

Neste contexto este trabalho pretende avaliar comportamento hidrodinâmico de diversos fluidos biomiméticos (análogos do sangue) caracterizando em pormenor o comportamento de deformação das partículas que os constituem. Pretende-se ainda avaliar a viabilidade de manusear estes fluidos nos

dispositivos microfluídicos que estão a ser desenvolvidos, avaliando a sua resposta dinâmica à atuação eletrostática.

A resposta electroestática é avaliada em termos da variação dos ângulos de contacto e da evolução temporal dos diâmetros de espalhamento das gotas dos fluidos testados, sob atuação electroestática, numa superfície de Teflon, uma vez que, esta superfície é hidrofóbica.

Os fluidos biomiméticos (análogos do sangue) serão avaliados em termos do seu comportamento hidrodinâmico e em particular do tamanho, deformação e movimento das partículas que os constituem, por forma a avaliar a sua capacidade de mimetismo do comportamento das células reais, nomeadamente dos glóbulos vermelhos, cuja deformação está fortemente relacionada, na literatura, com diversas patologias. Esta avaliação é realizada em escoamento contínuo dos fluidos testados, em microcanais com contrações hiperbólicas.

Pretende-se testar fluidos que foram desenvolvidos seguindo diferentes estratégias, nomeadamente soluções aquosas de goma xantana, para mimetizar o comportamento não-Newtoniano do sangue, soluções aquosas contendo partículas esféricas de um polímero (PMMA - poli(metacrilato de metila) ou *poly(methyl methacrylate)* na nomenclatura inglesa) e soluções com um surfactante que, em contacto com a água precipita, formando partículas semirrígidas, para mimetizar as células presentes no sangue.

Como objetivo secundário, em termos do desenho futuro do dispositivo microfluídico a usar, pretende-se avaliar a possibilidade de estabelecer um padrão entre o índice de deformação das partículas e a sua velocidade ao longo do microcanal, que é importante para avaliar as condições de reprodutibilidade da deformação das células.

No final do trabalho, e com base nos resultados obtidos espera-se poder recomendar, de entre os fluidos testados, o mais adequado para este tipo de análise, e posteriormente, aprofundar nesse fluido as características do escoamento e da deformação das partículas.

## 1.4. Estrutura

A presente dissertação divide-se em cinco capítulos, organizados de acordo com a seguinte descrição.

O primeiro capítulo consiste numa introdução ao tema em estudo, que inclui o enquadramento e motivação para a realização deste trabalho e um breve estado de arte, por forma a melhor situar a contribuição do presente trabalho no avanço do conhecimento referente ao *electrowetting* e à deformação de partículas no contexto dos estudos de deformação de células. Após este contexto, o capítulo introdutório apresenta os objetivos e a estrutura desta dissertação.

O segundo capítulo apresenta os conceitos e fundamentos teóricos necessários à compreensão do tema estudado e dos resultados que são apresentados e discutidos no capítulo 4, estando dividido em três áreas distintas; molhabilidade, *electrowetting*, e por fim deformação de partículas.

O terceiro capítulo descreve a metodologia e as instalações experimentais necessárias à realização das experiências efetuadas neste trabalho, bem como os procedimentos seguidos e as condições de trabalho impostas.

No capítulo 4, apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos, em concordância com os objetivos iniciais propostos.

Por último, o capítulo 5 sumariza as principais conclusões e apresenta algumas sugestões para trabalhos futuros.

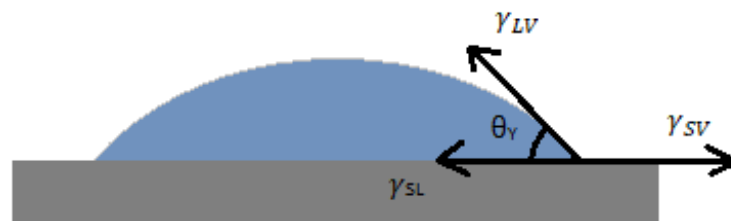
## 2. Fundamentos teóricos

Neste capítulo são apresentados os conceitos teóricos relevantes e necessário à compreensão do tema desenvolvido, em particular conceitos que ajudam a compreensão da discussão dos resultados, tais como Molhabilidade, *Electrowetting* e Deformação de partículas.

### 2.1. Molhabilidade

A molhabilidade é uma propriedade fundamental, quando se pretende estudar um fluido do ponto de vista microscópico, e está associada à facilidade com que um líquido se espalha sobre o sólido numa situação de equilíbrio. A molhabilidade pode ser facilmente compreendida recorrendo ao conceito de energia de superfície. Existem diversas formas de quantificar a molhabilidade, sendo a medição do ângulo de contacto uma das mais usuais (Michalski & Saramago, 2000).

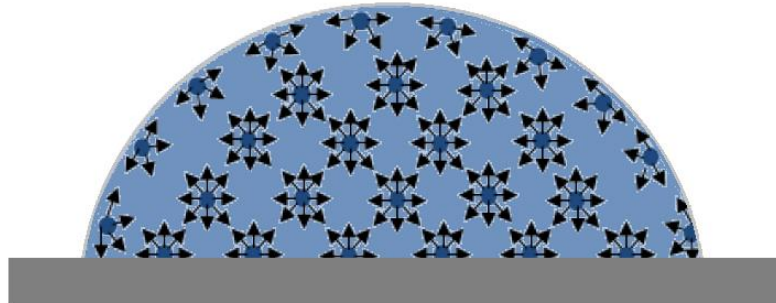
Assim, o ângulo de contacto estático ou de equilíbrio,  $\theta_Y$ , definido como o ângulo criado entre um plano tangente a uma gota de líquido e um plano que contém a superfície onde o líquido está depositado (Delcheva *et al.*, 2014). A molhabilidade depende do equilíbrio das tensões que atuam entre as interfaces líquido, sólido e vapor, como se pode observar na Figura 3. A linha de contacto entre as três interfaces denomina-se por linha de contacto ou trifásica (Yuan & Lee, 2013).



**Figura 3:** Balanço das tensões interfaciais entre o sólido, o líquido e o ar envolvente. Definição do ângulo de contacto de equilíbrio.

A forma de uma gota é, geralmente, determinada pela sua tensão superficial. Num líquido puro cada molécula é “puxada” igualmente em todas as direções por moléculas de líquido vizinhas, pelo que o somatório de forças para a gota em repouso é nulo. No entanto, nem todas as moléculas têm como vizinhas moléculas de líquido em todos os lados, sendo que as moléculas que se encontram na fronteira entre o líquido e o gás não apresentam equilíbrio de forças (apresentam forças direccionadas apenas para o centro do líquido) e são, assim, “puxadas” pelas moléculas vizinhas no interior do líquido, criando uma pressão interna (Figura 4). Como resultado o líquido contrai espontaneamente de forma a diminuir a área superficial e consequentemente a manter a menor energia na superfície livre possível. Esta força intermolecular que atua na interface líquido vapor obrigando-a a contrair é denominada tensão superficial e é responsável pela forma esférica das gotas. Na prática, forças externas tais como a gravidade podem deformar a gota e, nesse caso, o ângulo de contacto é determinado pela combinação

da tensão superficial e das forças externas (Yuan & Lee, 2013). Esta deformação ocorre em gotas de tamanho maior, com raios superiores ao comprimento capilar definido por  $(\gamma_{LV}/g\rho)^{1/2}$ , onde  $\rho$  é a massa específica do líquido,  $g$  a constante de aceleração gravitacional e  $\gamma_{LV}$  a tensão interfacial líquido-vapor ou tensão superficial (Batchelor, 1967).



**Figura 4:** Forças de interação de moléculas numa gota. Baseado em Yuan e Lee (2013).

Geralmente, o ângulo de contacto entre uma gota de um dado líquido com uma tensão superficial conhecida e uma superfície sólida vai depender da relação existente entre as forças adesivas, por exemplo, as forças que contribuem para o espalhamento do líquido sobre a superfície e as forças coesivas do líquido, que fazem com que a gota mantenha a sua forma esférica, com uma superfície de contacto mínima. A equação 1 define o ângulo de contato de equilíbrio de uma gota de líquido numa superfície sólida,  $\theta_Y$ , como o equilíbrio mecânico da gota sob atuação das três tensões interfaciais segundo Thomas Young (1805).

A equação de Young é apenas válida para situações ideais, ou seja, para superfícies perfeitamente lisas, quimicamente homogêneas, planas e indeformáveis. No entanto, as superfícies são rugosas (não existindo superfícies perfeitamente lisas), pelo que o ângulo de contacto medido é um ângulo aparente. Assim, surgem dois cenários possíveis para a avaliação do ângulo de contacto, onde se apresentam e se explicam, em alternativa à equação de Young, as equações de Wenzel (1936) ou de Cassie e Baxter (1944), que relacionam o ângulo de Young,  $\theta_Y$ , com o ângulo aparente que é medido na superfície,  $\theta_r$ .

Wenzel (1936) considera um regime de molhabilidade homogêneo, no qual o líquido preenche completamente as irregularidades da superfície (Figura 5a) e a adição de rugosidade a uma superfície faz aumentar bastante o seu carácter hidrofóbico como o hidrofílico (Burkarter, 2010). Na perceção de Wenzel e de acordo com Johnson e Dettre (1964) uma superfície rugosa é considerada uma superfície lisa, cujas tensões interfaciais são  $r_f\gamma_{LV}$ ,  $r_f\gamma_{SL}$  e  $r_f\gamma_{SV}$ , sendo  $r_f$  o fator de rugosidade na superfície molhada (McHale, 2007). Substituindo estas tensões interfaciais na equação de Young, obtém-se a equação de Wenzel que relaciona o ângulo de contacto aparente e o ângulo de contacto de Young com a superfície:

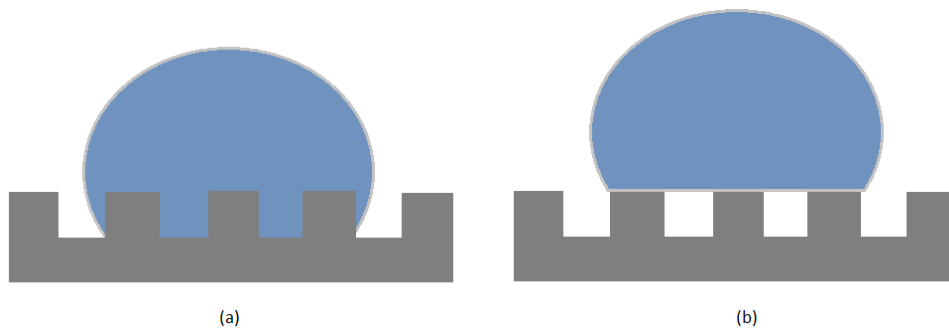
$$\cos\theta_r = r_f \cos\theta_Y \quad (4)$$

O fator de rugosidade é definido como a razão entre a área efetivamente molhada e a área projetada. Numa superfície rugosa, como a área molhada é maior que a área projetada, o fator de rugosidade é maior que 1. No caso de uma superfície lisa, este fator é igual a 1, o que implica  $\theta_r = \theta_Y$ .

Contrariamente, Cassie e Baxter (1944) defendem um regime de molhabilidade heterogêneo, no qual o líquido não penetra completamente entre as irregularidades das superfícies. Deste modo, bolsas de ar ficam aprisionadas entre o líquido e a superfície, o que contribui para reduzir a área de contacto entre o líquido e o sólido (Figura 5b). Neste cenário, o ângulo de contacto aparente e o ângulo de Young com a superfície relacionam-se da seguinte forma:

$$\cos\theta_r = r_f\theta_Y - f_r(r_f\cos\theta_Y + 1) \quad (5)$$

onde  $f_r$  representa a fração da área projetada na superfície sólida molhada pelo líquido.



**Figura 5:** Molhabilidade (a) homogênea (regime de Wenzel) e (b) heterogênea (regime de Cassie e Baxter).

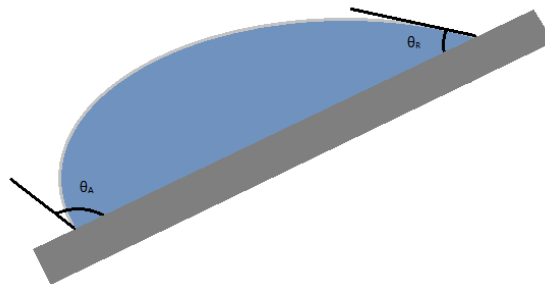
Ambas as equações supracitadas permitem estimar o ângulo de contacto aparente, medido sobre uma superfície rugosa, de uma forma mais fidedigna que a equação de Young. Porém, as simulações numéricas realizadas, juntamente com uma análise cuidada destas equações, indicam que elas são válidas se a escala da dimensão da gota for cerca de três ordens de grandeza acima da escala de rugosidade típica da superfície ou de potenciais zonas de heterogeneidade química (Marmur, 2011). Wolansky e Marmur (1999) afirmam que o ângulo de contacto aparente de uma gota no estado mais estável é uma boa aproximação pela equação de Wenzel (Equação 4), apenas se a superfície tiver uma rugosidade conhecida e for quimicamente homogênea. Por outro lado, a equação de Cassie e Bexter (Equação 5) demonstrou por meios de simulações tridimensionais que é uma aproximação muito boa para ângulos de contacto sobre uma superfície sólida quimicamente heterogênea, contudo lisa (Marmur, 2011). Assim, existem algumas limitações na utilização destas equações que deverão ser consideradas no cálculo do ângulo de contacto aparente (Varanasi *et al.*, 2010; Smyth *et al.*, 2015).

Embora estas últimas equações forneçam previsões fiáveis do ângulo de contacto aparente, é necessário utilizá-las com precaução, uma vez que, ainda não existe consensualmente uma condição definida que estabeleça a transição entre molhabilidade homogênea e heterogênea (Sedev, 2011). A transição entre estes dois regimes pode ocorrer devido a alterações de equilíbrio das tensões interfaciais e das forças de adesão e coesão sucedendo a uma escala micrométrica ou nanométrica que não são devidamente captadas pelo ângulo de contacto aparente. Considerando esta dependência



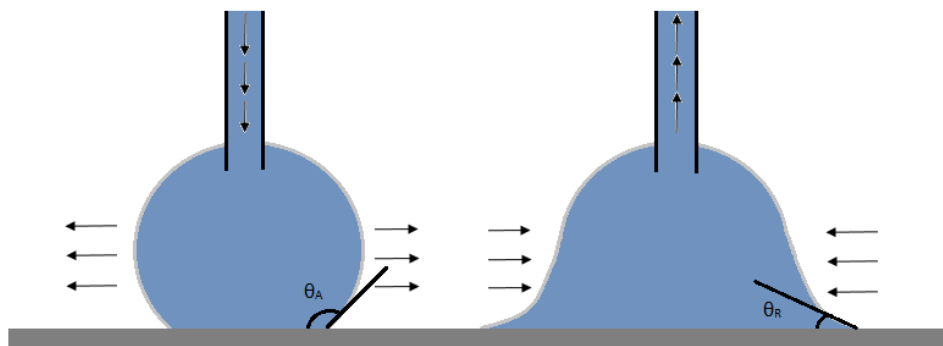
do critério de transição entre regimes de molhabilidade com a escala espacial Santini e Guilizzoni (2014) referem que numa escala nanométrica é difícil assegurar uma molhabilidade perfeitamente homogênea ao longo de toda a linha de contacto. Contudo, no presente trabalho utilizam-se escalas micrométricas, sendo válido considerar estas equações para estimar os ângulos de contacto em superfícies rugosas.

Para além dos ângulos de contacto de equilíbrio que se tem considerado, também se podem identificar ângulos quasi-estáticos, de avanço e de recuo. Na realidade existem muitos estados metaestáticos de uma gota num sólido e em regra geral os ângulos observados não são iguais a  $\theta_Y$ . Certos autores como Yuan e Lee (2013) afirmam que a medição de um único ângulo de contacto estático não é adequada para caracterizar o fenómeno da molhabilidade, pois este não se trata apenas de um estado estático. Assim, o ângulo quasi-estático de avanço,  $\theta_A$ , é o valor máximo do ângulo de contacto estável, medido imediatamente antes da linha de contacto avançar, quando a gota se começa a espalhar. Por outro lado, quando a linha de contacto se move no sentido contrário, o ângulo quasi-estático de recuo,  $\theta_R$ , é o menor ângulo estável obtido antes do movimento de retração. Existem dois métodos de medição destes ângulos de contacto, nomeadamente o método da placa inclinada, imediatamente antes da gota se mover, como se pode observar na figura 6 e o método de aumento/redução do volume da gota de forma controlado.



**Figura 6:** Determinação do ângulo de avanço e recuo pelo método da placa inclinada.

Este segundo método, o qual será utilizado neste trabalho para a determinação destes ângulos, consiste em colocar a gota na superfície sólida e adicionar líquido à gota de modo que a linha de contacto avance (ângulo de avanço) ou alternativamente, remover líquido da gota até que a linha de contacto retraia (ângulo de recuo), como se pode observar na figura 7 (Extrand, 1998).



**Figura 7:** Determinação do ângulo de contacto de avanço e recuo pelo método de variação controlada do volume da gota, usado neste trabalho.

A diferença entre os dois ângulos quasi-estáticos é definida com a histerese (Equação 6) (Extrand, 1998). O significado da histerese tem sido tópico de estudo e a conclusão geral é que esta surge das heterogeneidades químicas e/ou geométricas da superfície, tal como a rugosidade (Yuan & Lee, 2013). Em superfícies sólidas ideais, não existe histerese e o ângulo de contacto é o ângulo definido por Young. No entanto, na realidade não existem sistemas termodinâmicos perfeitamente reversíveis, sendo a histerese o resultado dessa irreversibilidade.

$$\Delta\theta = \theta_A - \theta_R \quad (6)$$

Deste modo, a gota nunca voltará à forma inicial, se esta se espalhar a partir de uma determinada situação de equilíbrio, mesmo que o líquido retraia pela ação coesiva da tensão interfacial líquido-vapor.

Conclui-se assim que se torna difícil encontrar superfícies sem heterogeneidades (químicas e/ou geométricas). Estas heterogeneidades vão afetar no ângulo de contacto, de uma forma que é difícil de caracterizar, sendo apenas quantificável pela histerese. Ou seja, recomenda-se que as superfícies sejam preparadas com o mínimo de heterogeneidade e que sejam inertes em relação aos líquidos em estudo (Delcheva *et al.*, 2014). Dado que para definir o regime de molhabilidade não basta apenas caracterizar o ângulo de contacto de equilíbrio, é também obvio que para uma melhor caracterização seja necessário determinar os ângulos quasi-estáticos de avanço e de recuo. De facto, a transição entre regimes de molhabilidade homogénea ou heterogénea depende de um valor crítico de energia mínima que pode ser atingido em situações quasi-estáticas ou dinâmicas. Assim, uma superfície pode ser considerada como superhidrofóbica, com um ângulo de contacto superior a 150°, mas devido a um deslocamento da linha de contacto pode ser o suficiente para que o líquido penetre entre as regularidades rugosas da superfície e altere o regime de molhabilidade de um modo irreversível, se a histerese for elevada. Deste modo, Bhushan (2012) e outros autores consideram que as superfícies só são superhidrofóbicas se, para além de um ângulo de contacto superior a 150° o valor da histerese for inferior a 10°.

Eral *et al.* (2013) relacionam a energia dissipada na linha de contacto com a histerese, definindo a força de resistência da superfície ao avanço da gota devida à histerese, como:

$$f_{res} = 2R \cdot \gamma_{LV} \cdot (\cos\theta_R - \cos\theta_A) \quad (7)$$

sendo R o raio da gota depositada. Assim, valores elevados da histerese estão associados com irreversibilidade do espalhamento devida à dissipação de energia de superfície na linha de contacto, limitando o movimento da gota tanto no avanço como no recuo.

O equilíbrio da gota e a histerese dependem das forças adesivas e coesivas. O trabalho de adesão,  $W_{ad}$ , é definido como o trabalho realizado para contrariar a tendência da gota para espalhar (Xiu *et al.*, 2008). A equação de Dupré define esta grandeza (Bisanda, 2000):

$$W_{ad} = \gamma_{LV} + \gamma_{SL} - \gamma_{SL} \quad (8)$$

Combinando a equação de Young (Equação 1) com a equação anterior (Equação 8), obtém-se a equação Young-Dupré:

$$W_{ad} = \gamma_{LV} \cdot (\cos\theta_Y + 1) \quad (9)$$

Também se pode relacionar a histerese com o trabalho de adesão, do ponto de vista termodinâmico (Extrand, 1998):

$$W_{ad} = \gamma_{LV} \cdot (\cos\theta_R - \cos\theta_A) \quad (10)$$

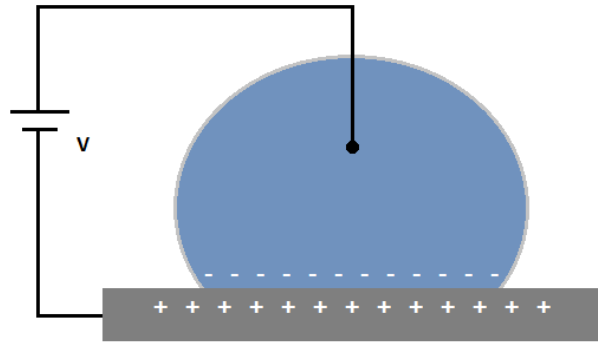
Por outro lado, o trabalho de coesão pode ser entendido como o trabalho necessário para romper a coesão da gota. Para um ângulo de contacto crescente, a tensão superficial da gota também é crescente, pelo que a molhabilidade e o trabalho de adesão são decrescentes. Uma superfície com baixa histerese terá menos adesão e menor será o termo da energia na linha de contacto (Bhushan & Her, 2010).

Quando uma gota é colocada em contacto com uma superfície, esta espalha-se até atingir o seu estado de equilíbrio. Se eventualmente existir uma força externa aplicada à gota, esta tende a avançar radialmente até que a força externa seja equilibrada pela ação das tensões interfaciais. Se o espalhamento gerar gradientes de velocidade consideráveis é necessário ter em conta o efeito da dissipação viscosa junto à superfície. À medida que a gota se espalha, o ângulo de contacto vai diminuindo, ou seja, o ângulo de contacto mínimo ocorre quando o diâmetro é máximo e o ângulo de contacto é máximo quando o diâmetro é mínimo. Após a atuação da força externa, este estado da gota, não é o estado de energia mínima, pelo que esta tende a retrair de modo a ficar com um ângulo de contacto próximo do inicial, sendo que a posição final depende da histerese e da dissipação viscosa. Neste caso, em que a velocidade da linha de contacto não é desprezável, surge a necessidade de medir ângulos de contactos dinâmicos.

## 2.2. *Electrowetting*

O fenómeno de *electrowetting* pode ser definido como uma alteração da molhabilidade, ou seja, do ângulo de contacto através da variação da tensão superficial da gota por aplicação de um campo elétrico.

Após a aplicação de uma diferença de potencial  $dV$ , forma-se na interface sólido líquido uma dupla camada elétrica espontânea que funciona como um condensador, ou seja, na superfície do sólido forma-se uma nuvem de iões positivos e na faixa de líquido mais próxima da superfície uma camada de iões negativos (Figura 8) (Bormashenko & Gendelman, 2014). As cargas assim distribuídas sobre as superfícies conduzem a uma redução da tensão interfacial efetiva.



**Figura 8:** Dupla camada elétrica espontânea.

Lippmann (1875) estabeleceu a relação entre a tensão aplicada em corrente contínua (DC),  $V$ , e a tensão interfacial,  $\gamma_{SL}$ , como:

$$d\gamma_{SL} = -\sigma_{SL} dV \quad (11)$$

onde  $\sigma_{SL}$  é a densidade de carga interfacial sólido-líquido (Quilliet & Berge, 2001). O potencial elétrico aplicado provoca o mesmo que uma força externa aplicada, como já foi explicado anteriormente, ou seja, resulta no espalhamento da gota e no decréscimo do ângulo de contacto por redução da tensão superficial gota-superfície. Quando a atuação é interrompida a gota retrai recuperando a sua esfericidade, desde que a superfície de contacto seja hidrofóbica ou superhidrofóbica e não haja dissipação significativa de energia de contacto entre a gota e a superfície.

Segundo o modelo de Helmholtz (1853) (citado em Spohr, 1999) todos os contra iões se localizam espontaneamente numa fina camada a uma distância,  $d_H$ , fixa do sólido, na ordem dos nanómetros. Neste caso, a camada referida como camada dupla é essencialmente um dielétrico molecular que armazena carga eletrostática, comportando-se como um condensador. Esta camada tem uma capacitância por unidade de área,  $C_H$ , também constante e é definida por (Mugele & Baret, 2005) pela expressão:

$$C_H = \frac{\epsilon_0 \epsilon_1}{d_H} \quad (12)$$

Ao integrar a Equação 11, é possível analisar a dependência que  $\gamma_{SL}$  tem com a tensão elétrica aplicada:

$$\gamma_{SL}(V) = \gamma_{SL} - \int_{V_{pcz}}^V \sigma_{SL} dV = \gamma_{SL} - \int_{V_{pcz}}^V C \cdot V dV = \gamma_{SL} - \frac{1}{2} C (V - V_{pcz})^2 \quad (13)$$

onde  $V_{pcz}$  é a diferença de potencial de carga zero, necessária para compensar as cargas espontâneas que se geram em determinados materiais quando em contacto com eletrólitos (Mugele &

Baret, 2005). O termo  $\gamma_{SL}$  está relacionado com a componente química da tensão interfacial sólido-líquido, sendo independente da tensão (potencial aplicado nulo). O termo quadrático corresponde à sua componente da atuação eletrostática, dependendo da tensão aplicada (Sondag-Huethorst & Fokkink, 1994).

Apesar da equação de Young-Lippmann ser aceite e fornecer uma boa descrição do fenómeno de *electrowetting*, é apenas válida para tensões elétricas na ordem dos 100V ou inferior (Dubois *et al.*, 2006), dependendo do par líquido-superfície (Pollack *et al.*, 2002; Raccurt *et al.*, 2007).

Mesmo continuando a aplicar uma tensão o ângulo de contacto só decresce até um determinado valor (Quinn *et al.*, 2003). Este fenómeno é denominado efeito de saturação e não é tido em consideração na equação Young-Lippmann que considera que o ângulo de contacto diminui sempre com o aumento da tensão aplicada. A equação de Young para  $\gamma_{SL} = 0$  estabelece um limite para o ângulo de contacto mais baixo que é possível obter com *electrowetting*, que é o ângulo de contacto de saturação,  $\theta_s$ :

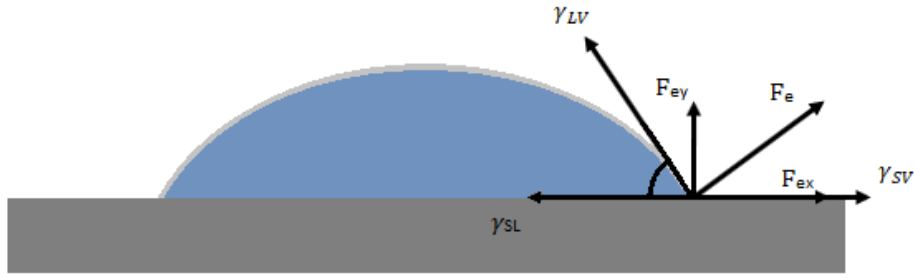
$$\cos \theta_s = \frac{\gamma_{SV}}{\gamma_{LV}} \quad (14)$$

Têm surgido outras teorias, tais como o carregamento do dielétrico com cargas de igual sinal às criadas no interior da gota. Chevalliot *et al.* (2012) demonstraram experimentalmente que usando corrente contínua (DC), o ângulo de contacto de saturação não variava com o campo elétrico, perfil da linha de contacto, tensão interfacial nem com o fluido ou meio envolvente. Alguns autores como Chen e Bonaccorso (2014) referem que o uso de corrente alternada evita a saturação, mas esta afirmação não está totalmente comprovada.

Pela a análise da equação de Young-Lippman (Equação 2) a espessura da dupla camada tem de ser reduzida para permitir que seja possível modificar o ângulo de contacto da gota. No entanto, ao aumentar a diferença de potencial elétrica, é possível que a corrente passe a dupla camada e ocorra a chamada eletrólise da gota, que impossibilita a aplicação do *electrowetting*.

Berge (1993) (citado em Cho *et al.*, 2003) propôs uma nova configuração, onde introduziu uma camada dielétrica isoladora entre a gota e o eletrodo com espessura reduzida (na ordem dos micrómetros) que veio permitir a utilização de tensões elevadas (centenas de volts).

É possível compreender o movimento da gota provocado pela atuação eletrostática. Kang (2002) analisou o campo elétrico gerado à volta da gota, assumindo o líquido como um condutor perfeito e propôs o seguinte balanço de forças aplicadas na linha trifásica da gota (Figura 9).



**Figura 9:** Balanço de forças na linha de contacto da gota sob aplicação de força eletrostática.

A força eletrostática,  $F_e$ , induz uma alteração no ângulo de contacto da gota e é obtida partindo do potencial eletrostático (Equação 15) (Kang, 2002):

$$F_e = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_1 V^2}{2d} \operatorname{cosec} \theta_Y \quad (15)$$

Pode-se decompor esta força, nas direções horizontal,  $F_{ex}$ , e vertical,  $F_{ey}$ , respetivamente:

$$F_{ex} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_1 V^2}{2d} \quad (16)$$

$$F_{ey} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_1 V^2}{2d} \cot \theta_Y \quad (17)$$

O balanço macroscópico das forças na componente horizontal para um pequeno volume de líquido na linha de contacto resulta na seguinte equação:

$$\gamma_{LV} \cdot \cos \theta_Y = \gamma_{SV} - \gamma_{LS} + \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_1 V^2}{2d} \quad (18)$$

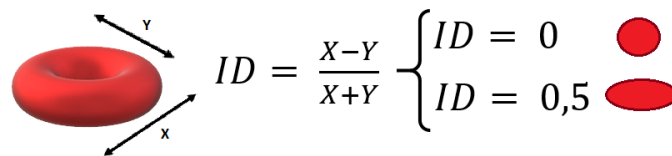
É de notar que a componente horizontal não depende do ângulo de contacto, puxando a linha de contacto trifásica da gota até que esta atinge o equilíbrio com as tensões da superfície, ou seja, é responsável pela variação do ângulo de contacto, como confirma a equação 18. Por outro lado, a componente vertical da força eletrostática, aumenta a sua cotangente com a diminuição do ângulo de contacto, ou seja, quando o ângulo de contacto é menor é necessário exercer uma força maior, o que leva a pensar que pode estar relacionado com a saturação do ângulo de contacto (Kang, 2002).

### 2.3. Deformação de partículas

Uma das características em estudo está relacionada com as propriedades mecânicas das células, e em particular com a sua deformação, que alteram as propriedades viscosas do escoamento. De facto, literatura mais recente sugere que diferentes índices de deformação das células (determinados pelas razões entre eixos máximos e mínimos de deformação) se podem relacionar com diversas patologias. Assim, células cancerígenas, apresentam índices de deformação distintos, à medida da progressão da patologia, (Cross, 2005). Esta variação da rigidez está também associada a uma variação da viscosidade do fluido que escoar no dispositivo. Sendo o Índice de Deformação,  $ID$ , caracterizado da seguinte forma:

$$ID = \frac{X - Y}{X + Y} \quad (19)$$

onde  $X$  e  $Y$  são, respetivamente, os comprimentos maior e menor da partícula num referencial com coordenadas  $x$  e  $y$ , respetivamente.



**Figura 10:** Imagem ilustrativa da deformação de uma partícula.

Caraterizar a deformação de células cancerígenas pode fornecer informações úteis sobre o processo de metástase, particularmente para grandes regimes de deformação. Além disso, alguns autores elaboraram correlações preliminares entre a taxa de deformação das células e o estágio da malignidade (Tse *et al.*, 2013). Na microescala, também é esperado que a dinâmica das gotículas possa ser sensível às variações reológicas causadas por diferentes graus de rigidez ou deformação celular, de modo que a dinâmica das gotículas possa eventualmente ser correlacionada com a rigidez celular para o diagnóstico precoce do cancro nos dispositivos microfluídicos que se pretendem desenvolver (Vieira *et al.*, 2017). e para os quais o presente trabalho contribui.

A deformação das células está também associada a diversas doenças detetadas por análise do sangue, tais como a diabetes (Pinho, 2018; Moita *et al.*, 2019). Neste contexto, a análise do fluxo sanguíneo apresenta vários fenômenos interessantes na microcirculação que podem ser usados para desenvolver dispositivos microfluídicos capazes de promover a separação e analisar células sanguíneas em fluxo contínuo. Nos últimos tempos, houve numerosos estudos microfluídicos para avaliar a deformação dos glóbulos vermelhos, no entanto, não existem muitos estudos relativamente aos glóbulos.

O sangue é um tecido rico em informações para diagnóstico. No entanto, devido à complexidade da sua constituição, é necessário conseguir isolar um número limitado de células, para que se consiga

realizar uma análise precisa e porventura que se possa aplicar a uma variedade de aplicações biomédicas, como diagnóstico, terapêutica e biologia celular (Gossett *et al.*, 2010). A maioria das técnicas padrão usadas para separação e classificação de células geralmente exige muito trabalho ou exige uma identificação externa adicional para distinguir as células (Jinlong *et al.*, 2008; Campo-Deaño *et al.*, 2013). Por esses motivos, as técnicas microfluídicas sem distinção dos componentes do sangue têm despertado interesse, pois evitam o uso de rótulos bioquímicos que podem alterar as propriedades das células e aumentar os custos (Gossett *et al.*, 2010). Portanto, biomarcadores intrínsecos, como tamanho de célula, polarização elétrica, densidade, deformação e propriedades hidrodinâmicas têm sido explorados (Shevkoplyas *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; Campo-Deaño *et al.*, 2013). Em relação à separação de células com base em seu tamanho, microestruturas (como matrizes de micropilares e membranas com orifícios) foram usadas como uma etapa integrativa simples, não destrutiva e fácil de ser implementada, de modo a arquivar um dispositivo único e completo (Yang *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2008; Bradley *et al.*, 2012). No entanto, vários dispositivos microfluídicos de separação são baseados em filtração sem saída, o que pode levar a entupimento ou obstrução (Chen *et al.*, 2007; Georgieva *et al.*, 2010; Agbangla *et al.*, 2012). Para superar esse problema, a filtragem de fluxo cruzado tem sido explorada de modo a minimizar este obstáculo (Tae Goo *et al.*, 2014), operando com o fluido escoando perpendicularmente aos arranjos de micropilares ou de microfiltros, excluindo células. Assim, as células rejeitadas continuam a fluir na direção do fluxo primário, enquanto as células selecionadas fluem para outra saída (Chen *et al.*, 2008; Gossett *et al.*, 2010). Ji *et al.* (2008) concluíram que a abordagem de filtragem de fluxo cruzado é a forma mais eficiente de classificar os glóbulos brancos e os glóbulos vermelhos. Além disso, esse microfiltro foi o mais adequado para lidar com o fluxo sanguíneo, evitando problemas associados à agregação de células e ao entupimento do filtro. No entanto, que se saiba, nenhum estudo relatou até agora um dispositivo microfluídico integrador, capaz de separar uma pequena quantidade de células sanguíneas (leucócitos e glóbulos vermelhos) do fluido inicial e, ao mesmo tempo, que seja capaz de estudar alterações na sua deformação, através da avaliação do índice de deformação (*ID*).

A microcirculação é uma extensa rede de sistemas de microvasos de tubos ramificados, abrangendo uma ampla gama de escalas geométricas e velocidades de fluxo. Conseqüentemente, a mecânica do fluxo sanguíneo na circulação abrange uma ampla gama de fenômenos hidrodinâmicos. Por exemplo, o número de Reynolds,  $Re$ , (definido por  $Re = UL/v$ ) é muito menor que 1 e as equações de fluxo de Stokes podem ser aplicadas (Secomb, 2017). O facto de o sangue se comportar essencialmente como um fluido newtoniano homogêneo em grandes vasos sanguíneos é uma característica que simplifica o seu estudo. Portanto, o fluxo de fluido é descrito como uma boa aproximação pelas equações de Stokes para um fluido incompressível (Secomb, 2017). No entanto, o sangue que flui em microvasos menores não pode ser considerado um fluido homogêneo porque contém uma alta concentração de células em suspensão. No estudo da mecânica dos fluidos da microcirculação é importante ter em conta o movimento de uma suspensão concentrada de partículas altamente deformáveis em uma rede ramificada geometricamente complexa de tubos muito pequenos (Secomb, 2017).



Na mecânica de fluidos, considera-se a abordagem de um fluido, geralmente, como um meio contínuo. O mesmo ocorre em sistemas microfluídicos (preferencialmente com líquidos) exceto se o número de Knudsen definido como a razão entre o comprimento do caminho livre médio molecular e uma escala de comprimento fisicamente representativa for próximo ou superior a 1. Muitas vezes a inércia de um sistema microfluídico é desprezável e o comportamento do escoamento é dominado por forças viscosas, e até por efeitos da superfície. Em escalas de micrómetros de comprimento, foram estabelecidas as leis básicas contínuas que dominam o escoamento, expressas pelas equações de conservação massa, momento e energia. As equações que definem a mecânica dos fluidos newtonianos são as equações de Navier-Stokes. Elas são derivadas das suposições básicas de conservação de massa, do momento e das equações de energia. Neste trabalho, é considerado o gradiente de temperatura nulo, portanto, a conservação da equação da massa afirma que, em todos os momentos, a massa que entra no volume de controle é igual à massa que sai desse volume. Para esses fluidos, a equação de continuidade reduz-se a:

$$\nabla \cdot \vec{v} = 0 \quad (20)$$

onde  $\vec{v}$  é o vetor de velocidade (White, 1998). Esta equação também é designada por equação de continuidade, porque se baseia na suposição de que o meio fluido é contínuo (White, 1998). Assume-se esta forma da equação dado que o sangue se pode considerar um fluido incompressível.

A segunda lei do movimento de Newton aplicada a uma quantidade elementar de fluido leva à seguinte equação do momento, que afirma que a mudança no momento dentro do volume de controle é igual à soma das forças que atuam no volume de controle:

$$\rho \frac{\partial(\rho \vec{v})}{\partial t} + \rho(\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} = -\nabla p + \nabla \cdot \tau + \overline{\rho \vec{g}} + \vec{F} \quad (21)$$

onde  $\rho$  é a densidade do fluido,  $t$  é o tempo,  $p$  é a pressão,  $\tau$  é a tensão de corte do fluido,  $g$  é a aceleração gravitacional e  $F$  é uma força que atua sobre o fluido, tais como, forças elétricas ou magnéticas (White, 1998; Nguyen e Wereley, 2002; Baskurt *et al.*, 2007; Bruus, 2007).

A tensão de corte ( $\tau$ ) é descrita pela soma do solvente newtoniano,  $\eta_s$ , e do soluto polimérico,  $\eta_p$ , para fluidos não newtonianos. Considerando a lei de viscosidade de Newton, é obtida a seguinte equação de Navier-Stokes, válida para os fluidos newtonianos:

$$\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \rho(\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} = -\nabla p + \eta_s \nabla^2 \vec{v} + \overline{\rho \vec{g}} + \vec{F} \quad (22)$$

uma vez que a contribuição polimérica para a tensão de corte é nula ( $\tau_p = 0$ ) e  $\eta_s$  é a viscosidade constante do fluido solvente newtoniano. Apesar do sangue ser um fluido não-Newtoniano, nesta fase do trabalho usar-se-ão apenas fluidos essencialmente Newtonianos.

Stokes introduziu o conceito da razão entre forças inerciais e viscosas, ou seja, a importância da razão entre o momento devido à aceleração do fluido e devido às forças de atrito exercidas pelas deformações do fluido e a partir de uma análise detalhada da equação de conservação do momento. Assim, a razão entre forças inerciais ( $\rho U^2 L$ ) e viscosas ( $\eta U/D^2$ ) pode ser representada pelo número de Reynolds adimensional ( $Re$ ) (Davis, 2008; Afonso, 2010; Sousa, 2010)

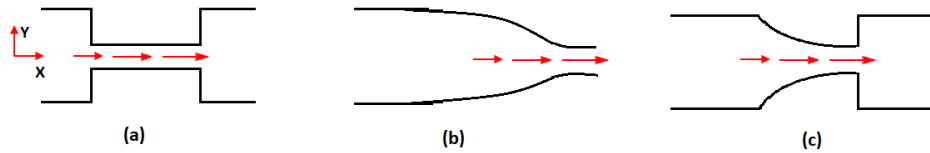
$$\frac{F_{inercia}}{F_{viscosa}} = \frac{\rho U L}{\eta} = Re \quad (23)$$

onde  $U$  é a velocidade do fluido e  $L$  é o comprimento característico da geometria do fluxo. O número de Reynolds é usado para prever quando a equação de Navier-Stokes pode ser simplificada. Sistemas com grandes dimensões espaciais, altas densidades, grandes velocidades ou pequenas viscosidades são caracterizados por grandes números de Reynolds. Se o valor de  $Re$  for muito pequeno ( $Re \ll 1$ ), os efeitos inerciais podem ser ignorados e o fluxo de fluido viscoso é dominante; portanto, as forças inerciais podem ser ignoradas e removidas, a equação de Navier-Stokes simplifica-se então da seguinte forma:

$$\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} \nabla p = \eta \nabla^2 \vec{v} \quad (24)$$

Existem várias formas de estudar a deformação das células. No dispositivo microfluídico a desenvolver essa deformação será realizada por ação eletrostática. Porém, para estabelecer as forças a aplicar e o método de aplicação a atuação externa a executar, é primeiramente necessário compreender melhor a forma como as células se deformam e se é possível estabelecer uma forma de deformação reprodutível e eficaz que possa vir a ser útil para estabelecer uma correlação entre a deformação das células e as patologias que se pretende que o dispositivo detete. Neste contexto, nesta fase inicial do desenvolvimento do dispositivo irá combinar-se o transporte da amostra em forma de gotas, com o estudo isolado da deformação das células em escoamento contínuo em microcanais. Uma das técnicas mais usadas por forma a garantir a reprodutibilidade de resultados usando um método simples e pouco dispendioso é forçar o escoamento por uma contração, forçando à ocorrência de uma aceleração do mesmo. As células seguem o escoamento, mas não acompanham exatamente o perfil de velocidades, sofrendo deformações que são quantificáveis ao longo do canal, tipicamente recorrendo a métodos de análise e de processamento de imagem.

Existem três tipos principais de configurações de contração usadas em microcanais (Figura 11). Esses fluxos envolvem uma redução na área da seção transversal, que gera fortes fluxos convergentes à medida que o fluido passa pela contração (formando vórtices) que dependem das características reológicas do fluido e da configuração geométrica da contração. Para o caso da contração hiperbólica, o fluxo gerado exibe uma cinemática mista com forte fluxo de extensão ao longo da linha central, à medida que o fluido acelera ao progredir na contração.



**Figura 11:** Escoamento de um fluido em contrações com diferentes formas: (a) contração repentina, (b) contração suave e (c) contração hiperbólica.

Os perfis de velocidade do fluxo sanguíneo nos microvasos também são importantes para fins científicos e clínicos, pois podem ser indicativos de muitas condições patológicas, incluindo hipertensão arterial, isquemia, inflamação e diabetes (McHedlishvili e Maeda, 2001; Bukowska *et al.*, 2013). O uso de fluidos reais como amostras de sangue levanta enormes problemas de conservação, contaminação e questões de ordem ética que são difíceis de contornar. Nesta fase do trabalho que é essencialmente exploratória, para definir o design do sistema microfluídico a desenvolver, é preferível usar um fluido biomimético. Porém, da literatura consultada verificou-se que praticamente não existem fluidos biomiméticos que permitam estudar a deformação das células. Excetuam-se alguns trabalhos, como o efetuado pelo grupo de investigação do Prof. Rui Lima (Pinho *et al.*, 2014; Calejo *et al.*, 2015; Bento *et al.*, 2018; Pinho, 2018). Neste contexto este trabalho considera assim um estudo detalhado do uso de fluidos análogos de modo a tentar encontrar um fluido que se adeque à fase de desenvolvimento do dispositivo microfluídico em causa neste projeto. Dada a relação encontrada nos trabalhos consultados na literatura em fluidos biomiméticos do sangue, para estudos de deformação dos glóbulos vermelhos, o presente trabalho seguiu a mesma linha de investigação, devendo explorar-se em trabalhos futuros a sua adequabilidade ao estudo de deformabilidade de outras células.

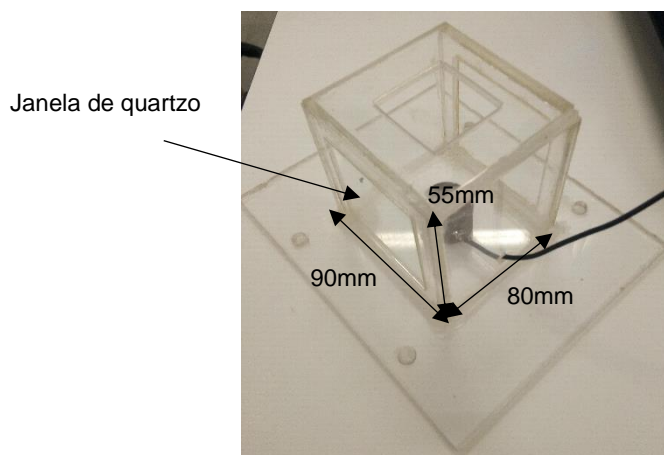
### 3. Metodologia e implementação experimental

Neste capítulo descrevem-se as instalações experimentais e condições de funcionamento consideradas para a realização dos ensaios efetuados, bem como os procedimentos efetuados para caracterizar as superfícies e os fluidos testados, a molhabilidade e a resposta dinâmica das gotas sob atuação eletrostática, a deformação de partículas e a sua velocidade nos microcanais. Este capítulo inclui também a análise dos erros cometidos e incertezas associadas às diferentes medições e avaliações das grandezas obtidas experimentalmente.

#### 3.1. Instalação experimental para caracterização da molhabilidade e da tensão superficial, com e sem atuação eletrostática

Para todos os líquidos testados foi medida a sua tensão superficial, o ângulo de contacto estático sem atuação eletrostática e com atuação eletrostática.

À exceção da tensão superficial e da deformação de partículas, todos os restantes ensaios foram realizados no interior de uma câmara *Perspex*, assente no suporte de um tensiómetro ótico (*THETA da Attention*), que pode ser ajustado em três graus de liberdade. As dimensões totais da câmara são  $55 \times 80 \times 90 \text{ mm}^3$ , com duas janelas quadradas de quartzo nas faces laterais com 50 mm de lado, para reduzir a distorção ótica nas medições obtidas e minimizar o erro que lhe está associado.

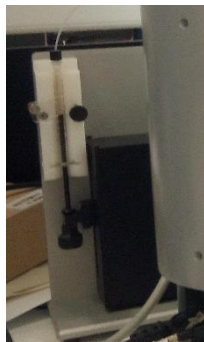


**Figura 12:** Câmara de Perspex com janelas de quartzo.

##### 3.1.1. Arranjo experimental para a caracterização da molhabilidade sem atuação eletrostática

Os ângulos de contacto estáticos e a tensão superficial dos líquidos testados foram medidos usando um tensiómetro ótico *Attention* – modelo *Theta* que inclui uma câmara de CCD (*charge-coupled device*) monocromática acoplada a um microscópio e um sistema de geração de gotas com volume

regulável (Figura 13). As imagens captadas pela câmara CCD têm uma dimensão de 512x512 *pixel* e o sistema ótico tem uma resolução espacial de 21  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ . O sistema de geração de gotas é constituído por uma pequena bomba de seringa que regula o caudal de líquido que passa pela agulha, até gerar uma gota de volume controlável, na extremidade dessa agulha. Esta está fixa a um suporte regulável, que possui dois graus de liberdade, permitindo ajustar a posição e a distância da agulha, e consequentemente, da gota em relação à superfície em estudo. Todo o sistema de geração de gotas e da medição dos ângulos de contacto são controlados automaticamente pelo computador através do *Software One Attension*.



Gerador de gotas

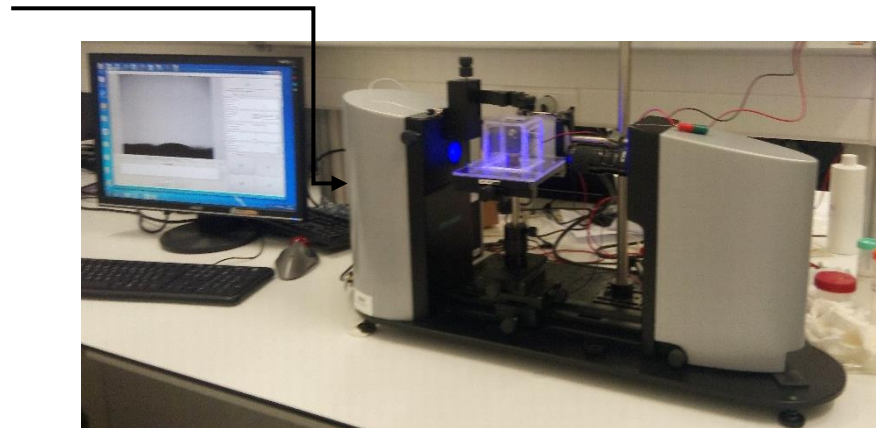
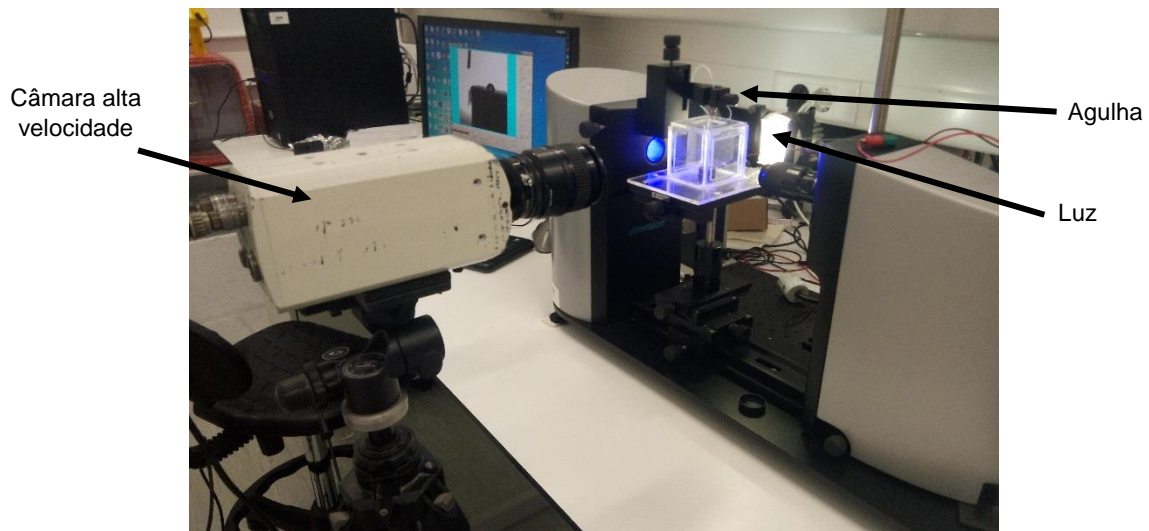


Figura 13: Tensiómetro ótico *Attension*.

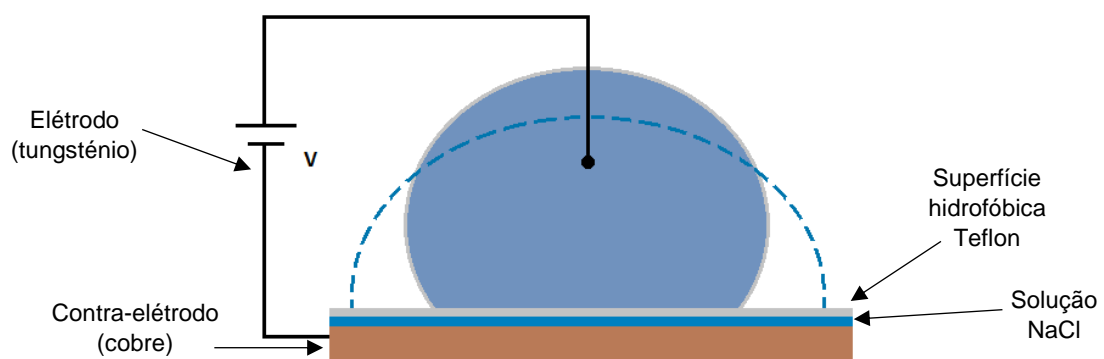
### 3.1.2. Arranjo experimental para a realização da molhabilidade estática e comportamento dinâmico das gotas por atuação eletrostática

Para além de caracterizar os ângulos estáticos em função de tensão elétrica, também é necessário caracterizar a resposta dinâmica da gota à atuação eletrostática, nomeadamente a variação do seu diâmetro de espalhamento no tempo. Dado que a escala característica do tempo de espalhamento da gota durante a atuação eletrostática é da ordem dos milissegundos, o processo de espalhamento da gota ao longo do tempo é captado usando uma câmara de alta velocidade, *Phantom v4.2* da *Vision Research Inc.*, colocada perpendicularmente ao plano de deposição da gota. As imagens captadas têm uma resolução de 512X512 *pixel* e são gravadas a uma taxa de 2200 *frames/s*. A resolução espacial varia de ensaio para ensaio, variando entre os 30  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  a 33  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  dependendo do ensaio. A resolução temporal é de 0,45 ms. A zona onde a câmara captura as imagens é iluminada com uma luz LED (Figura 14).



**Figura 14:** Montagem para captação do diâmetro de espalhamento.

Os ensaios de atuação eletrostática são realizados no interior da câmara de *Perspex* e, para a análise da atuação eletrostática é usado um elétrodo de tungsténio (para avaliação da resposta das gotas) onde se utiliza a configuração representada na figura 15, dando continuidade ao trabalho desenvolvidos por Ramos (2014), Laurência (2015) e Mata (2016). A atuação é realizada com um elétrodo capilar de tungsténio de diâmetro 25  $\mu\text{m}$  (Goodfellow Cambridge Ltd.), funcionando como um elétrodo de controlo e que realiza a atuação na parte superior da gota, e com um cilindro de cobre de diâmetro 22 mm e altura 18 mm, que serve de contra-elétrodo, onde irá estar depositada a gota. A superfície hidrofóbica escolhida para revestir o cilindro foi Teflon. Para facilitar a adesão da folha de Teflon ao cilindro de cobre, minimizando a captação de bolhas de ar, é usada uma solução de cloreto sódio aplicada entre a folha de Teflon e o cilindro (recomendado em Restolho *et al.*, 2009).



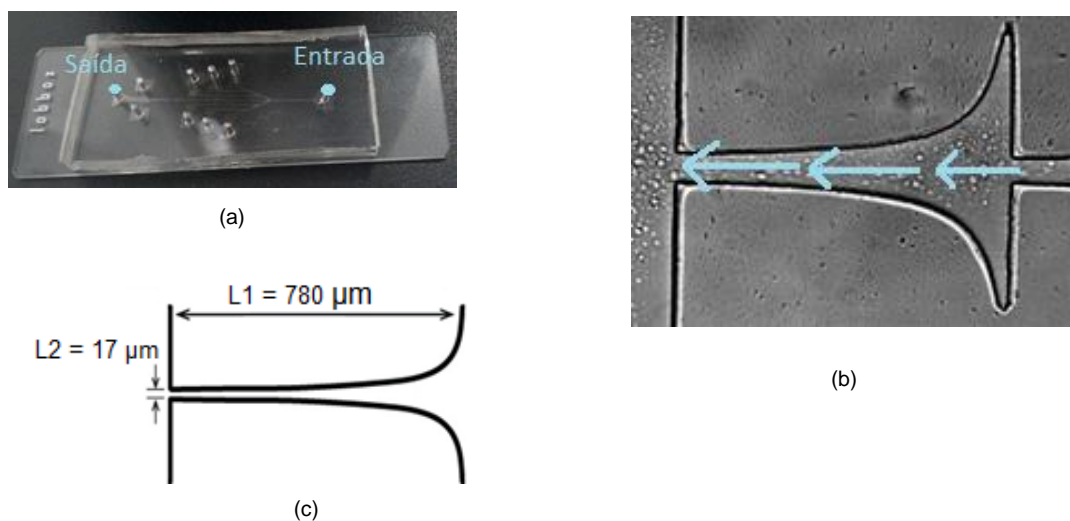
**Figura 15:** Esquematização da instalação experimental da atuação eletrostática.

O elétrodo de tungsténio e o cilindro estão ligados a uma fonte de alimentação de corrente contínua (*Sorensen DCR600-.75B*) e os ensaios são realizados com voltagens de 0V, 50V, 100V, 125V, 150V, 175V, 200V, 225V e 230V.

Como já referido no capítulo 2 optou-se por usar corrente contínua de modo a dar continuidade aos trabalhos de Ramos (2014), Laurência (2015) e Mata (2016), uma vez que não existe nenhuma vantagem comprovada na utilização de corrente alternada.

### 3.2. Instalação experimental e condições de funcionamentos usadas na caracterização da deformação das partículas nos fluidos biomiméticos

Os ensaios de deformação de partículas foram realizados em microcanais de PDMS com contração hiperbólica como ilustrado na figura 16.

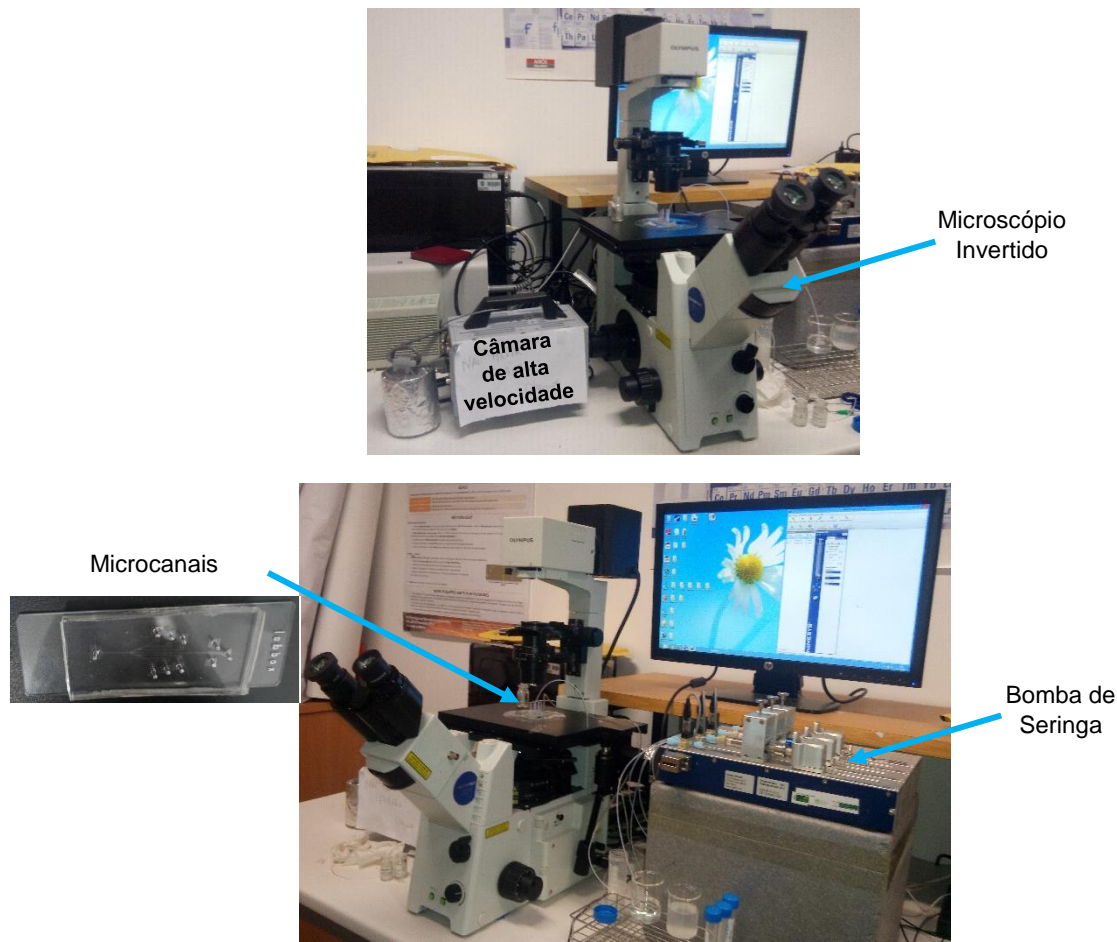


**Figura 16:** Microcanais utilizados para caracterizar a deformação das partículas nos fluidos biomiméticos. (a) Foto ilustrativa do dispositivo microfluídico com os microcanais b) geometria do microcanal vista ao microscópio ótico (Ampliação da imagem) e c) tamanho dos microcanais.

O fluido escoar pelos canais sendo injetado por uma bomba de seringa que contém o fluido a ser analisado. A bomba e o dispositivo com os canais estão ligados por tubos de Teflon.

É usado um microscópio invertido (IX71, *Olympus*) que capta as imagens do escoamento nos microcanais através da câmara de alta velocidade (*Photron, Fastcam SA3*) As imagens são gravadas a uma taxa de aquisição de 4000 *frames/s* com uma dimensão de 640x640 pixel. Sendo assim, a resolução espacial é de 1,185  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  e a resolução temporal é de 0,25 ms. Como as velocidades do escoamento de partículas é considerada grande, para ser captada nos filmes, e uma vez que as primeiras imagens deixavam rastro, teve de se aumentar o tempo de exposição para 1/20000 que minimizou o arrasto das partículas.

Foram usados vários caudais numa gama aproximada de 100 a 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ , mas devido a questões de precisão da medida do caudal inerentes à geometria usada no dispositivo, não é possível avaliar de forma quantitativa exata o caudal injetado aos canais.



**Figura 17:** Instalação experimental usada para determinar a deformação de partículas.

### 3.3. Procedimento experimental

#### 3.3.1. Preparação das soluções e caracterização das propriedades suas termofísicas

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas 3 espécies de soluções aquosas diferentes (usando água destilada): uma solução com uma goma de xantana em 4 concentrações distintas (0,05wt%, 0,10wt%, 0,15wt% e 0,35wt%), seguindo o trabalho desenvolvido em Moita *et al.* (2015) uma solução de PMMA (polimetil-metacrilato) com três tamanhos de partículas diferentes (6  $\mu\text{m}$ , 10 $\mu\text{m}$  e 20  $\mu\text{m}$ ), com uma concentração de 1wt% e por último uma solução de surfactante (Brij40 da Thermo Fisher). Ao misturar-se com a água o surfactante precipita formando partículas semirrígidas de diferentes tamanhos. Assim, para além da solução não filtrada considerou-se ainda o uso de 3 soluções, uma filtrada com 20  $\mu\text{m}$ , outra filtrada com 10  $\mu\text{m}$  e outra sem filtro, também com 1wt% de concentração.

A primeira foi escolhida devido ao seu comportamento reológico não-Newtoniano que é semelhante ao do sangue. Verificou-se também se o comportamento das gotas desta solução era alterado mediante a atuação eletrostática dependendo da concentração da goma. No entanto, como esta goma formava



uma homogeneidade, ou seja, não continha partículas que pudessem mimetizar o comportamento das células, optou-se por estudar soluções com partículas esféricas de PMMA (rígidas) com 1wt% de concentração com diferentes tamanhos de partículas, como já foi referido anteriormente e comparar com o análogo obtido com o surfactante que contém partículas deformáveis.

Após a sua preparação, todas as soluções foram caracterizadas em termos da sua massa específica,  $\rho$ , tensão superficial (ou interfacial líquido-gás),  $\gamma_{LV}$ , e viscosidade dinâmica, por se tratarem das propriedades físicas mais relevantes para os processos que se pretendem estudar.

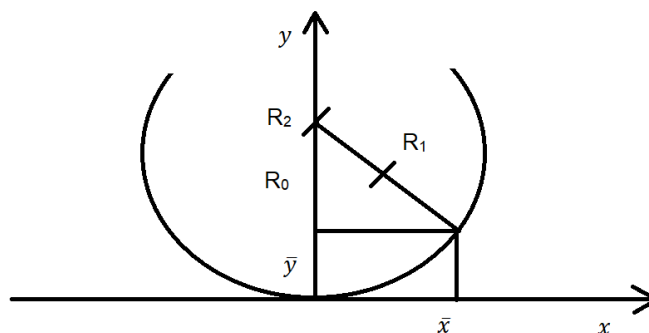
A tensão superficial foi medida no tensiómetro ótico usando o método da gota pendente. A forma de gota suspensa na extremidade da agulha é determinada pelo equilíbrio de forças, incluindo a de tensão superficial e o peso de líquido e é governada pela equação de Laplace (Mugele & Baret, 2005).

$$\Delta p = \gamma_{LV} \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (25)$$

em que  $\Delta p$  é a diferença de pressão ao longo da interface,  $R_1$  e  $R_2$  são os raios principais de curvatura definidos no plano  $xy$  e no plano perpendicular a este, respetivamente (Figura 18). Quando não existem forças externas a atuar na gota,  $\Delta p$  pode ser descrita pela função linear:

$$\Delta p = -\Delta_\rho g y + \frac{2\gamma_{LV}}{R_0} \quad (26)$$

onde  $\Delta_\rho$  é a diferença de densidade ao longo da interface,  $g$  é a constante de aceleração da gravidade,  $y$  a coordenada vertical e  $R_0$  o raio principal de curvatura na origem (Figura 18). O primeiro termo corresponde aos valores de  $y$  em que a pressão  $\Delta p$  é dada pela pressão hidrostática, enquanto que o segundo corresponde à diferença de pressão no referencial ( $x = y = 0$ ), ou seja, ao ponto em que  $R_0 = R_1 = R_2$ , que coincide com a curvatura da gota quando esta se forma (Harris & Byers, 1989).



**Figura 18:** Esquema da gota pendente.

Combinando as equações anteriores (25 e 26), obtém-se a equação de Young-Laplace:

$$-\Delta\rho gy + \frac{2\gamma_{LV}}{R_0} = \gamma_{LV}\left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2}\right) \quad (27)$$

Manipulando a equação anterior, é possível obter a tensão superficial,  $\gamma_{LV}$ , em função do fator de forma,  $\beta$ :

$$\gamma_{LV} = \frac{\Delta\rho R_0^2}{\beta} \quad (28)$$

Esta é a expressão usada pelo *Software One Attension* para determinar a tensão superficial do líquido pelo método da gota pendente. O perfil geométrico da gota é detetado a partir de imagens gravadas pela câmara acoplada ao microscópico do tensiómetro que são processadas, utilizando um algoritmo de detecção de contornos associado a um gradiente da intensidade na escala de cinzentos. O algoritmo de implementação do método da gota pendente pode-se encontrar em detalhe nas literaturas de Harris & Byers (1989) e Cheng *et al.* (1990).

A gota pendente surge na extremidade da agulha, tendo-se o equilíbrio entre a tensão superficial e o peso da gota. Registam-se 121 imagens, captadas pela câmara do tensiómetro, em intervalos de  $\pm 83$  ms. Cada imagem obtida é processada automaticamente pelo *software*, sendo determinado um valor para a tensão superficial. Por fim, é calculado um valor médio dos valores registados pelo *software*. Para cada líquido analisado, foram realizados quinze ensaios repetidos, sendo que o valor final considerado para a tensão superficial é a média do total dos ensaios. Estes ensaios foram realizados no interior da câmara de *Perspex*, previamente saturada a  $20^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ . Na figura 19 pode-se observar o *software*:

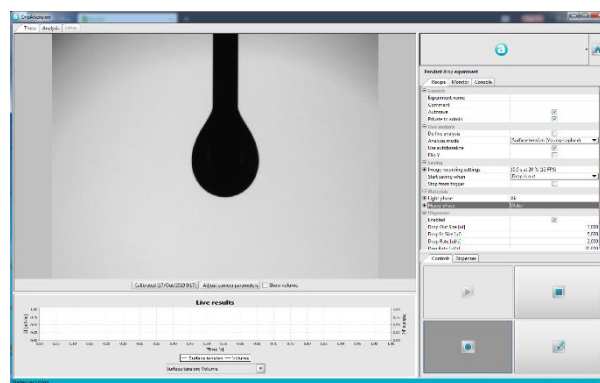


Figura 19: Visualização do Software *One Attension*.

A massa específica das soluções foi considerada aproximadamente igual à massa específica da água, no entanto o valor da massa específica das 'gomas' teve por base a literatura Moita *et al.* (2015).

A tabela 1 resume os valores da massa específica e da tensão superficial a  $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  para as soluções usadas neste trabalho. Como são soluções aquosas os seus valores são próximos dos valores da água destilada. Assim sendo, a viscosidade dinâmica foi considerada como aproximadamente constante e igual à da água a  $20^{\circ}\text{C}$ , ou seja,  $1,000 \times 10^{-3} \text{Ns}/(\text{m})^2$  (White, 2009).

**Tabela 1:** Propriedades físicas das soluções estudadas neste trabalho e da água destilada. <sup>1</sup>Valor retirado de Ramos (2014). <sup>2</sup>Valores retirados de Moita *et al.* (2015).

Soluções		Massa específica, $\rho$ [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ]	Tensão superficial, $\gamma_{SL}$ [ $\text{mN}/\text{m}$ ]
Água destilada		0,998 <sup>1</sup>	$72,992 \pm 0,438$
Gomas	0,05wt%	0,996 <sup>2</sup>	$73,422 \pm 0,220$
	0,10wt%	0,997 <sup>2</sup>	$70,425 \pm 0,495$
	0,15wt%	0,997 <sup>2</sup>	$72,098 \pm 0,203$
	0,35wt%	0,997 <sup>2</sup>	$72,601 \pm 1,058$
PMMA	6micro	0,998	$77,223 \pm 6,606$
	10micro	0,998	$76,808 \pm 4,057$
	20micro	0,998	$81,734 \pm 5,559$
Surfactante com filtro 10micro		0,998	$27,513 \pm 0,224$
Surfactante com filtro 20micro		0,998	$32,663 \pm 0,892$
Surfactante sem filtro		0,998	$28,308 \pm 1,440$

### 3.3.2. Caracterização e seleção das superfícies

Nos capítulos anteriores foi referido que a aplicação de sistemas *electrowetting* é devida à existência de uma camada dielétrica isoladora, que impossibilita o contacto direto entre a gota condutora e o substrato e que permite a aplicação de tensões mais elevadas sem ocorrência de eletrólise. Para espessuras demasiado pequenas o material pode ceder. Porém, a sua espessura não pode ser demasiado grande de modo a não comprometer a atuação eletrostática. Assim, na escolha do material terá que existir um compromisso para permitir a atuação eletrostática do campo magnético e evitar a eletrólise. Através das propriedades das superfícies, é possível ter uma ideia mais eficaz da espessura e da tensão a aplicar em cada material através da sua caracterização da rigidez dielétrica (propriedade que determina o campo elétrico máximo a que o material com uma determinada espessura consegue funcionar como isolante, esta grandeza diminui com o aumento da espessura, da temperatura e da frequência) (Kim *et al.*, 2007).

**Tabela 2:** Propriedades de camadas dielétricas (Melai *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Kumar & Sharma, 2012).

Dielétrico	Teflon (PTFE)	PDMS	SU8 resist	$\text{Si}_3\text{N}_4$
Rigidez dielétrica [ $\text{kV}/\text{mm}$ ]	60	21,2	440	500
Constante dielétrica	2,1	2,3-2,8	3	7,5
Tensão aplicada (DC) [V]	<300	$\pm 500$	$\pm 80$	>40
Espessura típica [ $\mu\text{m}$ ]	25-50	38	2-15	0,15
Ângulo de contacto da água [°]	120	120	84	30

Na sequência dos trabalhos anteriores (Ramos, 2014; Laurência, 2015; Mata, 2016), o material utilizado para aplicação de atuação eletrostática é o Teflon (PTFE) com uma espessura de  $\approx 10 \mu\text{m}$ . No entanto, o material dos microcanais que é usado neste trabalho é o PDMS, porque tem características interessantes em termos de possibilidade de atuação eletrostática e permite um fabrico fácil e a custo controlado dos microcanais a serem usados para estudar a deformação das partículas.

### 3.3.3. Medição dos ângulos de contacto estáticos com e sem atuação eletrostática

Os ensaios para a medição dos ângulos de contacto estáticos das gotas foram realizados no interior da câmara de *Perspex*, previamente saturada com o líquido em estudo, à temperatura ambiente ( $20^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ ), montada na base do tensiómetro como já foi referido no presente capítulo. As medições foram realizadas com o método da gota sésil, usando gotas com um volume entre 1 a  $3 \mu\text{m}$ , que foram depositadas na superfície de Teflon. Como já foi referido, a câmara capta 121 imagens num intervalo de aproximadamente 83 ms, estas imagens são posteriormente tratadas pelo *software One Attension*, que aplica o algoritmo de contorno da gota e aproxima a curva resultante da deteção do perfil da gota à equação de Young-Laplace. O valor do ângulo de contacto é definido para cada imagem, pela medição do ângulo formado entre o sólido e a tangente à superfície da gota, em ambos os lados da gota. O *software* apresenta o ângulo de contacto à direita e à esquerda da gota, e uma média dos dois ângulos, sendo que o ângulo final surge de uma média dos 121 valores.

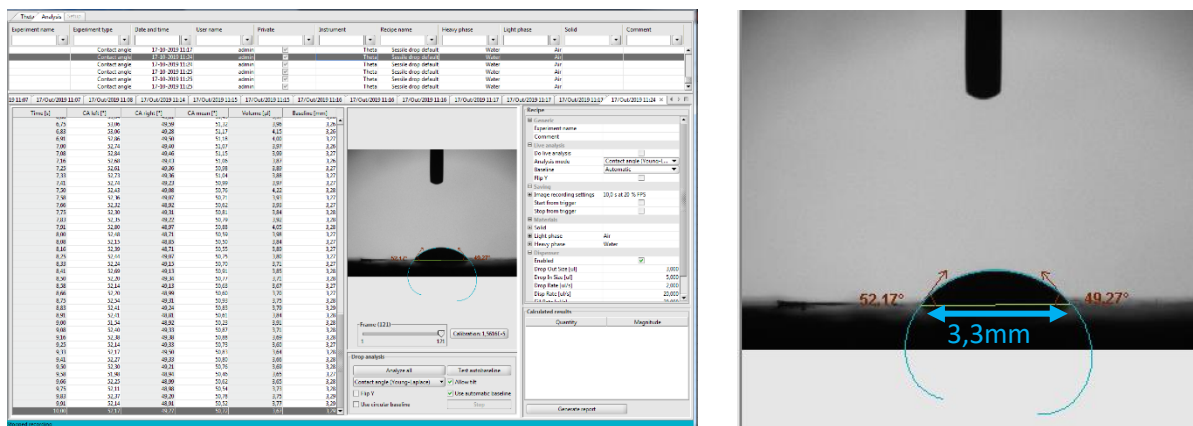


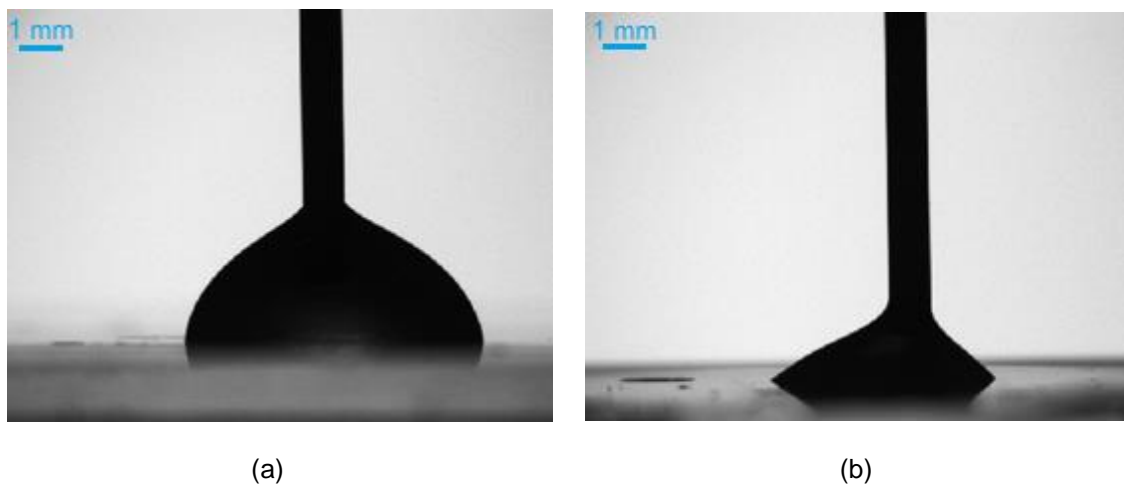
Figura 20: Medição dos ângulos de contacto (à esquerda e à direita), pelo Software *One Attension*.

A incerteza na medida do ângulo é de  $\pm 1^\circ$ , segundo o manual do equipamento (<http://www.paralab.pt/sites/default/files/pdf/703D.pdf>). Esta medição é repetida pelo menos 5 vezes para os ângulos estáticos sem atuação eletrostática em Teflon e PDMS, e para atuação eletrostática apenas é realizada para a superfície de Teflon.

No entanto, para os ensaios com atuação eletrostática em que existe variação do ângulo de contacto o procedimento é praticamente o mesmo, porém apenas são captadas as imagens depois de aplicar a tensão que se pretende, ou seja, depois do eléctrodo de tungsténio ser colocado em contacto com a gota. Os ensaios realizam-se para tensões de 0V, 50V, 100V, 125V, 150V, 175V, 200V, 225V e 300V. A curva da variação do ângulo de contacto estático com a tensão aplicada resulta da média de pelo menos 6 curvas obtidas em condições experimentais idênticas. Em cada ensaio a gota é depositada numa zona diferente da própria superfície.

### 3.3.4. Medição dos ângulos de contacto quasi-estáticos

Os ângulos quasi-estáticos de avanço e de recuo foram calculados e avaliados, de modo a estimar o valor da histerese. Estas medições foram também realizadas no tensiómetro ótico, sob as mesmas condições dos ensaios anteriores. Para a medição do ângulo quasi-estático de avanço, a gota é colocada na superfície, sendo o caudal de líquido fixado de forma a formar a gota de um modo controlado, permitindo variar o seu volume muito lentamente, conduzindo assim a um avanço da linha de contacto. O ângulo quasi-estático de avanço é o primeiro ângulo medido aquando a linha de contacto avança. O ângulo de contacto quasi-estático de recuo é medido da mesma maneira, no entanto controla-se a sucção de líquido para que o volume de gota diminua, sendo o ângulo medido antes da linha de contacto ter recuado. Este procedimento encontra-se descrito em Extrand (1998) e é ilustrado na figura 7.

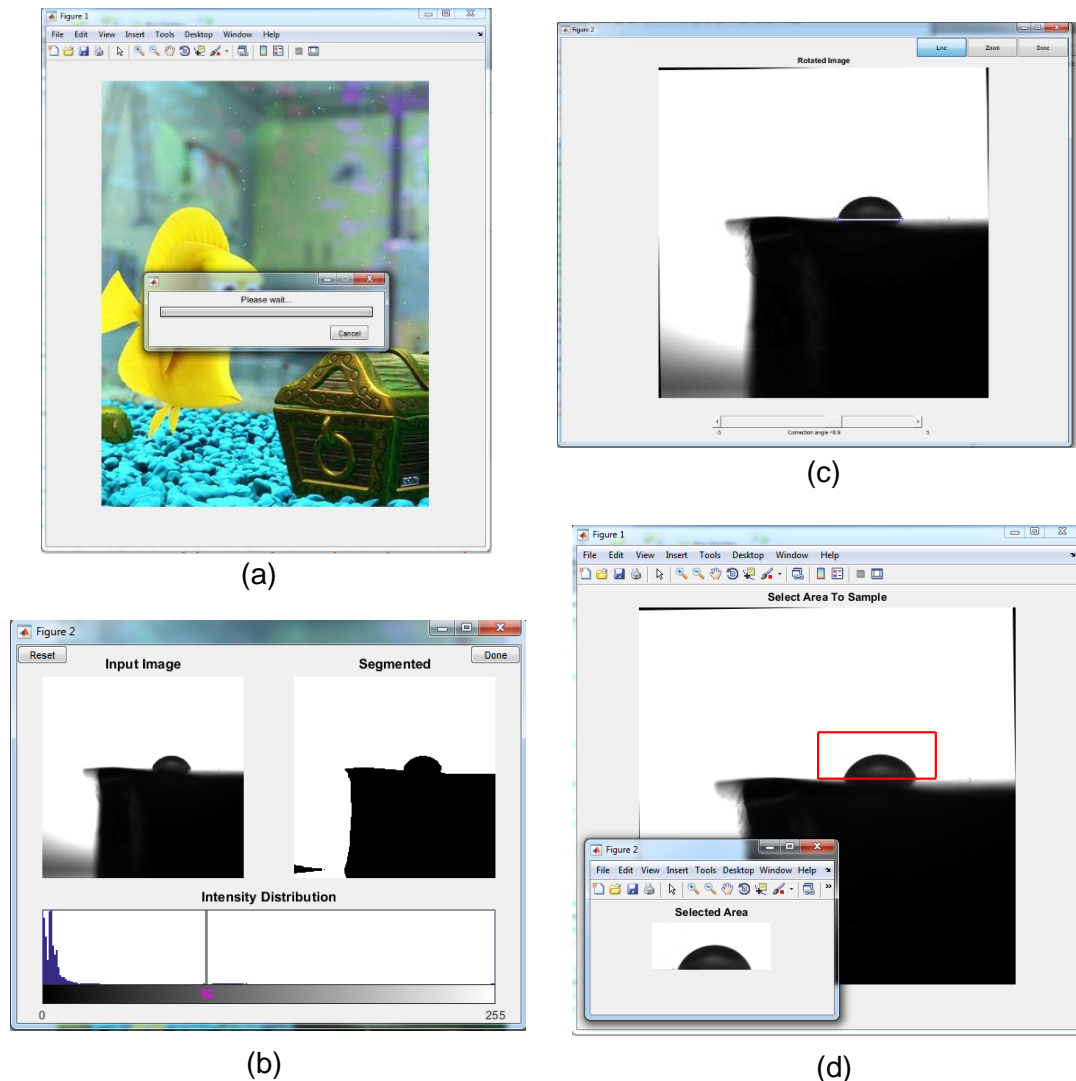


**Figura 21:** Medição dos ângulos de contacto quasi-estáticos, (a) avanço e (b) recuo

### 3.3.5. Medição do diâmetro de espalhamento da gota sob atuação eletrostática

Para além da resposta estática, é também caracterizada a resposta dinâmica da gota durante a atuação eletrostática, sendo o diâmetro de espalhamento um parâmetro fundamental para caraterizar este comportamento. Os ensaios foram realizados novamente dentro da câmara de *Perspex*, com as

mesmas condições dos ensaios anteriores. As imagens foram captadas pela câmara de alta velocidade já referida anteriormente. As imagens são analisadas em *Matlab*, recorrendo ao processamento das imagens, através da escala e do sample rate, onde é medido o diâmetro de espalhamento.



**Figura 22:** Análise do diâmetro de espalhamento da gota, *Software Matlab*, (a) processamento das imagens, (b) eliminação das interferências, gota superfície, (c) nivelar imagem e (d) seleção da fronteira gota superfície.

Nestes ensaios, a gota é depositada na superfície de Teflon e com o elétrodo de tungsténio são aplicadas diferentes tensões de 175V, 200V, 230V. A cada tensão aplicada é depositada uma nova gota numa região diferente da superfície. A câmara de alta velocidade capta a resposta da gota em várias imagens, e processa as mesmas para obter uma evolução temporal do diâmetro de espalhamento  $D(t)/D_0$ , sendo,  $D_0$  o diâmetro inicial da gota depositada (sem atuação eletrostática) e  $D$  o diâmetro da gota ao longo do tempo da atuação eletrostática. Foram testadas as soluções de PMMA com os diferentes tipo de partículas (6  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$  e 20  $\mu\text{m}$ ), também as três soluções de surfactante e apenas dois tipos de goma a de menor concentração (0,01%) e a de maior concentração (0,35%), visto que apresentavam comportamentos idênticos, independentes do valor da concentração da goma, como discutido em pormenor no capítulo seguinte.

O diâmetro de espalhamento é apresentado na sua forma adimensional, ou seja, é dividido pelo diâmetro inicial da gota,  $D(t)/D_0$ , por forma a eliminar os efeitos da variação do diâmetro inicial nos diferentes ensaios.

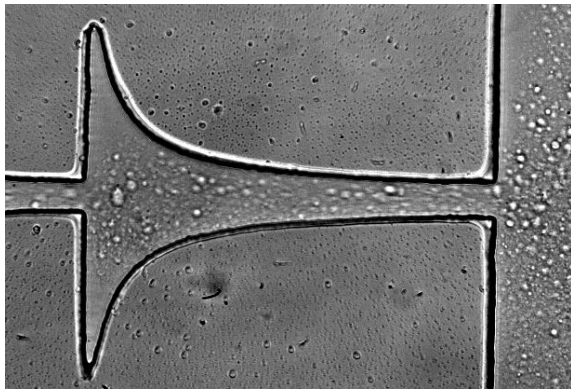
### 3.3.6. Medição do índice de deformação e da velocidade das partículas em microcanais

Na análise da deformação de partículas nos microcanais, foram apenas usadas a solução de PMMA com partículas de 10  $\mu\text{m}$ , e o seu análogo, surfactante (filtrado com 20  $\mu\text{m}$ ). Não foi possível realizar os ensaios com as restantes soluções, uma vez que, as 'gomas' não tem partículas, sendo homogêneas, e as soluções de PMMA com partículas de 20  $\mu\text{m}$ , geravam um entupimento nos microcanais e as de 6  $\mu\text{m}$ , eram pequenas demais para serem detetados na câmara de alta velocidade.

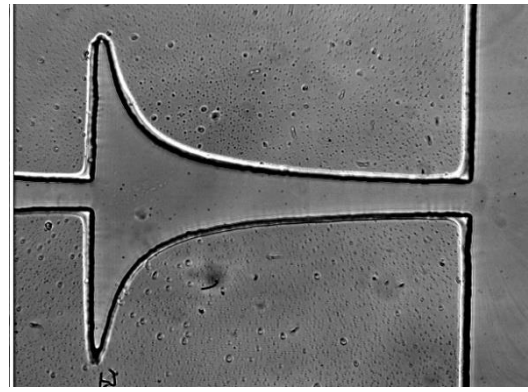
Nestes ensaios, foram avaliados dois parâmetros, a velocidade das partículas ao longo do canal e a sua deformação. Foram realizados vários ensaios com diferentes caudais, no entanto, como referido anteriormente, não deu para avaliar com precisão o caudal que circulava no microcanal, uma vez que, existiam perdas no processo, e a geometria dos dispositivos era complexa com várias ramificações.

O sistema de microscopia de vídeo de alta velocidade utilizado neste estudo consistiu em um microscópio invertido (*IX71, Olympus*) combinado com uma câmara de alta velocidade (*Photron, Fastcam SA3*). O microcanal foi colocado e fixado na placa do microscópio e o caudal dos fluidos de trabalho variou nos diferentes ensaios (entre 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  e 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) por meio de uma bomba de caudal com seringa (*Nemesys, Cetoni*). As imagens foram gravadas pela câmara de alta velocidade em torno do plano central dos microcanais com a melhor relação da taxa de aquisição, com o objetivo de minimizar o arrasto das células nas altas taxas de fluxo. Em seguida, a sequência gravada de imagens foi transferida para um computador para ser avaliada usando o *software* de análise de imagens, *Image J*. Todos os ensaios experimentais foram realizados em temperatura ambiente ( $T = 22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

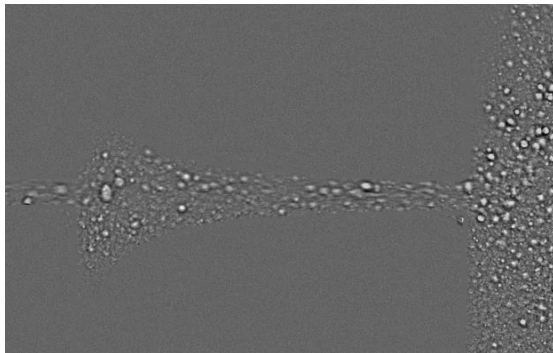
Este *software* permitiu definir a velocidade das partículas, seguindo uma partícula através da sequência de imagens até fim do canal como se pode observar na figura 24. Para determinar a deformação, o processo é semelhante, selecionar a partícula que se pretende seguir no microcanal, no entanto, usando outro comando do *Software*, e usando passos intermédios de modo a melhorar a imagem, sendo necessário criar um *background* (Figura 23). Posteriormente é necessário um cálculo adicional, para calcular o Índice de Deformação. Esta opção de análise dá o valor de X e Y, sendo os comprimentos maior e menor da partícula referente à coordenada x e y, respetivamente, sendo que o Índice de Deformação calculado com a equação 19.



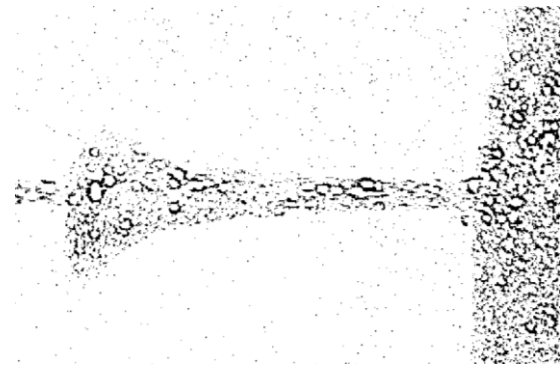
(a)



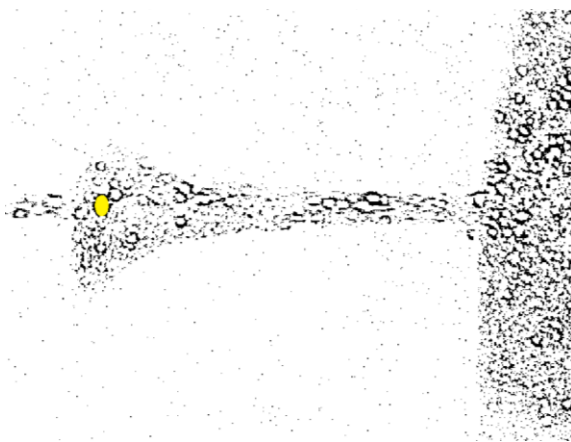
(b)



(c)



(d)



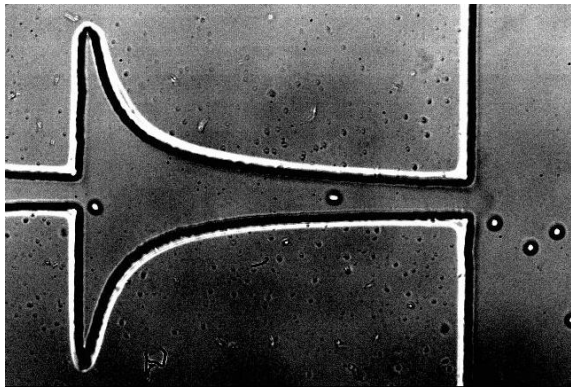
(e)

Results									
File	Edit	Font	Results						
	Area	Mean	Min	Max	X	Y	Major	Minor	Angle
1	145	-38.807	-72	-18	127	331.500	22.216	20.976	0

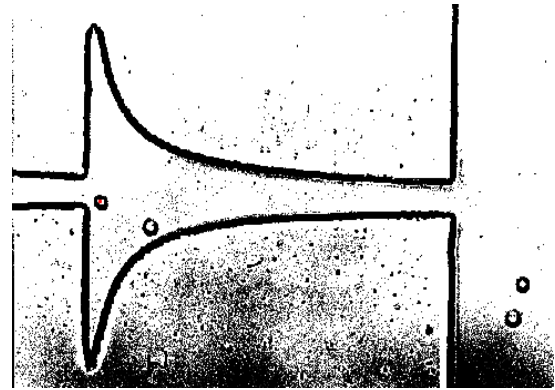
(f)

**Figura 23:** Etapas principais para calcular o Índice de Deformação (neste caso surfactante), (a) imagem inicial, (b) criado o *background*, (c) subtração do *background* em relação à imagem inicial, (d) ajuste de imagem, (e) cálculo do X e Y para determinar o ID e (f) Resultados obtidos.

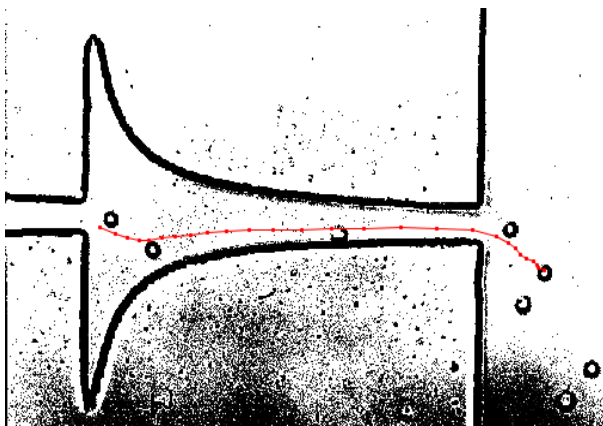




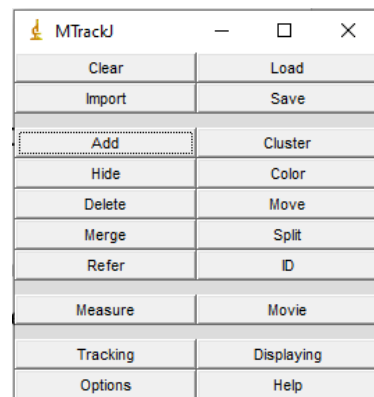
(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 24:** Etapas principais para calcular a velocidade das partículas nos microcanais (neste caso PMMA), (a) imagem inicial, (b) imagem ajustada e (c) seleção de pontos para obter a velocidade e (d) comando para análise da velocidade.

### 3.4. Quantificação de incertezas

#### 3.4.1. Medição da tensão superficial, ângulos de contacto estáticos e quasi-estáticos

Na utilização do tensiómetro ótico para determinação da tensão superficial, existe um erro associado de  $\pm 0,01 \text{ mN/m}$  e na medição dos ângulos de contacto estáticos e quasi-estáticos, existe um erro de  $\pm 0,1^\circ$ , ambos previstos pelo manual do aparelho. É ainda importante salientar o erro associado às heterogeneidades químicas do próprio fabrico das superfícies, que fazem variar o ângulo de contacto, pois estes são muito sensíveis a esta heterogeneidade, não sendo quantificável.

### 3.4.2. Medição do diâmetro de espalhamento

As medições do diâmetro de espalhamento da gota são todas em pixel, através da definição da fronteira e do cálculo da distância que define o diâmetro. A incerteza está associada à determinação da fronteira que separa a gota e a imagem de fundo, que corresponde, em média, cerca de  $\pm 2$  pixel de incerteza. Estas medições são posteriormente convertidas pelo código desenvolvido em *Matlab* que tem associado um erro de  $\pm 2$  pixel devido à calibração da imagem.

Com estas medições, o diâmetro tem associado um erro relativo,  $e(\%)$ , que pode ser calculado com a equação

$$e(\%) = \frac{\Delta D_{gota}}{D_{gota}} \times 100 = \sqrt{\left(\frac{\Delta C_f}{C_f}\right)^2 + \left(\frac{2e_{dgota}}{D_{gota} * C_f}\right)^2} \times 100 \quad (29)$$

onde  $\Delta C_f$  é o erro relativo cometido na calibração e  $e_{dgota}$  é o erro da definição da fronteira da gota, já referidos. O factor de calibração usado para a correspondência pixel-milímetros,  $C_f$ , é de 45 pixel/mm.

Para as gotas utilizadas neste trabalho que têm em média um volume de 3  $\mu$ l obtém-se um erro relativo de 6,67%.

### 3.4.3. Medições associadas à deformação de partículas

Para as medições do Índice de Deformação, a análise de imagens e a aquisição de dados são dois recursos principais para determinar a precisão das medições. As fontes de incerteza mais relevantes associadas às medições realizadas são, tal como no caso do diâmetro de espalhamento o algoritmo de deteção do contorno das partículas e o processo de pré-processamento usado no software para tentar melhorar a qualidade das imagens. Supondo que o erro relativo varie linearmente com estes dois parâmetros principais para ambos os métodos de aquisição, a função *Analyze Particles* ou seleccionando manualmente cada partícula usando a ferramenta *Wand*, é possível estimar essa incerteza de medidas ( $\Delta E_{ID}$ ) associada ao ID usando a seguinte equação (Sampaio *et al.*, 2015):

$$\frac{\Delta E_{ID}}{ID} = \sqrt{\left(\frac{\Delta lim}{lim}\right)^2 + \left(\frac{\Delta pre}{pre}\right)^2} \times 100 \quad (30)$$

A relação à incerteza associada ao termo limite,  $\Delta lim/lim$ , é o erro relativo associado à seleção do utilizador e possui um valor máximo de cerca de 5%. A incerteza associada ao pré-processamento,  $\Delta pre/pre$ , tem um valor máximo de incerteza de 2%. Obtendo um erro total de 5,39%.

## 4. Resultados e discussão

Como referido nos Objetivos (subcapítulo 1.3) este trabalho procura avaliar comportamento de diversos fluidos biomiméticos (análogos do sangue) caracterizando em pormenor o comportamento de deformação das partículas que os constituem. Por outro lado, no contexto do trabalho é também importante avaliar a sua resposta dinâmica à atuação eletrostática por forma a verificar se podem ser manuseados nos dispositivos microfluídicos que se pretende desenvolver.

Assim, os resultados são apresentados em 3 grandes fases distintas: a primeira fase considera a caracterização das soluções em estudo, ao nível da molhabilidade em relação ao material dielétrico que compõe os dispositivos microfluídicos que se estão a desenvolver. A molhabilidade é avaliada pelos ângulos de contacto estáticos e quasi-estáticos. Posteriormente, na segunda fase, realiza-se a análise da resposta dos fluidos à atuação eletrostática. Nesta fase avalia-se esta resposta observando a variação do ângulo estático de gotas dos fluidos biomiméticos em função da tensão aplicada. A resposta à atuação é também realizada em termos dinâmicos observando para a evolução temporal do diâmetro de espalhamento. Após esta análise é feita uma seleção das soluções em estudo para escolher as que são mais relevantes de caracterizar em relação à deformação de partículas (3ª fase).

Os resultados obtidos são interpretados de modo qualitativo e quantitativo e do ponto de vista eletromecânico, tendo em conta os objetivos deste projeto.

### 4.1. Caracterização da molhabilidade dos fluidos biomiméticos em relação ao material dielétrico que compõe o dispositivo microfluídico

A caracterização dos ângulos de contacto é muito importante quando se pretende estudar um fluido ao nível da sua molhabilidade. Como já foi referido nos capítulos anteriores, é possível compreender tanto ao nível dos fenómenos como do ponto de vista macroscópico, que o facto de a superfície ser hidrofóbica ou superhidrofóbica deverá facilitar a movimentação da gota em *eletrowetting*, permitindo um maior espalhamento durante a atuação e uma maior retração após a atuação, para a mesma tensão aplicada, em relação a uma superfície hidrofílica. Como tal, foram medidos os ângulos de contacto estáticos sem atuação eletrostática, para a superfície de Teflon para as soluções utilizadas neste trabalho, e para a água destilada que é usada como fluido de referência. Mediram-se também os ângulos estáticos da solução de PMMA e surfactante numa superfície de PDMS dado que estas serão as soluções a ser usadas no estudo da deformação das partículas, como se explicará mais à frente neste capítulo. Dado que os canais onde os ensaios para a caracterização da deformação das partículas são fabricados em PDMS é relevante sabermos de que forma as soluções vão interagir com as paredes dos canais, dado que essa interação pode influenciar o escoamento. Nesse contexto, é também importante avaliar a molhabilidade do material dos canais aos fluidos testados. Apenas foram medidos os ângulos quasi-estáticos para as soluções de PMMA, uma vez que, como as soluções de surfactante apresentam uma baixa tensão superficial, os ângulos iniciais de equilíbrio são muito baixos, não sendo

possível medir os ângulos quasi-estáticos pelo método usado neste trabalho. Porém os ângulos medidos são suficientes para atestar a hidrofiliçidade das superfícies de Teflon e PDMS às soluções com o surfactante, em virtude da sua baixa tensão superficial.

Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 3, onde é possível verificar que soluções com ângulos de contacto estáticos mais baixo, correspondem a valores mais baixo de tensão superficial, que é o caso do Surfactante. Esta tabela apenas relaciona os vários fluidos em estudo com uma única superfície (Teflon).

A tabela seguinte (Tabela 4) compara o ângulo de contacto das soluções PMMA e surfactante com duas superfícies diferentes, PDMS e Teflon. Como a solução de 'gomas' é heterogénea, não contém partículas, teve que se excluir para a análise da deformação de partículas, sendo assim, não foram medidos os seus ângulos de contacto na superfície de PDMS.

**Tabela 3:** Ângulos de contacto estáticos em equilíbrio medidos para diferentes soluções na superfície de Teflon.

<sup>3</sup>Valor retirado de Laurência (2015).

Superfície Teflon		Ângulo estático (°)
Água destilada		112 ± 5 <sup>3</sup>
Gomas	0,05wt%	94,352 ± 11,799
	0,35wt%	85,479 ± 8,512
PMMA	6micro	93,431 ± 3,252
	10micro	91,600 ± 5,471
	20micro	91,898 ± 1,407
Surfactante com filtro 10micro		45,520 ± 7,313
Surfactante com filtro 20micro		51,566 ± 6,513
Surfactante sem filtro		53,053 ± 5,500

**Tabela 4:** Ângulo de contacto estático de equilíbrio da solução PMMA medidos nas superfícies de PDMS e Teflon.

Solução	Ângulo estático (°)	
	PDMS	Teflon
PMMA 6micro	74,511 ± 4,406	93,431 ± 3,252
PMMA 10micro	89,988 ± 2,795	91,600 ± 5,471
PMMA 20micro	95,447 ± 5,188	91,898 ± 1,407
Surfactante 10micro	50,436 ± 6,347	45,520 ± 7,313
Surfactante 20micro	51,984 ± 3,812	51,566 ± 6,513
Surfactante	56,067 ± 4,515	53,053 ± 5,500

Embora o Teflon seja considerado uma superfície hidrofóbica, para as soluções que têm surfactante esta superfície entra em contradição, isto deve-se ao facto de as soluções com esta substância tenham uma tensão superficial baixa e consequentemente um ângulo estático de equilíbrio

inferior ao esperado para esta superfície, ou seja, esta superfície para esta solução não apresenta o mesmo regime de molhabilidade. Em relação às restantes soluções esta superfície comporta-se como esperado, sendo hidrofóbica. Também se pode concluir que para a mesma solução, mas com concentrações diferentes (caso das gomas) ou com tamanho de partículas diferentes, o seu ângulo estático não varia significativamente, ou seja, é independente da concentração ou mesmo do tamanho das partículas que compõem a solução.

Em relação à tabela 4 pode-se concluir que para a solução PMMA o valor do ângulo estático nas duas superfícies diferentes não difere significativamente. Apenas para PMMA com partículas de 6 µm na superfície de PDMS é mais baixo que o esperado, o que se pode justificar por existir uma certa impureza na superfície ou por a superfície ter uma certa heterogeneidade. No caso do surfactante, este tem um comportamento esperado, em ambas as superfícies, não difere significativamente o ângulo de contacto de superfície para superfície ou de solução para solução.

A obtenção dos ângulos estáticos elevados é uma característica fundamental que tem de ser verificada nas superfícies a utilizar nos ensaios de *elctrowetting*, dado que revela a hidrofobicidade das superfícies com as gotas dos líquidos que se pretende estudar. No entanto, não é suficiente para caracterizar a molhabilidade da superfície, como já foi referido nos fundamentos teóricos, não fornecendo nenhuma informação sobre os movimentos de recuo e de avanço da gota ou sobre a dissipação de energia na linha de contacto, durante o seu movimento. Para além disso, recentemente foi reconhecido que a medição do ângulo de contacto não é suficiente para caracterizar as superfícies quanto à sua hidrofobicidade, sendo necessário também avaliar o valor da histerese, isto é, a diferença entre o ângulo de avanço e recuo (referido anteriormente). Deste modo, avaliou-se o valor da histerese para as soluções de PMMA, nas duas superfícies em estudo. Como já referido anteriormente, não foi possível realizar os ensaios dos ângulos quasi-estáticos das soluções de Surfactante, por terem uma tensão superficial muito baixa.

**Tabela 5:** Ângulos quasi-estáticos de avanço e de recuo e valor da histerese para as soluções de PMMA nas diferentes superfícies em estudo (PDMS e Teflon).

PMMA	Ângulo quasi-estático PDMS		Ângulo quasi-estático Teflon		Histerese PDMS (°)	Histerese Teflon (°)
	Avanço (°)	Recuo (°)	Avanço (°)	Recuo (°)		
6micro	100,541 ± 4,210	21,472 ± 2,781	93,974 ± 2,386	26,197 ± 1,459	79,069	67,776
10micro	115,048 ± 2,870	31,718 ± 2,031	108,945 ± 5,859	38,719 ± 3,838	83,330	70,226
20micro	113,067 ± 2,201	35,182 ± 4,633	116,890 ± 8,299	35,029 ± 3,145	77,885	81,860

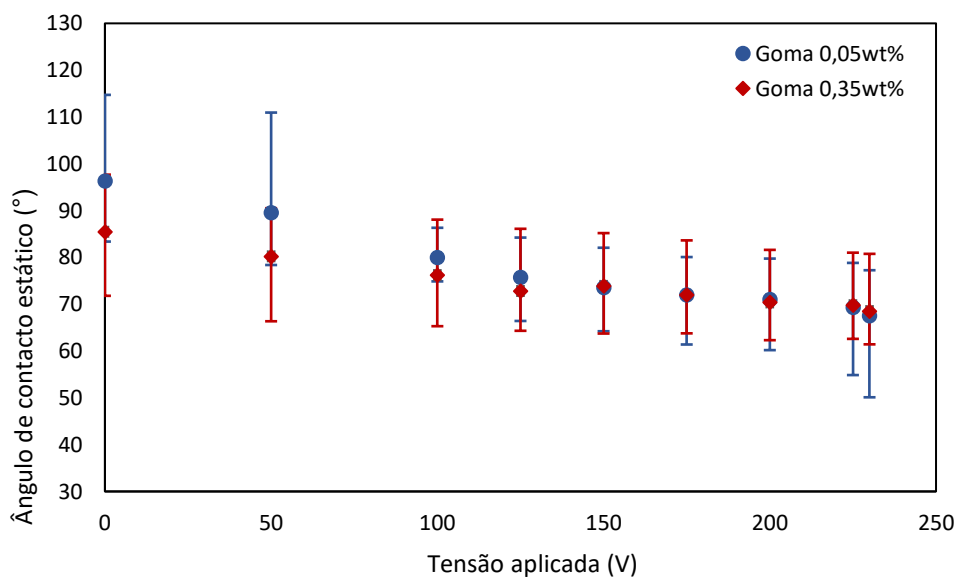
Apesar dos ângulos de contacto estáticos serem relativamente grandes, o valor da histerese nestas duas superfícies é grande em qualquer solução de PMMA, o que significa que para valores de maior histerese implica uma maior adesão das gotas a estes substratos e por isso, uma maior dissipação de energia na linha de contacto, resultando numa menor retração da gota quando a aplicação de uma tensão é interrompida.

Mais uma vez, conclui-se que apesar do tamanho das partículas de solução para solução seja diferente, não existe uma diferença significativa entre o comportamento das mesmas, ou seja, o tamanho das partículas não influencia diretamente as características da solução. Também se conclui que o comportamento do fluido em cada superfície é semelhante, não tendo uma grande diferença entre si.

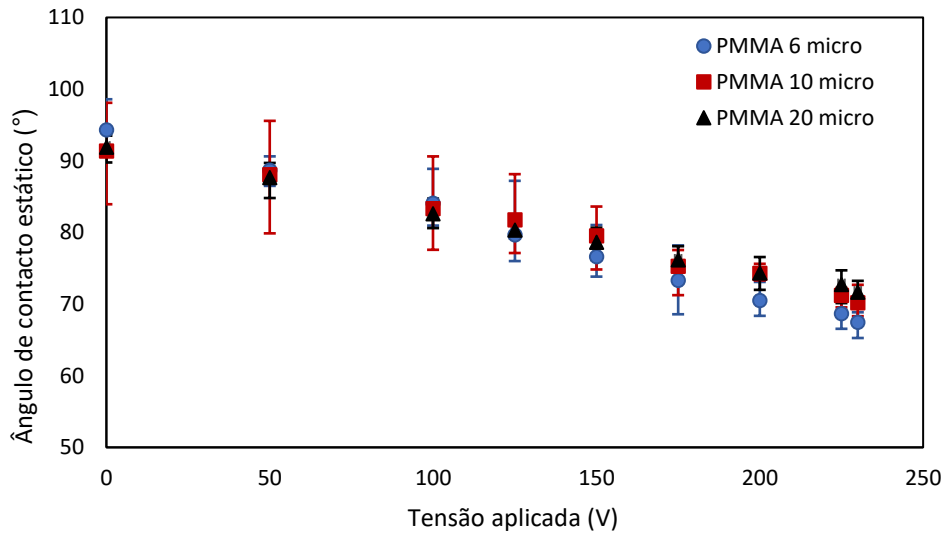
## 4.2. Caracterização da resposta das gotas dos fluidos biomiméticos à atuação eletrostática

Para avaliar a resposta dos fluidos testados à atuação eletrostática, foram efetuados ensaios para quantificar a variação do ângulo de contacto com a tensão aplicada. Como referido anteriormente, a caracterização apenas dos ângulos estáticos e quasi-estáticos não é suficiente para caracterizar uma solução, sendo necessário estudar o comportamento dinâmico de uma gota sob atuação eletrostática. Os ensaios dinâmicos fornecem a evolução temporal do diâmetro da gota durante a aplicação de diferentes tensões.

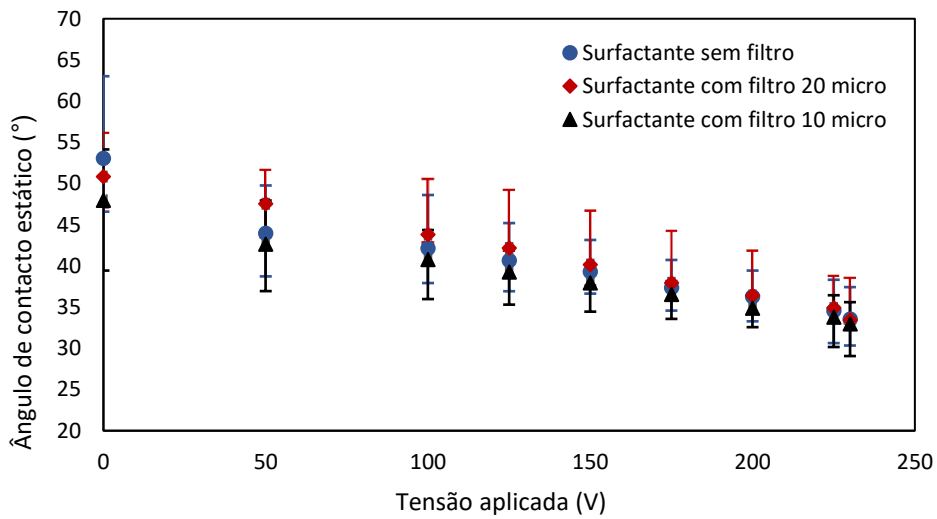
A figura 25 representa a variação do ângulo de contacto sobre atuação eletrostática das duas soluções de gomas, das três soluções de PMMA e das três soluções de surfactante, depositadas numa superfície de Teflon. O ângulo de contacto diminui à medida que se vão aplicando valores de tensão,  $V$ , sucessivamente mais elevados, o que está qualitativamente de acordo com a equação de Young-Lippmann (equação 3). Porém, esta variação torna-se menos evidente para tensões a partir de 200V, onde, através do gráfico, se observa uma tendência para que ocorra saturação do ângulo estático, a partir desta tensão. Estes resultados estão de acordo com os relatados por Mata (2016).



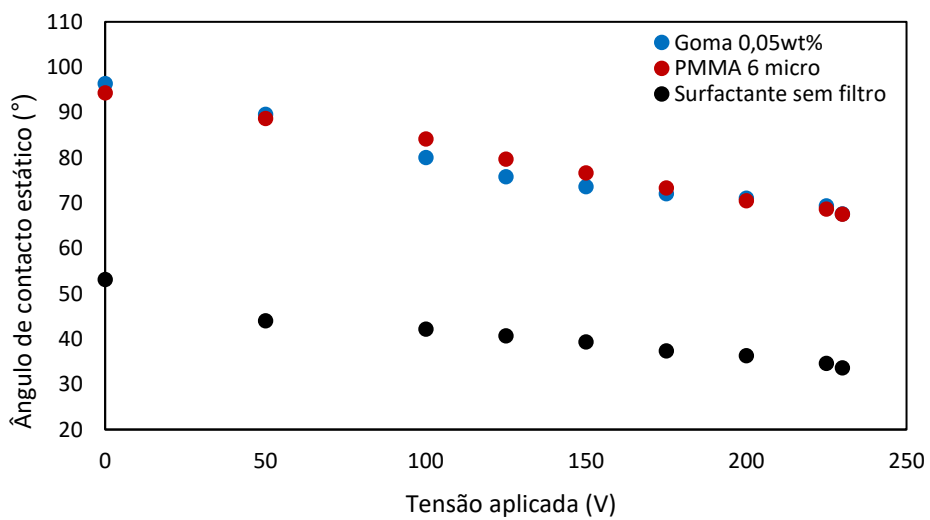
(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 25:** Ângulos de contacto sobre atuação eletrostática das soluções: (a) gomas, (b) PMMA, (c) surfactante e d) goma 0,05wt%, PMMA 6 $\mu$ m e surfactante sem filtro.

A análise do ponto de vista dinâmico é apresentada na figura 26, que representa a evolução temporal do diâmetro de espalhamento resultante da atuação eletrostática com diferentes tensões. O instante inicial, corresponde ao momento imediatamente antes da atuação eletrostática,  $t = 0 \text{ ms}$ . O diâmetro máximo da gota tende a aumentar com o aumento da tensão aplicada, o que está em concordância com a diminuição do ângulo de contacto estático. A evolução obtida é coerente com a literatura Mata (2016). No entanto, nesta solução quando existe um aumento do diâmetro de espalhamento, não existe de seguida uma retração do mesmo, ou seja, quando atinge o diâmetro máximo de espalhamento a gota mantém esse mesmo diâmetro, não se observando nenhum recuo da linha de contacto, quando deixa de existir tensão aplicada, ao contrário do que se pode verificar em Mata (2016). Esta forte irreversibilidade tem, portanto, de estar associada à elevada histerese previamente medida com o Teflon e que não é superada pela força elétrica. Assim sendo, a energia dissipada na linha de contacto durante o movimento de espalhamento da gota impede o seu recuo, tornando o seu movimento irreversível. Apesar de diversos autores observarem o espalhamento do diâmetro da gota para tensões mais baixas, neste trabalho não foi possível, realizar os ensaios com tensões inferiores às usadas, uma das razões poderá estar relacionada com a espessura do material dielétrico ou com as propriedades dos fluídos em estudo.

Pode-se concluir que apesar dos tamanhos das partículas de soluções PMMA serem diferentes, não existe uma diferença significativa dos resultados obtidos, tendo aproximadamente o mesmo comportamento entre estas soluções, tanto do ponto de vista estático como do ponto de vista dinâmico. Apesar de terem sido estudadas várias soluções apenas se estudou o comportamento do diâmetro de espalhamento das soluções de PMMA pois era a substância que continha partículas, para posteriormente estudar a sua deformação. As soluções das 'gomas' foram excluídas, por não conter partículas, como já foi referido anteriormente. Por outro lado, os resultados não mostram nenhum efeito do aumento da concentração da goma, que aumenta o comportamento não-Newtoniano do fluido. Neste contexto verifica-se que nas condições aqui estudadas, o movimento da gota é dominado por efeitos de molhabilidade e que a irreversibilidade depende essencialmente da dissipação ocorrida na linha de contacto, desempenhando as forças viscosas um papel secundário. Neste contexto, não é útil para estas condições usar as gomas para mimetizar o efeito não-Newtoniano do sangue.

Em relação à solução de surfactante, embora contenha partículas e seja usada no estudo da deformação das partículas, como a sua tensão superficial é baixa, não foi possível obter o comportamento do seu diâmetro de espalhamento. Por estes motivos, apenas são apresentados os gráficos do diâmetro de espalhamento de PMMA.



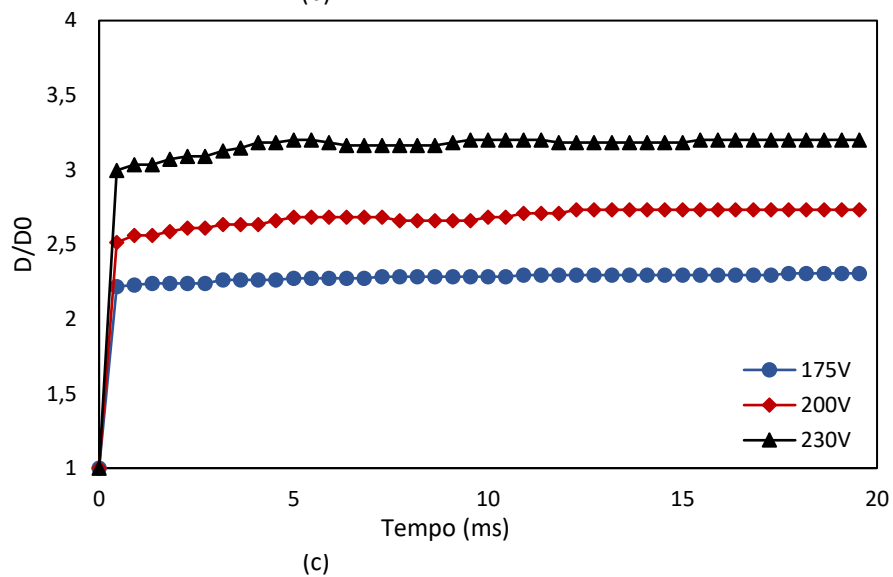
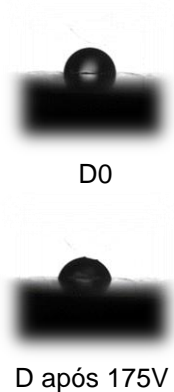
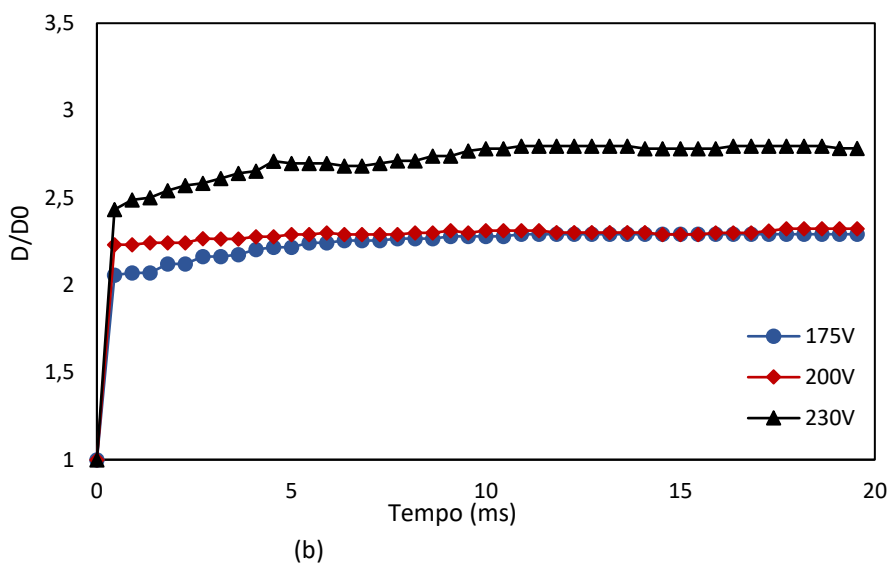
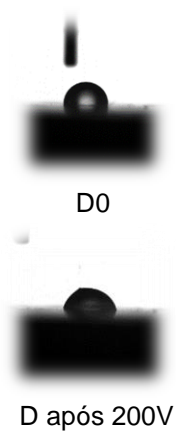
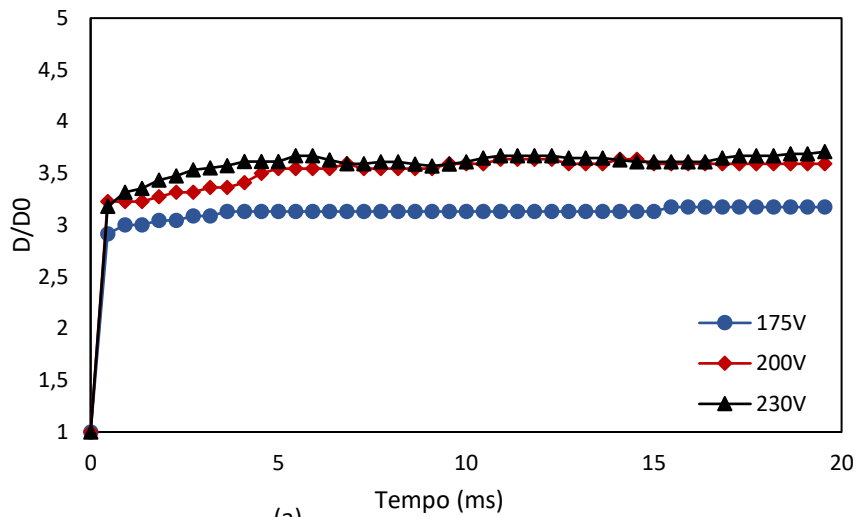


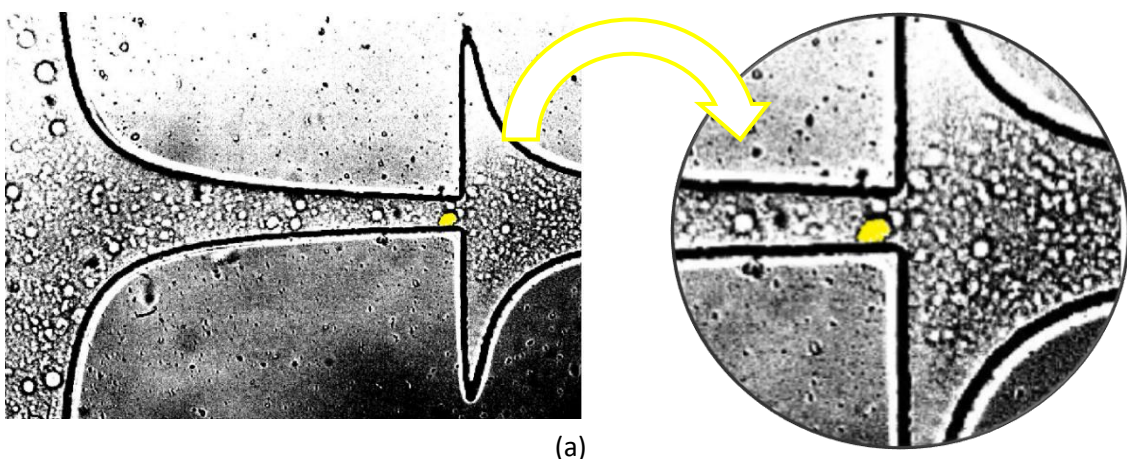
Figura 26: Representação das gotas e do diâmetro de espalhamento das soluções PMMA: (a) 6µm, (b) 10µm e (c) 20µm.

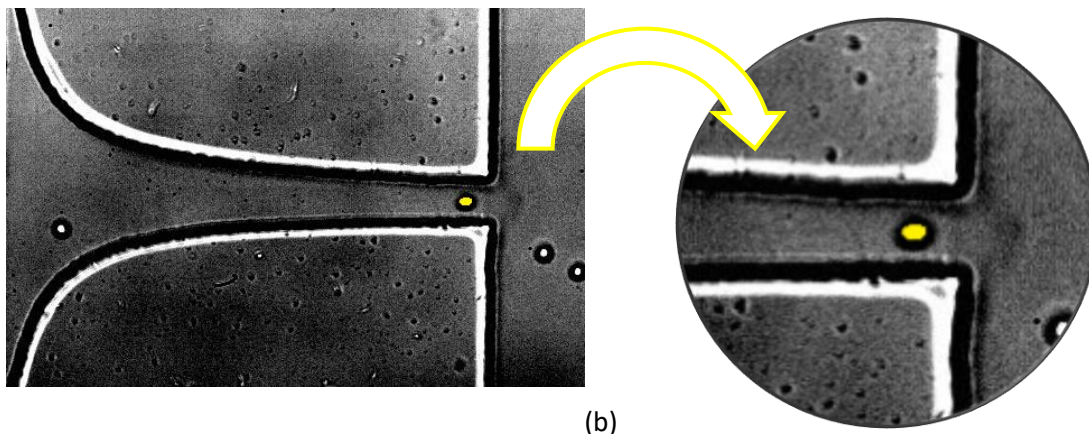
### 4.3. Comportamento dos fluidos biomiméticos em escoamento nos microcanais: Deformação das partículas

A deformação de partículas em microcanais é também um método importante para avaliar o fluido, como foi referido nos fundamentos teóricos, através da deformação de partículas do fluido é possível caracterizar se a partícula tem alguma anomalia, pois por exemplo variações de rigidez dos glóbulos vermelhos estão associadas a patologias diversas. Assim, de entre os fluidos análogos que foram caracterizados em termos da sua resposta à atuação eletrostática, e tendo em conta a análise dos resultados anteriores, selecionaram-se apenas 2 soluções, uma de partículas de PMMA e outra de surfactante que foram testadas nos microcanais com contração hiperbólica, como descrito no capítulo 3.

Para além de avaliar o Índice de Deformação definido de acordo com a equação (19) é importante acompanhar o processo de deformação das partículas ao longo do canal dado que as células reais também apresentam comportamentos de deformação diferentes dependendo do seu grau de rigidez que está habitualmente relacionado com uma patologia. Assim sendo, é importante caracterizar o seu comportamento ao nível da deformação, através do Índice de Deformação e da velocidade com que a partícula percorre o microcanal, e relacionar ambas as características.

Neste subcapítulo apenas se caracterizou as soluções com partículas de PMMA com 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro e as soluções de surfactante filtradas com um filtro de 20  $\mu\text{m}$ . Estas dimensões foram selecionadas por se aproximarem dos tamanhos das células reais (sendo o tamanho aproximado dos glóbulos vermelhos de 8  $\mu\text{m}$ ) e também porque devido à resolução da câmara e à dimensão dos canais, partículas mais pequenas eram difíceis de visualizar, enquanto que partículas maiores conduziam a entupimentos frequentes dos microcanais que inviabilizavam os ensaios.

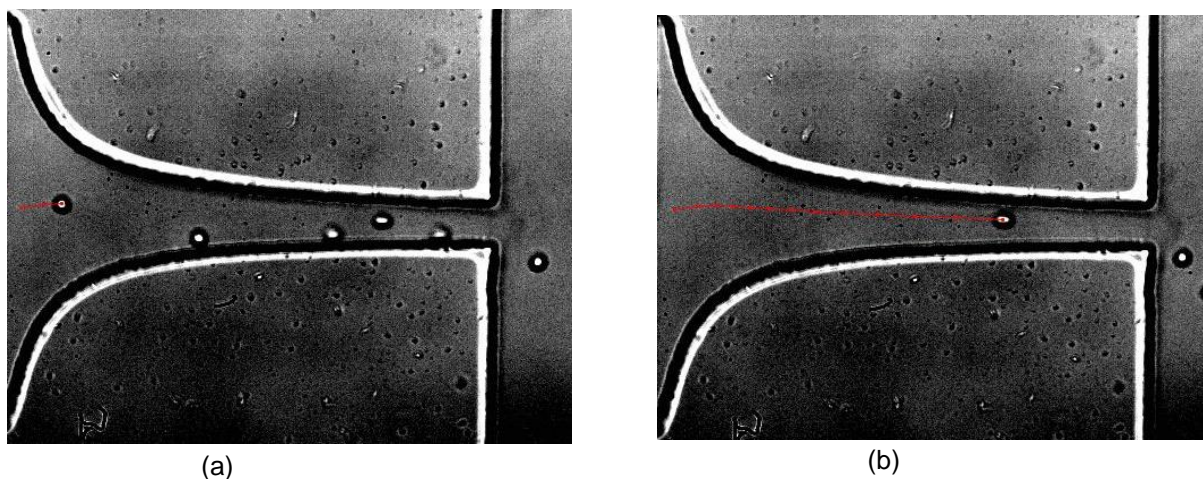


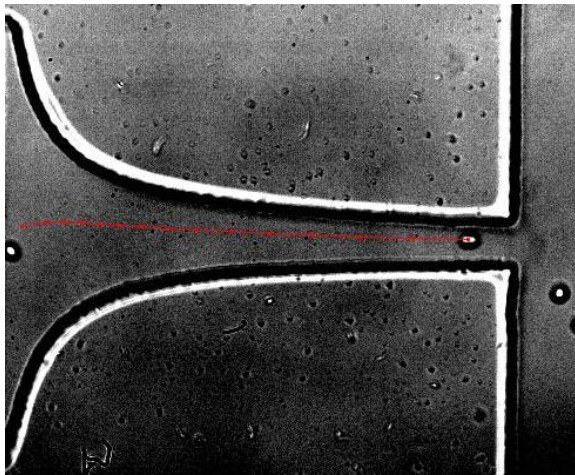


**Figura 27:** Forma das partículas nos microcanais, onde existe o estreitamento (ampliação), (a) Surfactante e (b) PMMA.

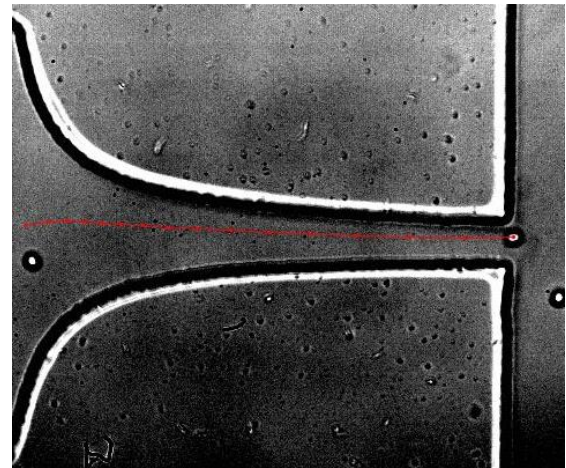
Pelas imagens ilustradas acima, observa-se que a partícula tem a sua deformação máxima no microcanal, onde este apresenta o máximo estreitamento. Também é notório que as partículas de PMMA são mais rígidas que as de surfactante. As imagens que se seguem são ilustrativas dessa rigidez, pois as partículas de PMMA têm um melhor contorno e têm praticamente a mesma forma (esféricas) ao longo do microcanal, ao contrário das partículas de surfactante, que apenas são parcialmente esféricas no início do microcanal, no entanto, quando atingem a zona hiperbólica tendem a alongar segundo o eixo do escoamento.

Com base nos gráficos referentes ao índice de deformação é notório que a deformação é mais reproduzível nas partículas de PMMA como se pode observar pelas partículas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 onde apresentam um índice de deformação máximo na zona de maior estreitamento dos canais. Como era de prever a velocidade é máxima no estreito do microcanal (área mínima), pois como o caudal é constante, então a velocidade é máxima, como comprovam as imagens seguintes (Figuras 28 e 29), pois existe um maior deslocamento no estreito do microcanal nesse intervalo de tempo definido em cada imagem. Posto isto, o índice de deformação é máximo quando a velocidade é máxima, ou seja, no estreito do microcanal. Recorrendo aos gráficos, é particularmente notório a boa reprodutibilidade dos ensaios e que o pico da deformação coincide com a velocidade máxima da partícula.



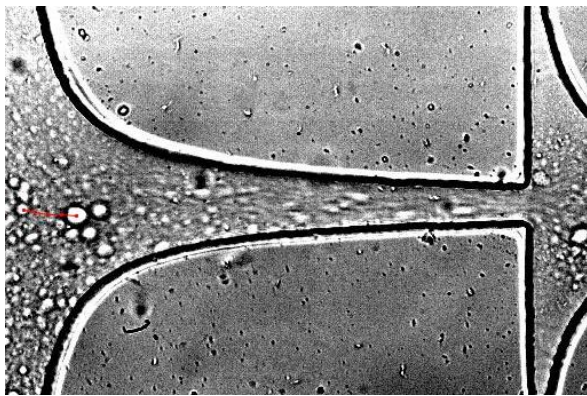


(c)

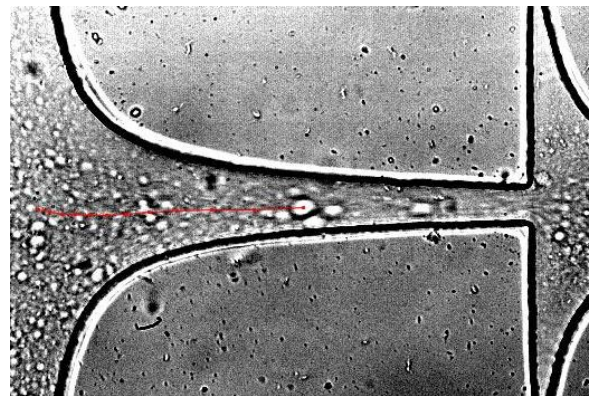


(d)

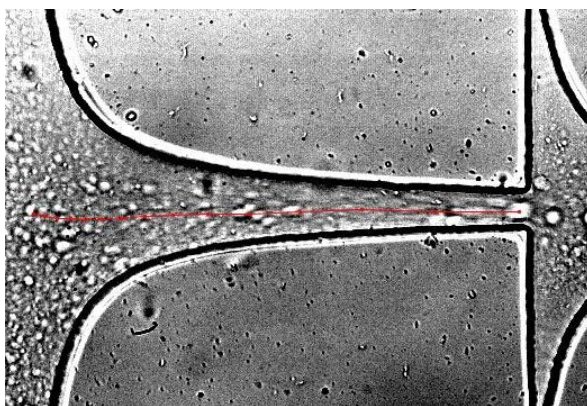
**Figura 28:** Deslocamento de uma partícula PMMA em diferentes tempos: (a) 0,70 s, (b) 1,03 s, (c) 1,10 s e (d) 1,13 s.



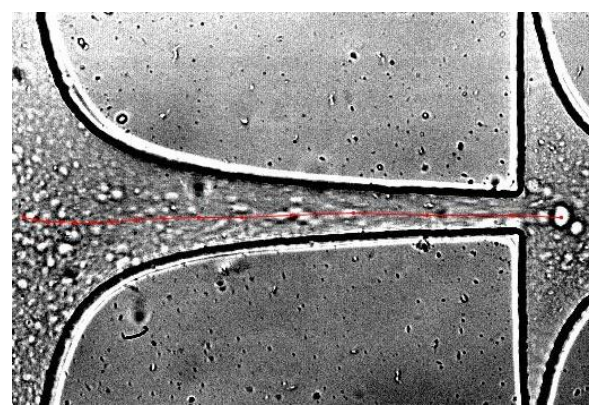
(a)



(b)

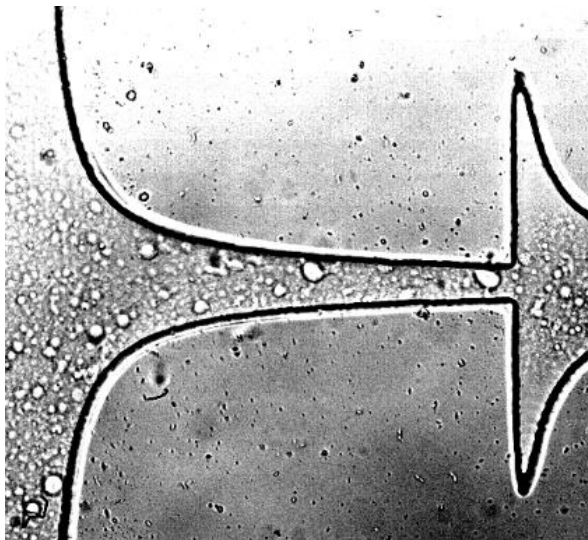


(c)

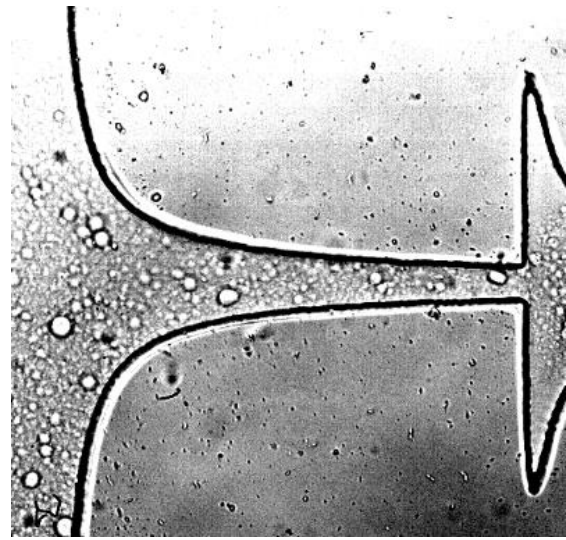


(d)

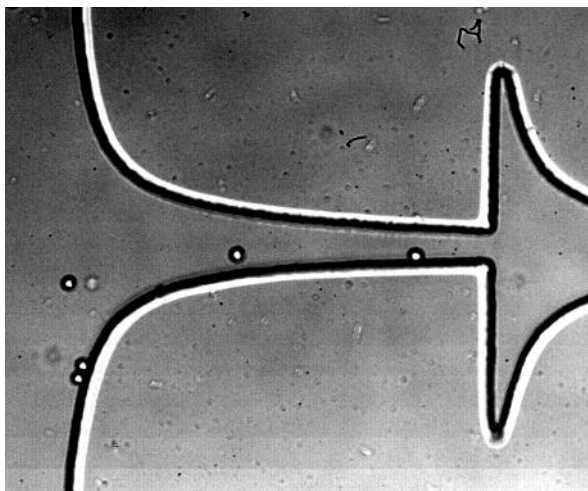
**Figura 29:** Deslocamento de uma partícula de surfactante em diferentes tempos: (a) 6,37 s, (b) 6,60 s, (c) 6,70 s e (d) 6,73 s.



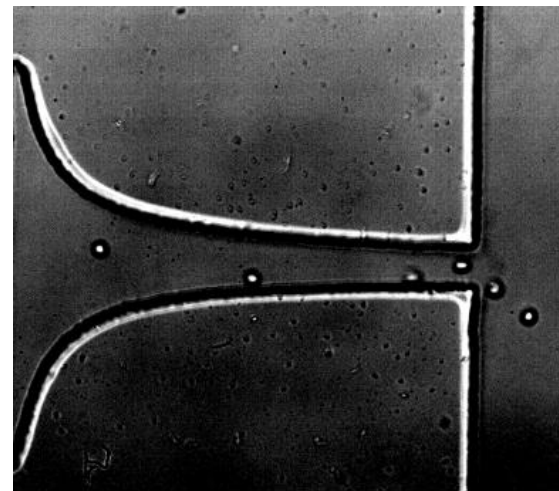
(a)



(b)



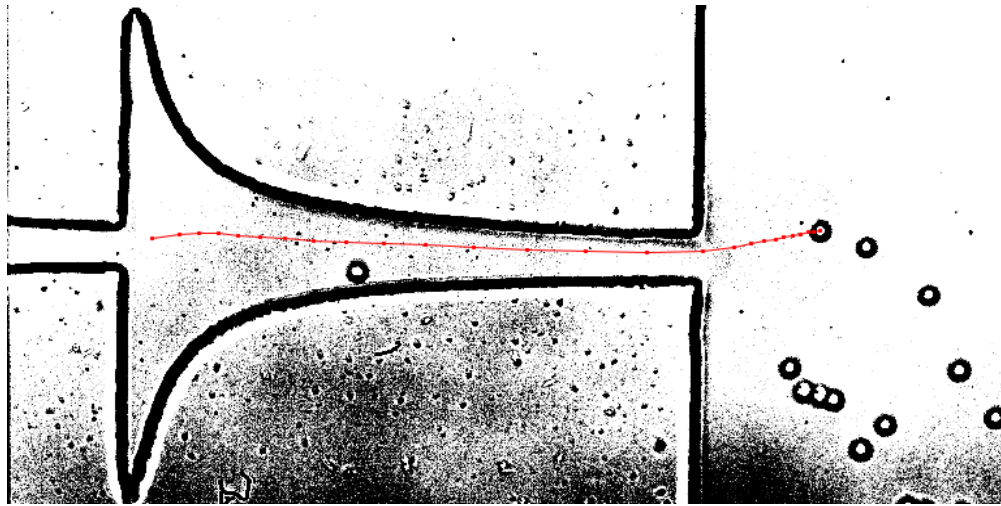
(c)



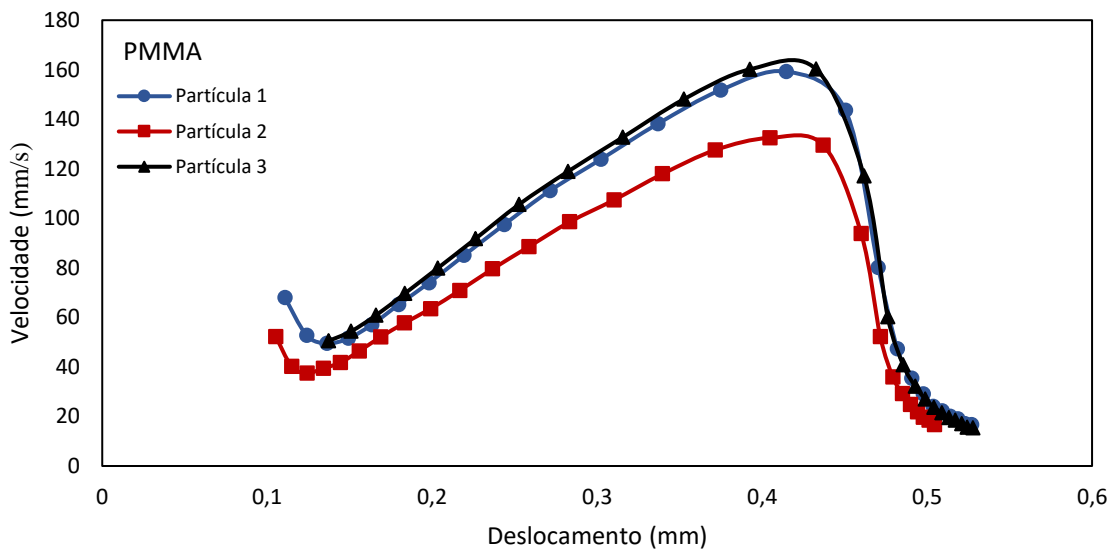
(d)

**Figura 30:** Imagens ampliadas dos microcanais ilustrativas da deformação, (a) surfactante e (b) PMMA.

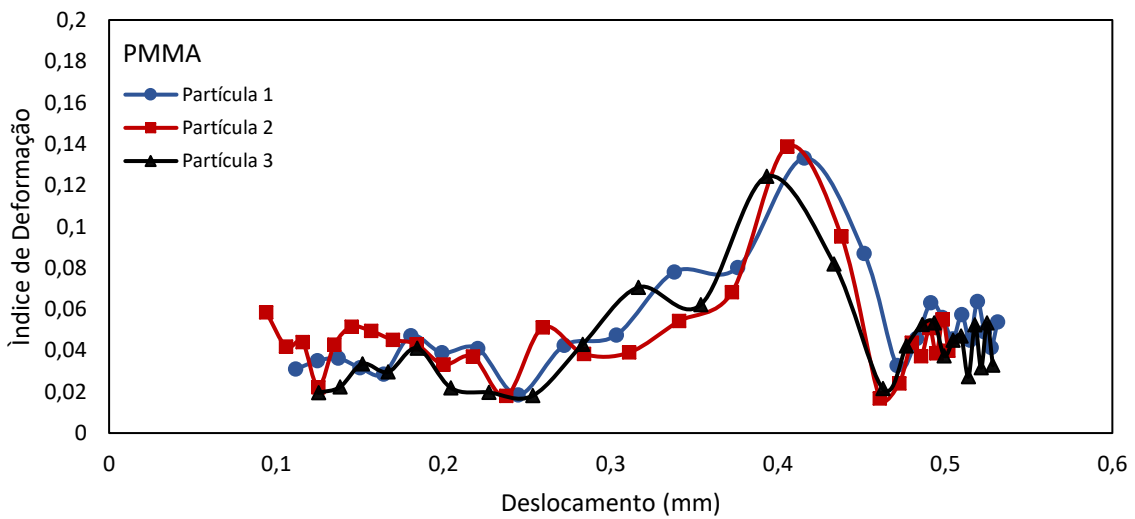
Como foi referido anteriormente, as partículas de surfactante são menos rígidas, por esse motivo têm um comportamento de deformação mais errático e menos reprodutível sendo também menos obvia a relação da deformação das partículas com a velocidade porque ao se deformarem também oferecem outro tipo de resistência ao escoamento principal, sendo mais difícil relacionar a deformação com a velocidade.



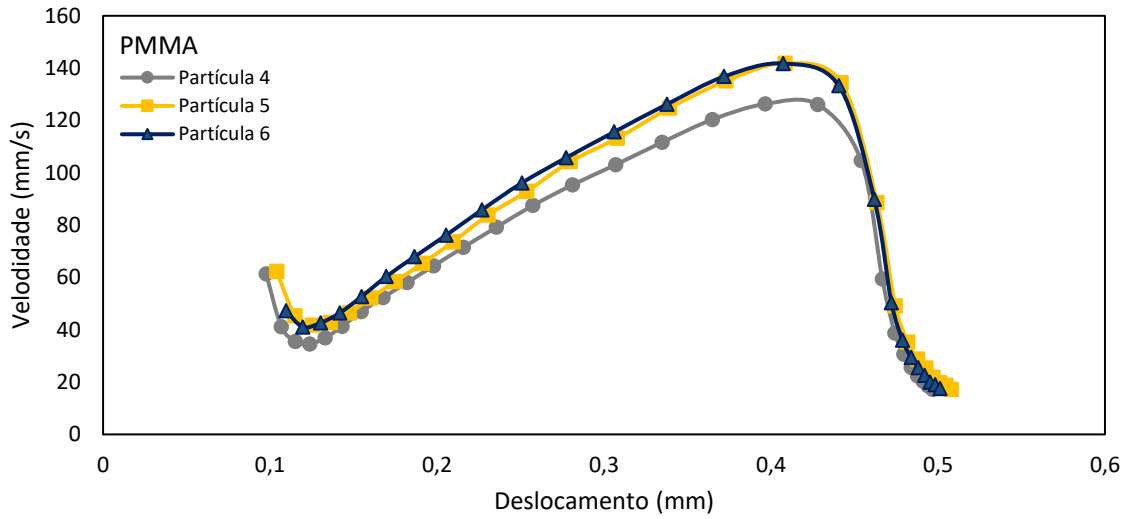
(a)



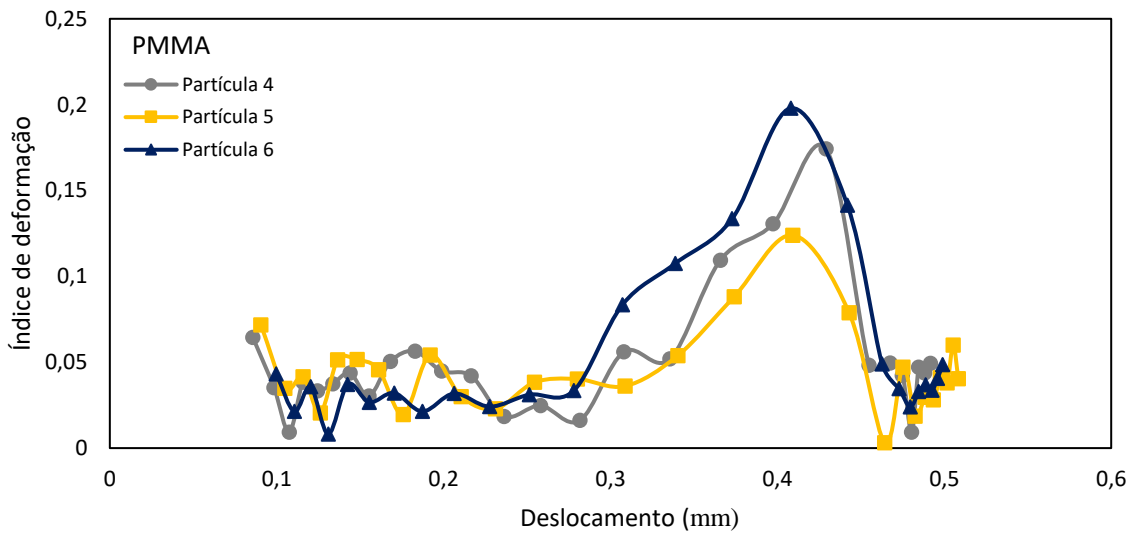
(b)



(c)

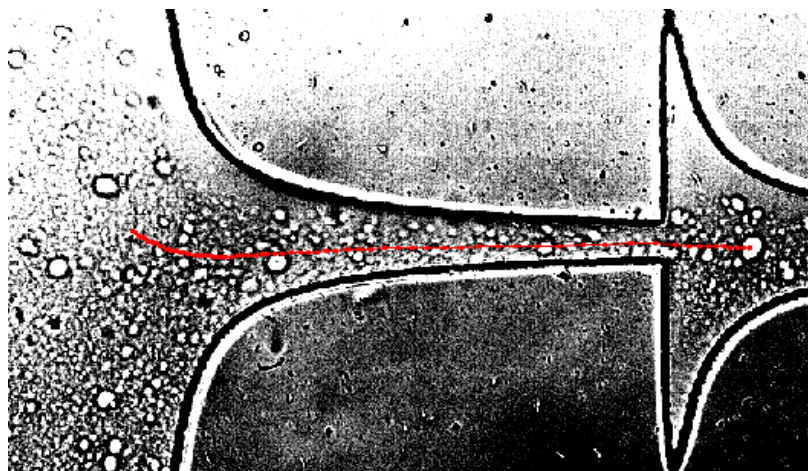


(d)

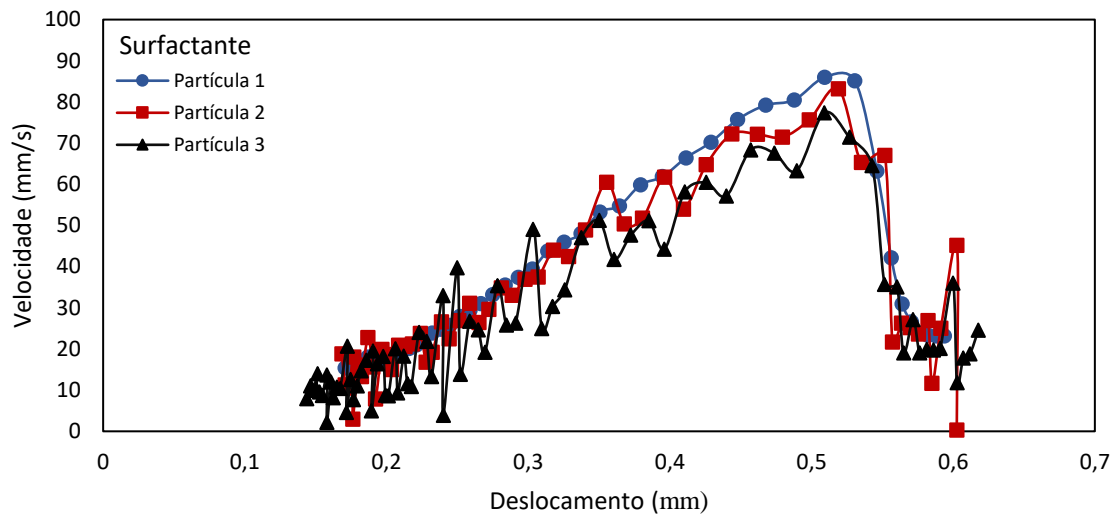


(e)

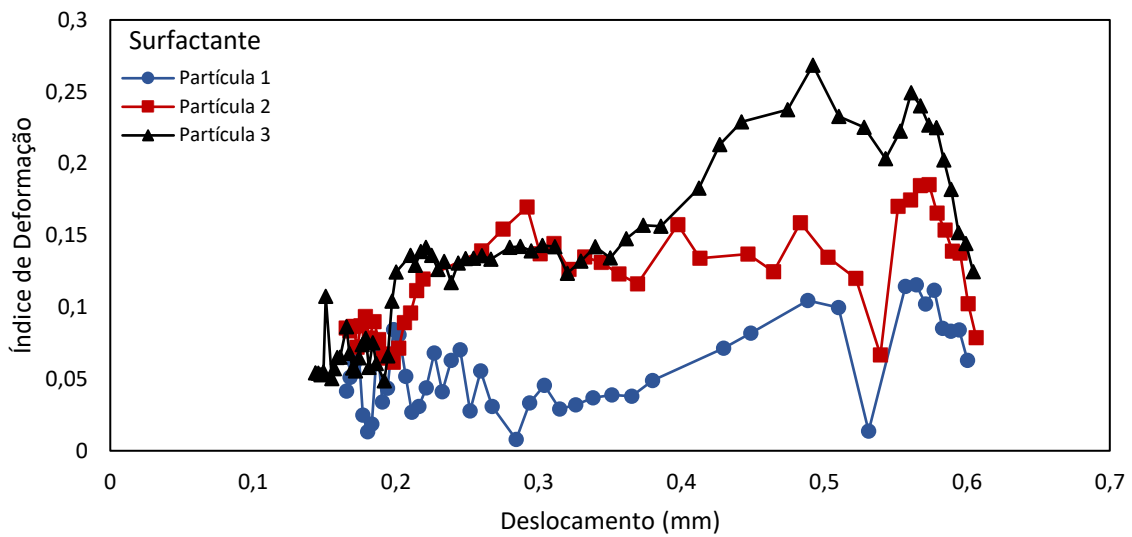
**Figura 31:** Deformação de partículas de PMMA, (a) percurso de uma partícula no microcanal (b) e (d) gráficos da velocidade de partículas em função do deslocamento ao longo do canal e (c) e (e) gráficos do índice de deformação de partículas, em função do deslocamento ao longo do canal.



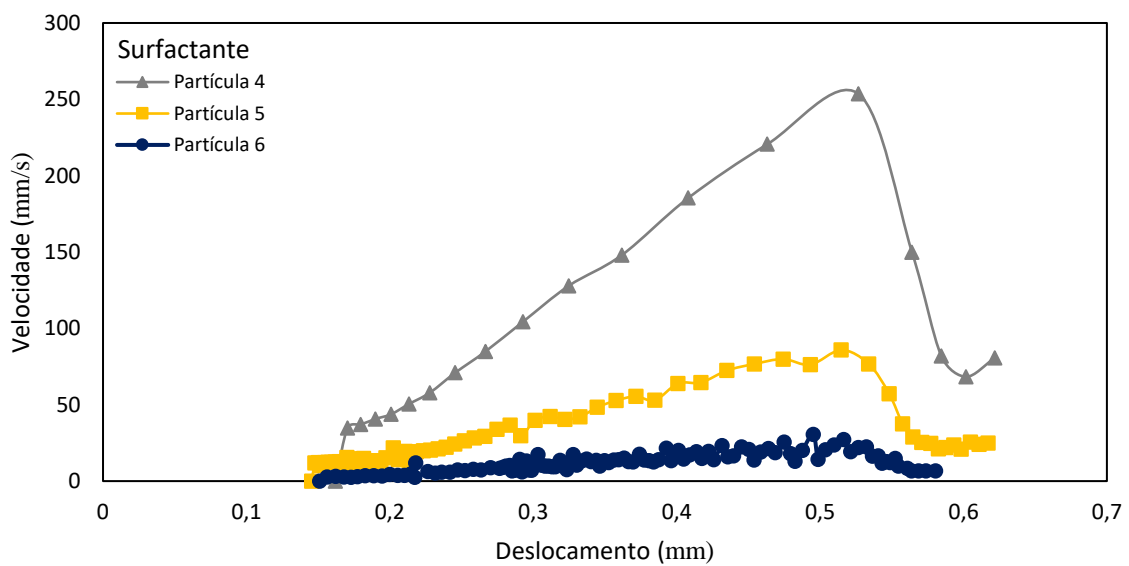
(a)



(b)

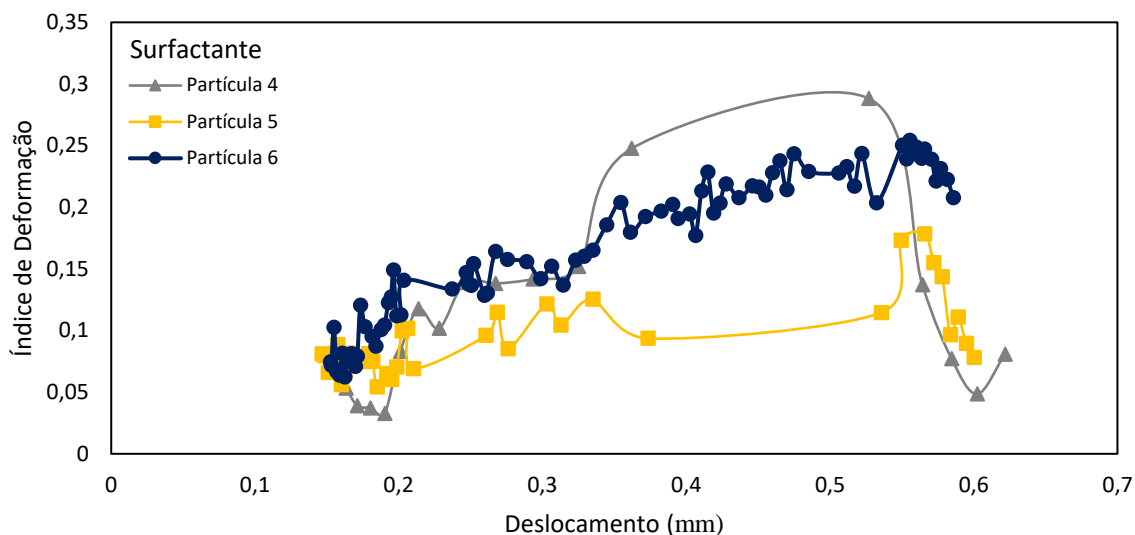


(c)



(d)

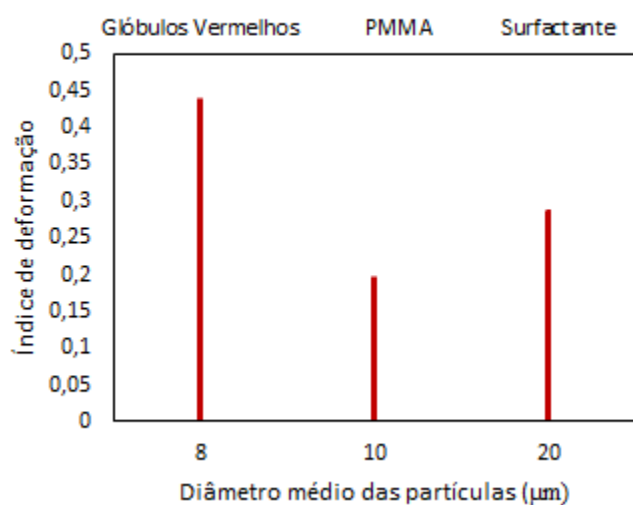




(e)

**Figura 32:** Deformação de partículas de Surfactante, (a) percurso de uma partícula no microcanal (b) e (d) gráficos da velocidade de partículas em função do deslocamento ao longo do canal e (c) e (e) gráficos do índice de deformação de partículas, em função do deslocamento ao longo do canal.

Após esta análise, é importante considerar a deformação das células reais e comparar estas com os fluidos em estudo, de modo, a verificar se a deformação dos fluidos em estudo é semelhante ou não às células reais. Nesse intuito, considerou-se o valor máximo da deformação de cada partícula, obtido nos ensaios como mostra o seguinte gráfico. O Índice de Deformação dos glóbulos vermelhos foi retirado de (Pinho, 2018). O índice de deformação das partículas miméticas é inferior ao das células saudáveis. Porém apesar de ser mais difícil seguir o seu movimento as partículas de surfactante aproximam-se mais das células reais em termos do Índice de Deformação, comparativamente às partículas de PMMA.



**Figura 33:** Índice de deformação máximo obtido em cada solução em estudo e das células reais (Pinho, 2018) com o diâmetro médio das partículas.

O diâmetro das partículas de surfactante medidas no tratamento de dados da deformação foi de 20  $\mu\text{m}$ , uma vez que, as restantes partículas existentes na solução eram pequenas para se conseguir medir. O diâmetro das partículas de PMMA foi de 10  $\mu\text{m}$  de acordo com o fornecedor. O índice de deformação das células reais encontra-se entre os valores 0,4 e 0,6, no entanto, estes valores foram retirados da literatura Pinho (2018), ou seja, os ensaios efetuados nesta dissertação com os fluidos biomiméticos não foram realizados nas mesmas condições. Por esse motivo, existe ainda alguma discrepância nos índices de deformação dos fluidos em estudo comparado ao das células reais, uma vez que, possivelmente o caudal utilizado foi diferente e consequentemente a velocidade das partículas também, o que leva a diferentes deformações, pois maiores velocidades provocam maiores deformações.

Como referido anteriormente, as partículas de PMMA apresentam um comportamento mais rígido, sendo capaz de deformar menos que as partículas de surfactante e menos que os glóbulos vermelhos reais. Além disso, olhando para um cenário mais amplo, as partículas de surfactante estão mais próximas de replicar a deformabilidade das células reais do que as de PMMA. Estas soluções em estudo, embora não tenham o índice de deformação muito próximo das células reais, pelo trabalho desenvolvido, pode-se considerar que no caso das partículas de surfactante como são partículas semirrígidas, devem continuar a ser objeto de estudo, uma vez que, são as que se aproximam mais das células reais (glóbulos vermelhos saudáveis). Contudo, as partículas do surfactante são mais difíceis de correlacionar em termos do escoamento no microcanal.

## 5. Conclusões e proposta para trabalhos futuros

Esta dissertação teve como principal objetivo avaliar o comportamento hidrodinâmico de diversos fluidos biomiméticos (análogos do sangue) e caracterizar o comportamento de deformação das partículas que os constituem por forma a avaliar a sua capacidade de mimetizar o comportamento das células reais. Pretende ainda avaliar-se a viabilidade de manusear estes fluidos nos dispositivos microfluídicos que estão a ser desenvolvidos, avaliando a sua resposta dinâmica à atuação eletrostática.

A resposta eletrostática foi avaliada em termos da variação dos ângulos de contacto e da evolução temporal dos diâmetros de espalhamento das gotas dos fluidos testados, sob atuação electroestática.

Os fluidos biomiméticos (análogos do sangue) foram caracterizados em termos da deformação e movimento das partículas que os constituem, por forma a avaliar a sua capacidade de mimetismo do comportamento das células reais, nomeadamente dos glóbulos vermelhos, cuja deformação está fortemente relacionada, na literatura, com diversas patologias. Esta avaliação foi realizada em escoamento contínuo dos fluidos testados, em microcanais com contrações hiperbólicas.

### 5.1. Conclusões

Neste trabalho os avaliou-se o comportamento de 3 tipos de fluidos biomiméticos, nomeadamente soluções aquosas de goma xantana, para mimetizar a viscosidade não-Newtoniana do sangue, soluções aquosas contendo partículas esféricas de um polímero (PMMA - poli(metacrilato de metila ou *poly(methyl methacrylate)* na nomenclatura inglesa) e soluções com um surfactante que, em contacto com a água precipita, formando partículas semirrígidas que mimetizam as células (glóbulos vermelhos, cuja deformação está fortemente relacionada com diversas patologias).

Em termos da resposta à atuação eletrostática, verificou-se que o aumento da concentração da goma e ou das partículas, bem como a variação da dimensão das partículas não afetava a resposta dos fluidos à atuação eletrostática, nem em relação ao ângulo de contacto nem em relação ao diâmetro de espalhamento das gotas dos fluidos testados. Este resultado mostra que o movimento das gotas é controlado essencialmente pela molhabilidade e pela tensão superficial, desempenhando as forças viscosas um papel secundário.

Para todas as soluções o ângulo de contacto diminui com a aplicação da tensão aplicada, até atingir um valor de saturação. Observa-se também que a variabilidade do ângulo de contacto sem atuação é superior à registada com atuação. Todas as soluções apresentam uma resposta semelhante à atuação eletrostática, embora o erro nas medidas das soluções de PMMA seja menor.

O erro de medida do ângulo para cada solução inicialmente (para uma tensão igual a zero) é superior ao erro para tensões maiores, ou seja, com uma tensão maior existe uma diminuição da discrepância dos ângulos de contacto dos diversos ensaios. Nestes ensaios, novamente a solução de

surfactante é a que apresenta ângulos de contacto estáticos mais baixos. Sendo que a solução PMMA tem aproximadamente o mesmo comportamento que a solução das gomas, embora tenha associado um erro menor nas suas medições.

Em relação à solução de surfactante, observa-se um comportamento coerente para as diferentes soluções em todas as superfícies testadas, ou seja, os ângulos de contacto estáticos encontram-se na mesma gama de valores, sendo mais baixos comparativamente com as soluções de PMMA, devido à sua tensão superficial ser significativamente menor. Esta resposta reduzida traz consequências no espalhamento das gotas da solução de surfactante, que, nas condições de molhabilidade testadas, apresentaram um espalhamento mínimo sob atuação, independentemente dos valores de tensão aplicados. Neste contexto, será necessário otimizar a fobicidade das superfícies dos dispositivos microfluídicos a desenvolver, se se pretender usar este fluido em ensaios futuros.

Relativamente à caracterização da deformação das partículas dos fluidos análogos testados, analisaram-se apenas dois tipos de líquidos, nomeadamente a solução com partículas de PMMA com 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro e a solução de surfactante filtrada com um filtro de 20  $\mu\text{m}$ . Estas soluções foram selecionadas em virtude da sua analogia com as dimensões das células reais a mimetizar e para minimizar os problemas de entupimento dos canais, que ocorreram com o uso de partículas maiores e que inviabilizaram o uso de diversos canais. A deformação das partículas foi avaliada usando o Índice de Deformação que foi analisado em conjunto com a velocidade das partículas.

Os resultados obtidos mostram uma evolução aproximadamente linear do Índice de Deformação ao longo do microcanal, existindo um pico evidente no Índice de Deformação para a solução de PMMA que coincide com a contração máximo do microcanal, onde a velocidade da partícula é máxima. Em relação às partículas presentes na solução de surfactante, esta relação não é tão evidente existindo uma maior discrepância dos resultados. O Índice de Deformação, neste caso, não apresenta uma evolução tão linear como o obtido com as partículas de PMMA, existindo uma maior variação entre os valores medidos ao longo do microcanal, que se explica facilmente pelo facto destas partículas serem menos rígidas que as primeiras. Esta característica semirrígida das partículas formadas na solução de surfactante dificulta o seu transporte, mas aproxima-as mais dos valores de Índices de Deformação de glóbulos vermelhos saudáveis.

Em termos de recomendações gerais os fluidos biomiméticos formados pelas soluções aquosas com partículas de PMMA e com surfactante podem ser usados em estudos de deformação de células, como análogos do sangue, sendo viável a sua utilização em dispositivos microfluídicos controlados por atuação eletrostática. Porém as soluções de surfactante, embora mimetizem melhor as características de deformação das células reais, apresentam maiores limitações de manuseamento devido à sua fraca resposta à atuação eletrostática, requerendo um tratamento adicional da superfície de contacto do dispositivo que a torne mais fóbica à solução. As soluções com as partículas de PMMA, sendo rígidas, estão mais limitadas em termos da mimetização das células do sangue, podendo ser usadas em casos particulares onde as células apresentam maior rigidez, característica de algumas patologias.

O trabalho realizado contribuiu para um capítulo de livro em fase de submissão Moita *et al.* (2020) e para um artigo já publicado Moita *et al.* (2019).

## 5.2. Proposta para trabalhos futuros

O trabalho realizado nesta dissertação demonstra a importância do desenvolvimento de fluidos biomiméticos no desenvolvimento dos *lab-on-a-chip*. Para se usar esta tecnologia é importante considerar as propriedades de cada fluido. Nesse sentido, é fundamental caracterizar o fluido tanto ao nível estático como dinâmico e mesmo mecânico. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta dos fluidos testados, sob diversas condições. Porém, alguns parâmetros importantes na caracterização do escoamento, e.g. o número de Reynolds, deverão ser detalhados em pormenor em dispositivos mais adequados para o efeito, que permitam a avaliação precisa do caudal do escoamento. É ainda importante no futuro, melhorar a metodologia usada na caracterização da deformação por forma a quantificar as forças exercidas para poder desenhar dispositivos alternativos com geometrias mais simples. Finalmente é importante estender o desenvolvimento destes fluidos comparando-os e adaptando-os para mimetizarem outro tipo de fluidos biológicos de interesse para diagnóstico baseado na deformação das células, nomeadamente em casos particulares de deteção precoce de cancro.

## Referências

- Agbangla, G. C., Climent, É. and Bacchin, P. "Experimental investigation of pore clogging by microparticles: Evidence for a critical flux density of particle yielding arches and deposits." *Separation and Purification Technology* 101, no. 0 (2012): 42-8.
- Afonso, A. M. P. "Further developments on theoretical and computational rheology " PhD Thesis University of Porto, 2010.
- Aristizábal, S. L. (2012). Desenvolvimento de sistemas Lab-on-a-Chip para análises em biofísica celular. *Tese de Doutorado do Curso de Engenharia Elétrica, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo*.
- Barthlott, W., & Neinhuis, C. (1997). Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta*, 202(1), 1–8.
- Baskurt, O. K., Hardeman, M. R. and Rampling, M. W. *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*: IOS Press, 2007.
- Batchelor, G. K. (1967). An Introduction to Fluid Dynamics. *Book*.
- Beni, G., & Hackwood, S. (1981). Electro-wetting displays. *Applied Physics Letters*, 38(4), 207–209.
- Bento, D., Rodrigues, R., Faustino, V., Pinho, D., Fernandes, C., Pereira, A., Garcia, V., Miranda, J., and Lima, R. (2018). Deformation of Red Blood Cells, Air Bubbles, and Droplets in Microfluidic Devices: Flow Visualizations and Measurements. *Micromachines* 9, 151
- Bhagat, A. A. S., Bow, H., Hou, H. W., Tan, S. J., Han, J. and Lim, C. T. "Microfluidics for cell separation." *Medical & Biological Engineering & Computing* 48, no. 10 (2010): 999-1014.
- Bhushan, B., & Her, E. K. (2010). Fabrication of superhydrophobic surfaces with high and low adhesion inspired from rose petal. *Langmuir*, 26(11), 8207–8217.
- Bhushan, B. (2012). Bioinspired structured surfaces. *Langmuir*, 28(3), 1698–1714.
- Bisanda, E. T. N. (2000). Effect of alkali treatment on the adhesion characteristics of sisal fibres. *Applied Composite Materials*, 7(5-6), 331–339.
- Bormashenko, E., & Gendelman, O. (2014). A generalized electrowetting equation: Its derivation and consequences. *Chemical Physics Letters*, 599, 139–141.
- Bradley, E. L., Bernard, L., Thomas, P. and Brian, J. "Red blood cell sorting with a multi-bed microfabricated filter." *Journal of Micromechanics and Microengineering* 22, no. 2 (2012): 025009.
- Brassard, D., Malic, L., Normandin, F., Veres, T., & Tabrizian, M. (2008). Water-oil core-shell droplets for electrowetting-based digital microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 8(8), 1342–9.

- Bruus, H. *Theoretical microfluidics*: Oxford university press, Oxford, 2007.
- Bukowska, D. M., Derzsi, L., Tamborski, S., Szkulmowski, M., Garstecki, P. and Wojtkowski, M. "Assessment of the flow velocity of blood cells in a microfluidic device using joint spectral and time domain optical coherence tomography." *Optics Express* 21, no. 20 (2013): 24025-24038.
- Burkarter, E. (2010). Desenvolvimento de Superfícies Superhidrofóbicas de Politetrafluoretileno. *Tese de Doutorado Do Curso de Pós-Graduação Em Física Do Sector de Ciências Exatas Da Universidade Federal Do Paraná*, 138.
- Calejo, J., Pinho, D., García, V., Galindo-Rosales, F.J., Lima, R., Campo-Deaño, L., 2015. *Visualization of a PMMA blood analogue fluid flowing through a hyperbolic microchannel*. In proceedings of 6th Workshop on Green Chemistry and Nanotechnologies in Polymer Chemistry, pp: 94-95, Bragança, Portugal, ISBN: 978-972-745-188-3.
- Campo-Deaño, L., Dullens, R. P. A., Aarts, D. G. A. L., Pinho, F. T. and Oliveira, M. S. N. "Viscoelasticity of blood and viscoelastic blood analogues for use in polydymethylsiloxane in vitro models of the circulatory system." *Biomicrofluidics* 7, no. 3 (2013): 034102.
- Cassie, B. D., & Baxter, S. (1944). Wettability of porous surfaces. *Transactions of the Faraday Society*, (5), 546–551.
- Chen, X., Cui, D., Liu, C., Li, H. and Chen, J. "Continuous flow microfluidic device for cell separation, cell lysis and DNA purification." *Analytica Chimica Acta* 584, no. 2 (2007): 237-243.
- Chen, X., Cui, D. F., Liu, C. C. and Li, H. "Microfluidic chip for blood cell separation and collection based on crossflow filtration." *Sensors and Actuators B: Chemical* 130, no. 1 (2008): 216-221.
- Chen, L., & Bonaccorso, E. (2014). Electrowetting - From statics to dynamics. *Advances in Colloid and Interface Science*, 210, 2–12.
- Cheng, P., Li, D., Boruvka, L., Rotenberg, Y., & Neumann, A. W. (1990). Automation of axisymmetric drop shape analysis for measurements of interfacial tensions and contact angles. *Colloids and Surfaces*, 43(2), 151–167.
- Chevalliot, S., Kuiper, S., & Heikenfeld, J. (2012). Experimental Validation of the Invariance of Electrowetting Contact Angle Saturation. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 26(12-17), 1909–1930.
- Chim, J. C. R. M., 2015. Capillary biochip for point of use biomedical application, *MSc Thesis, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa*.
- Cho, S. K., Moon, H., & Kim, C. J. (2003). Creating, transporting, cutting, and merging liquid droplets by electrowetting-based actuation for digital microfluidic circuits. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 12(1), 70–80.

- Cooney, C. G., Chen, C. Y., Emerling, M. R., Nadim, A., & Sterling, J. D. (2006). Electrowetting droplet microfluidics on a single planar surface. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2(5), 435–446.
- Cross, S.E., Jin, Y.-S, Rao, J., Gimzewski, J.K. (2005) Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nature Nanotechnology Letters*, 2:780-783.
- Dance, A.: The making of a medical microchip. *Nature*, 545, 512-514 (2017).
- Davis, J. A. "Microfluidic separation of blood components through deterministic lateral displacement." Princeton University, 2008.
- Davoust, L., & Theisen, J. (2012). Evaporation rate of drop arrays within a digital microsystem. *Procedia Engineering*, 47, 1–4.
- Delcheva, I., Ralston, J., Beattie, D. A., & Krasowska, M. (2014). Static and dynamic wetting behaviour of ionic liquids. *Advances in Colloid and Interface Science*.
- Dubois, P., Marchand, G., Fouillet, Y., Berthier, J., Douki, T., Hassine, F., ... Vaultier, M. (2006). Ionic Liquid Droplet as e-Microreactor devices usually based on continuous-flow in microchan-, 78(14), 4909–4917.
- Eral, H. B., 'T Mannelje, D. J. C. M., & Oh, J. M. (2013). Contact angle hysteresis: A review of fundamentals and applications. *Colloid and Polymer Science*, 291(2), 247–260.
- Extrand, C. W. (1998). A thermodynamic model for contact angle hysteresis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 207(1), 11–19.
- Falconnet, D., Csucs, G., Michelle Grandin, H., & Textor, M. (2006). Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials*, 27(16), 3044–3063.
- Faustino, V., Pinho, D., Yaginuma, T., Calhelha, R., Ferreira, I. F. R. and Lima, R. "Extensional flow-based microfluidic device: deformability assessment of red blood cells in contact with tumor cells." *BioChip Journal* 8, no. 1 (2014a): 42-47.
- Faustino, V., Pinho, D., Yaginuma, T., Calhelha, R. C., Kim, G. M., Arana, S., Ferreira, I. C. F. R., Oliveira, M. S. N. and Lima, R. "Flow of Red Blood Cells Suspensions Through Hyperbolic Microcontractions." In *Visualization and Simulation of Complex Flows in Biomedical Engineering*, edited by Lima, R., Imai, Y., Ishikawa, T. and Oliveira, M. S. N., 151-163. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014b.
- Garza, M. M. (2011). Characterization of the adsorption of biomolecules in open electrowetting on dielectrics microfluidics-tool platform for bio-analytical applications. *Thesis for the PhD Degree in Philosophy, Institute of Microsystems Technology, Albert-Ludwig University, Germany*.
- Georgieva, K., Dijkstra, D. J., Fricke, H. and Willenbacher, N. "Clogging of microchannels by nanoparticles due to hetero-coagulation in elongational flow." *Journal of Colloid and Interface Science* 352, no. 2 (2010): 265-277.



- Gilmore, I. S., & Seah, M. P. (2000). Ion detection efficiency in SIMS: dependencies on energy, mass and composition for microchannel plates used in mass spectrometry, *202*, 217–229.
- Gossett, D., Weaver, W., Mach, A., Hur, S., Tse, H., Lee, W., Amini H., Carlo, D., 2010. Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397:3249-3267.
- Guttenberg, Z., Müller, H., Habermüller, H., Geisbauer, A., Pipper, J., Felbel, J., ... Wixforth, A. (2005). Planar chip device for PCR and hybridization with surface acoustic wave pump. *Lab on a Chip*, 5(3), 308.
- Haerberle, S., Mark, D., Von Stetten, F., & Zengerle, R. (2007). Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. *Microsystems and Nanotechnology*, 9783642182(9), 853–895.
- Harris, M. T., & Byers, C. H. (1989). An Advanced Technique for Interfacial Tension Measurement in Liquid-Liquid systems. *U.S. Department of Energy*.
- Herbertson, D. L., Evans, C. R., Shirtcliffe, N. J., McHale, G., & Newton, M. I. (2006). Electrowetting on superhydrophobic SU-8 patterned surfaces. *Sensors and Actuators, A: Physical*, 130-131(SPEC. ISS.), 189–193.
- Hetsroni, G., Mosyak, A., Pogrebnyak, E., & Yarin, L. P. (2005). Fluid flow in micro-channels, *48*, 1982–1998.
- Hong, L., & Pan, T. (2011). Surface microfluidics fabricated by photopatternable superhydrophobic nanocomposite. *Microfluidics and Nanofluidics*, 10(5), 991–997.
- Hou, H. W., Bhagat, A. A., Chong, A. G., Mao, P., Tan, K. S., Han, J. and Lim, C. T. "Deformability based cell margination--a simple microfluidic design for malaria-infected erythrocyte separation." *Lab on a Chip* 10, no. 19 (2010): 2605-13.
- Ji, H. M., Samper, V., Chen, Y., Heng, C. K., Lim, T. M. and Yobas, L. "Silicon-based microfilters for whole blood cell separation." *Biomedical Microdevices* 10, no. 2 (2008): 251-7.
- Jinlong, Z., Qiuquan, G., Mei, L. and Jun, Y. "A lab-on-CD prototype for high-speed blood separation." *Journal of Micromechanics and Microengineering* 18, no. 12 (2008): 125025.
- Johnson, R. E., & Dettre, R. H. (1964). Contact Angle Hysteresis. III. Study of an Idealized Heterogeneous Surface. *Journal of Physical Chemistry*, 68(7), 1744–1750.
- Jones, T. B. (2002). On the relationship of dielectrophoresis and electrowetting. *Langmuir*, 18(11), 4437–4443.
- Jones, T. B., Fowler, J. D., Chang, Y. S., & Kim, C. J. (2003). Frequency-based relationship of electrowetting and dielectrophoretic liquid microactuation. *Langmuir*, 19(18), 7646–7651.
- Kaler, K., Prakash, R., & Chugh, D. (2010). Liquid dielectrophoresis and surface microfluidics. *Biomicrofluidics*, 4(2), 1-17.

- Kang, K. H. (2002). How Electrostatic Fields Change Contact Angle in Electrowetting. *Society*, (10), 10318–10322.
- Kim, P., Jones, S. C., Hotchkiss, P. J., Haddock, J. N., Kippelen, B., Marder, S. R., & Perry, J. W. (2007). Phosphonic acid-modified barium titanate polymer nanocomposites with high permittivity and dielectric strength. *Advanced Materials*, 19(7), 1001–1005.
- Kim, M., Mo Jung, S., Lee, K. H., Jun Kang, Y. and Yang, S. "A microfluidic device for continuous white blood cell separation and lysis from whole blood." *Artificial organs* 34, no. 11 (2010): 996-1002.
- Kim, Y., Kim, K. and Park, Y. *Measurement Techniques for Red Blood Cell Deformability: Recent Advances Blood Cell - An Overview of Studies in Hematology*, 2012.
- Koch, K., & Barthlott, W. (2009). Superhydrophobic and superhydrophilic plant surfaces: an inspiration for biomimetic materials. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 367(1893), 1487–509.
- Kumar, V., & Sharma, N. N. (2012). SU-8 as hydrophobic and dielectric thin film in electrowetting-on-dielectric based microfluidics device. *Journal of Nanotechnology*, 2012.
- Lanotte, L. "Deformation and aggregation of red blood cells and vesicles flowing in microchannels." PhD Thesis, Università degli Studi di Napoli Federico II, 2013.
- Laurência, C. (2015). Caracterização da resposta dinâmica de gotas de biofluidos sob actuação electrostática. *Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica, Técnico Lisboa, Universidade de Lisboa*.
- Lee, S., Yim, Y., Ahn, K. and Lee, S. "Extensional flow-based assessment of red blood cell deformability using hyperbolic converging microchannel." *Biomedical Microdevices* 11, no. 5 (2009): 1021-1027.
- Lee, W. G., Kim, Y. G., Chung, B. G., Demirci, U., & Khademhosseini, A. (2010). Nano/Microfluidics for diagnosis of infectious diseases in developing countries. *Adv Drug Deliv Rev*, 62(4-5), 449–457.
- Li, W., & Amirfazli, A. (2007). Superhydrophobic surfaces: Adhesive strongly to water? *Advanced Materials*, 19(21), 3421–3422.
- Li, Y., Parkes, W., Haworth, L. I., Ross, A. W. S., Stevenson, J. T. M., & Walton, A. J. (2008). Room-temperature fabrication of anodic tantalum pentoxide for low-voltage electrowetting on dielectric (EWOD). *Journal of Microelectromechanical Systems*, 17(6), 1481–1488.
- Lin, Y. Y., Evans, R. D., Welch, E., Hsu, B. N., Madison, A. C., & Fair, R. B. (2010). Low voltage electrowetting-on-dielectric platform using multi-layer insulators. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 150(1), 465–470.
- Lippmann, G. (1875). Relation entre les phénomènes électriques et capillaires. *Annales de Chimie et de Physique*.

- Liu, H., Dharmatilleke, S., Maurya, D. K., & Tay, A. A. O. (2010). Dielectric materials for electrowetting-on-dielectric actuation. *Microsystem Technologies*, 16(3), 449–460.
- Manz, A., Widmers, H. M., & Graber, N. (1990). Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1(1-6), 244–248.
- Marmur, A. (2011). Measures of wettability of solid surfaces. *European Physical Journal: Special Topics*, 197(1), 193–198.
- Mata, F. (2016). Optimização da configuração de chips de *electrowetting* para transporte de gotas de biofluidos. *Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica, Técnico Lisboa, Universidade de Lisboa*.
- McHale, G. (2007). Cassie and Wenzel: Were they really so wrong? *Langmuir*, 23(15), 8200–8205.
- McHedlishvili, G. and Maeda, N. "Blood Flow Structure Related to Red Cell Flow: Determinant of Blood Fluidity in Narrow Microvessels." *The Japanese Journal of Physiology* 51, no. 1 (2001): 19-30.
- Melai, J., Salm, C., Smits, S., Visschers, J., & Schmitz, J. (2009). The electrical conduction and dielectric strength of SU-8. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 19(6), 065012.
- Michalski, M. C., & Saramago, B. J. (2000). Static and Dynamic Wetting Behavior of Triglycerides on Solid Surfaces. *Journal of Colloid Interface Sci*, 227(2), 380-389.
- Mohamed, H., Turner, J. N., & Caggana, M. (2007). Biochip for separating fetal cells from maternal circulation. *Journal of Chromatography A*, 1162(2), 187-192.
- Moita, A. S., Herrmann, D., & Moreira, A. L. N. (2015). Fluid dynamic and heat transfer processes between solid surfaces and non-Newtonian liquid droplets. *Applies Thermal Engineering*, 88, 33-46.
- Moita, A. S., Laurência, C., Ramos, J. A., Prazeres, D. M. F., & Moreira, A. L. N. (2016). Dynamics of Droplets of Biological Fluids on Smooth Superhydrophobic Surfaces under Electrostatic Actuation. *Journal of Bionic Engineering*, 13(2), 220–234.
- Moita, A. S., Caldeira, C., Jacinto, F., Lima, R., Vega, E. J., Moreira, A.L.N. (2019) Cell deformability studies for clinical diagnostics: tests with blood analogue fluids using a drop based microfluidic device. 12th International Conference on Biomedical Electronics and Devices – Volume 1: BIODEVICES 2019, 00. 99-107, ISBN: 978-989-758-353-7, pp.99-106, 22-24 February, Prague, Czech Republic
- Moita, A.S., Caldeira, C., Golçalves, I., Lima, R., Veja, E. J., Moreira, A. L. N. (2020) Analogue fluids for cell deformability studies in microfluidic devices. *Biomedical Engineering Systems and Technologies*. Series: Communications in Computer and Information Science, Springer International Publishing AG, part of Springer Nature (Submitted)

- Mugele, F., & Baret, J.-C. (2005). Electrowetting: from basics to applications. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 17(28), R705–R774.
- Musielak, M. "Red blood cell-deformability measurement: review of techniques." *Clin Hemorheol Microcirc* 42, no. 1 (2009): 47-64.
- Nguyen, N.-T. and Wereley, S. T. *Fundamentals and applications of microfluidics*: Artech House, 2002.
- Novo, P. (2016). High spatial and temporal resolution cell manipulation techniques in microchannels.
- Oliveira, M. S. N., Alves, M. A., Pinho, F. T. and McKinley, G. H. "Viscous flow through microfabricated hyperbolic contractions." *Experiments in Fluids* 43, no. 2 (2007): 437-451.
- Onda, T., Shibuichi, S., Satoh, N., & Tsujii, K. (1996). Super-water-repellent fractal surfaces. *Langmuir*, 12(9), 2125–2127.
- Orejon, D., Sefiane, K., & Shanahan, M. E. R. (2013). Young-Lippmann equation revisited for nano-suspensions. *Applied Physics Letters*, 102(20), 1–4.
- Paik, P. Y., Pamula, V. K., Pollack, M. G., & Chakrabarty, K. (2005). Coplanar Digital Microfluidics Using Standard Printed Circuit Board Processes. *Transport*, 566–568.
- Park, J. K., Lee, S. J., & Kang, K. H. (2010). Fast and reliable droplet transport on single-plate electrowetting on dielectrics using nonfloating switching method. *Biomicrofluidics*, 4(2), 1–8.
- Pinho, D., Yaginuma, T. and Lima, R. "A microfluidic device for partial cell separation and deformability assessment." *BioChip Journal* 7, no. 4 (2013): 367-374.
- Pinho, D., Bento, D., Rodrigues, R., Fernandes, C. S., Garcia, V., Lima, R., 2014. *Blood flow in a bifurcation and confluence microchannel: the effect of the cell-free layer in the velocity profiles*. In 7th World Congress of Biomechanics. Boston.
- Pinho, D. M. D.: Blood rheology and red blood cell migration in microchannel flow. PhD Thesis. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2018.
- Pollack, M. G., Shenderov, A. D., & Fair, R. B. (2002). Electrowetting-based actuation of droplets for integrated microfluidics. *Lab on a Chip*, 2(2), 96–101.
- Pollack, M. G., Pamula, V. K., Srinivasan, V., & Eckhardt, A. E. (2011). Applications of electrowettingbased digital microfluidics in clinical. *Expert review of molecular diagnostics*, 11(4), 393–407.
- Quilliet, C., & Berge, B. (2001). Electrowetting: A recent outbreak. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 6(1), 34–39.
- Quinn, A., Sedev, R., & Ralston, J. (2003). Influence of the Electrical Double Layer in Electrowetting. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(5), 1163–1169.

- Raccurt, O., Berthier, J., Clementz, P., Borella, M., & Plissonnier, M. (2007). On the influence of surfactants in electrowetting systems. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 17(11), 2217–2223.
- Ramos, J. A. (2014). Estudo experimental para transporte de microgotas por actuação electrostática Bioengenharia e Nanossistemas. *Dissertação de Mestrado em Bioengenharia E Nanossistemas, Técnico Lisboa, Universidade de Lisboa*.
- Restolho, J., Mata, J. L., & Saramago, B. (2009). Electrowetting of Ionic Liquids: Contact Angle Saturation and Irreversibility. *Journal of Physical Chemistry C*, 113(21), 9321–9327.
- Rodrigues, R. O., Pinho, D., Faustino, V. and Lima, R. "A simple microfluidic device for the deformability assessment of blood cells in a continuous flow." *Biomedical Microdevices* 17, no. 6 (2015): 108.
- Rodrigues, R. O., Bañobre-López, M., Gallo, J., Tavares, P. B., Silva, A. M. T., Lima, R. and Gomes, H. T. "Haemocompatibility of iron oxide nanoparticles synthesized for theranostic applications: a high-sensitivity microfluidic tool." *Journal of Nanoparticle Research* 18, no. 7 (2016): 194.
- Rokade, R., Bhosale, S. Y., & Kamble, D. A. (2014). Analysis of Triangular Microchannel under Forced Convection Heat Transfer Condition, 4(9), 601–603.
- Sabo, A., Jakovljevic, V., Stanulovic, M., Lepsanovic, L. and Pejin, D. "Red blood cell deformability in diabetes mellitus: effect of phytomenadione." *International journal of clinical pharmacology therapy and toxicology* 31, no. 1 (1993): 1-5.
- Sammarco, T. S., & Burns, M. a. (2000). Heat-transfer analysis of microfabricated thermocapillary pumping and reaction devices. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 10(1), 42–55.
- Sampaio, D., Lopes, D. and Semiao, V. "Horse and dog blood flows in PDMS rectangular microchannels: Experimental characterization of the plasma layer under different flow conditions." *Experimental Thermal and Fluid Science* 68, (2015): 205-215.
- Santini, M., & Guilizzoni, M. (2014). 3D X-ray Micro Computed Tomography on Multiphase Drop Interfaces: From Biomimetic to Functional Applications. *Colloids and Interface Science Communications*, 1, 14–17.
- Secomb, T. W. "Blood Flow in the Microcirculation." *Annual Review of Fluid Mechanics* 49, no. 1 (2017): 443-461.
- Sedev, R. (2011). Electrowetting: Electrocapillarity, saturation, and dynamics. *European Physical Journal: Special Topics*, 197(1), 307–319.
- Shamai, R., Andelman, D., Berge, B., & Hayes, R. (2008). Water, electricity, and between... On electrowetting and its applications. *Soft Matter*, 4(1), 38–45.
- Sharp, K. V., & Adrian, R. J. (2004). Transition from Laminar to Turbulent Flow in Liquid Filled Microtubes. *Experiments in Fluids*, 36, 741-747.

- Shevkoplyas, S. S., Yoshida, T., Munn, L. L. and Bitensky, M. W. "Biomimetic Autoseparation of Leukocytes from Whole Blood in a Microfluidic Device." *Analytical chemistry* 77, no. 3 (2005): 933-937.
- Shields I. V., Reyes, C. D., López, G. P., 2015. Microfluidic cell sorting: A review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation, *Lab on a Chip*, 16:1230–1249.
- Shiga, T., Maeda, N. and Kon, K. "Erythrocyte rheology." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 10, no. 1 (1990): 9-48.
- Siddhartha, T., Kumar, Y. V. B. V., Amit, P., Suhas, S. J. and Amit, A. "Passive blood plasma separation at the microscale: a review of design principles and microdevices." *Journal of Micromechanics and Microengineering* 25, no. 8 (2015): 083001.
- Singh, E., Thomas, A. V., Mukherjee, R., Mi, X., Houshmand, F., Peles, Y., ... Koratkar, N. (2013). Graphene drape minimizes the pinning and hysteresis of water drops on nanotextured rough surfaces. *ACS Nano*, 7(4), 3512–3521.
- Smyth, K., Paxson, A., Kwon, H., Deng, T., & Varanasi, K. K. (2015). Dynamic wetting on superhydrophobic surfaces: Droplet impact and wetting hysteresis. *Institute of Electrical and Electronics Engineers*.
- Srinivasan, V., Pamula, V. K., & Fair, R. B. (2004). An integrated digital microfluidic lab-on-a-chip for clinical diagnostics on human physiological fluids. *Lab on a Chip*, 4(4), 310–315.
- Sondag-Huethorst, J., & Fokkink, L. (1994). Potential-dependent wetting of electroactive ferrocene-terminated alkanethiolate monolayers on gold. *Langmuir*, (18), 4380–4387.
- Sousa, P. "Entry Flow of Viscoelastic Fluids at Macro- and Micro-Scale." PhD Thesis University of Porto, 2010.
- Spohr, E. (1999). Molecular simulation of the electrochemical double layer. *Electrochimica Acta*, 44(11), 1697–1705.
- Squires, T. M., & Quake, S. R. (2005). Microfluidics: fluid physics at the nanoliter scale. *Rev Mod Phys*, 77(3), 977-1026.
- Suwanarusk, R., Cooke, B. M., Dondorp, A. M., Silamut, K., Sattabongkot, J., White, N. J. and Udomsangpetch, R. "The deformability of red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum and P. vivax." *The Journal of infectious diseases* 189, no. 2 (2004): 190-94.
- Tae Goo, K., Yong-Jin, Y., Hongmiao, J., Pei Yi, L. and Yu, C. "A continuous flow micro filtration device for plasma/blood separation using submicron vertical pillar gap structures." *Journal of Micromechanics and Microengineering* 24, no. 8 (2014): 087001.
- Takahashi, K., Hattori, A., Suzuki, I., Ichiki, T., 2004. Non-destructive on-chip cell sorting system with real-time microscopic image processing, *Journal of Nanobiotechnology*, 2:1-8.

- Taylor, J. A., & Krupenkin, T. (2011). to high-power energy harvesting. *Nature Communications*, 2(May), 447–448.
- Torkkeli, a., Saarihahti, J., Haara, a., Harma, H., Soukka, T., & Tolonen, P. (2001). Electrostatic transportation of water droplets on superhydrophobic surfaces. *Technical Digest. MEMS 2001. 14th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (Cat. No.01CH37090)*, 00, 475–478.
- Tse, H. T. K., Gossett, D. R., Moon, Y. S., Masaeli, M., Sohsman, M., Ying, Y., Mislick, K., Adam, R. P., Rao, J. Di Carlo, D., 2013. Quantitative diagnosis of malignant pleural effusions by single-cell mechanophenotyping, *Science Translational Medicine*, 5(212): 212ra163.
- Urdea, M., Penny, L. a, Olmsted, S. S., Giovanni, M. Y., Kaspar, P., Shepherd, A., ... Hay Burgess, D. C. (2006). Requirements for high impact diagnostics in the developing world. *Nature*, 444 Suppl, 73–79.
- Varanasi, K. K., Paxson, A., Smyth, K., Kwon, H., & Deng, T. (2010). Droplet impingement and wetting hysteresis on textured hydrophobic surfaces. *In: Proceedings of 14th International Heat Transfer Conference, IHTC-14, Washington DC, USA*, 1–10.
- Vergauwe, N., Witters, D., Ceyskens, F., Vermeir, S., Verbruggen, B., Puers, R., & Lammertyn, J. (2011). A versatile electrowetting-based digital microfluidic platform for quantitative homogeneous and heterogeneous bio-assays. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 21, 054026.
- Vieira, D. Mata, F., Moita, A.S., Moreira, A.L.N., 2017. Microfluidic Prototype of a Lab-on-Chip Device for Lung Cancer Diagnostics. *Proceedings of the 10th International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies - Volume 1: BIODEVICES*, 63-68, 2017, Porto, Portugal, 21-13 February 2017. DOI: 10.5220/0006252700630068, ISBN: 978-989-758-216-5.
- Virgilio, V. Di. (2015). Contactless Electrowetting. *Thesis for the PhD Degree in Electronic Engineering Program, Universitat Politècnica de Catalunya*.
- Wenzel, R. N. (1936). Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry (Washington, D. C.)*, 28, 988–994.
- White, F. M. *Fluid Mechanics*, Edited by Edition, F.: McGraw-Hill Higher Education 1998.
- White, F. M. (2009). *Fluid Mechanics* (7th ed.). New York: McGraw-Hill.
- Wolansky, G., & Marmur, A. (1999). Apparent contact angles on rough surfaces: The Wenzel equation revisited. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 156(1-3), 381–388.

- Xiu, Y., Zhu, L., Hess, D. W., & Wong, C. P. (2008). Relationship between work of adhesion and contact angle hysteresis on superhydrophobic surfaces. *Journal of Physical Chemistry C*, 112(30), 11403–11407.
- Yager, P., Edwards, T., Fu, E., Helton, K., Nelson, K., Tam, M. R., & Weigl, B. H. (2006). Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature*, 442(7101), 412–418.
- Yager, P., Domingo, G. J., & Gerdes, J. (2008). Point-of-care diagnostics for global health. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 10, 107–44.
- Yaginuma, T., Oliveira, M. S. N., Lima, R., Ishikawa, T. and Yamaguchi, T. "Human red blood cell behavior under homogeneous extensional flow in a hyperbolic-shaped microchannel." *Biomicrofluidics* 7, no. 5 (2013): 054110.
- Yang, X., Yang, J. M., Tai, Y.-C. and Ho, C.-M. "Micromachined membrane particle filters." *Sensors and Actuators A: Physical* 73, no. 1–2 (1999): 184-191.
- Yaylali, Y. T., Susam, I., Demir, E., Bor-Kucukatay, M., Uludag, B., Kilic-Toprak, E., Erken, G. and Dursunoglu, D. "Increased red blood cell deformability and decreased aggregation as potential adaptive mechanisms in the slow coronary flow phenomenon." *Coronary Artery Disease* 24, no. 1 (2013): 11-5
- Yi, U.-C., & Kim, C.-J. (2006). Characterization of electrowetting actuation on addressable single-side coplanar electrodes. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 16, 2053–2059.
- Yoon, J. Y., & Garrell, R. L. (2003). Preventing biomolecular adsorption in electrowetting-based biofluidic chips. *Analytical Chemistry*, 75(19), 5097–5102.
- Young, T. (1805). An Essay on the Cohesion of Fluids. *Royal Society*, 95(1805), 65–87.
- Yu, Z. T. F., Yong, K. M. A. and Fu, J. "Microfluidic Blood Cell Preparation: Now and Beyond." *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 10, no. 9 (2014): 1687-1703.
- Yuan, Y., & Lee, T. R. (2013). Contact Angle and Wetting Properties. *Surface Science Techniques*, 51(1), 3–34.
- Zhao, R., Antaki, J. F., Naik, T., Bachman, T. N., Kameneva, M. V. and Wu, Z. J. "Microscopic investigation of erythrocyte deformation dynamics." *Biorheology* 43, no. 6 (2006): 747-65.
- Zheng, Y., Nguyen, J., Wei, Y. and Sun, Y. "Recent advances in microfluidic techniques for single-cell biophysical characterization." *Lab on a Chip* 13, no. 13 (2013): 2464-2483.