



Estudo experimental para transporte de microgotas por atuação electrostática

Joana Anastácio Ramos

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em

Bioengenharia e Nanossistemas

Orientadores: Doutora Ana Sofia Oliveira Henriques Moita

Professor Duarte Miguel de França Teixeira dos Prazeres

Júri

Presidente: Professor Luís Joaquim Pina da Fonseca

Orientadora: Doutora Ana Sofia Oliveira Henriques Moita

Vogal: Professor José Luís Gonçalves Correia da Mata

Novembro 2014

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora Doutora Ana Sofia Oliveira Henriques Moita por toda a ajuda, disponibilidade, inteligência e acima de tudo pela paciência que teve comigo ao longo de todo este trabalho. Agradeço também a confiança depositada em mim em todas as fases desta dissertação.

Agradeço ao meu coorientador Professor Doutor Duarte Miguel de França Teixeira dos Prazeres por toda a disponibilidade e ajuda no desenvolvimento deste projeto.

Ao Professor António Luís Moreira, agradeço por me ter recebido no seu grupo de investigação e por me ter dado todas as ajudas necessárias para a concretização deste projeto.

Ao Professor José Luís Gonçalves Correia da Mata e à Professora Benilde de Jesus Vieira Saramago agradeço toda a ajuda e disponibilidade dispensadas nos ensaios de *electrowetting*.

Agradeço ainda aos Professores Nunes de Carvalho e Guilherme Lavareda, do LMSCE – Laboratório de Materiais Semicondutores e Conversão de Energia, do Centro de Física Molecular, no Instituto Superior Técnico, pelo apoio no processo de microestruturação das superfícies.

Ao Professor Francisco Marques Dias do Instituto de plasmas e fusão nuclear do IST pela disponibilidade e cedência do equipamento, neste caso uma fonte de alimentação.

Aos meus colegas que me acompanharam ao longo deste percurso, um enorme agradecimento por todo o apoio, amizade e pelos bons e maus momentos partilhados. Gostava de salientar as minhas amigas Mafalda Cardoso e Joana Costa sem vocês tudo teria sido muito mais complicado. Obrigado pela amizade, motivação diária e apoio.

Ao Luís Santos, um agradecimento especial, por ter estado a meu lado ao longo de todo este percurso e por ter lidado comigo nas alturas de maior stress. Obrigado pela amizade, inteligência, paciência e apoio.

À minha família, pais, avó e irmã um enorme agradecimento, por terem acreditado em mim desde do início desta jornada, sem vocês eu não teria conseguido chegar onde cheguei. Obrigado por tudo.

Finalmente agradeço à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pelo financiamento de uma bolsa de investigação no âmbito do projeto PTDC/EME-MFE/109933/2009 e por financiar parcialmente o trabalho realizado através do projeto RECI/EMS-SIS/0147/2012.

Resumo

O estudo do *electrowetting*, mais concretamente no transporte de gotas baseado na alteração da tensão superficial tem vindo a ser explorado para diversas aplicações em bioengenharia, bioquímica e engenharia biomédica, que requerem diversas operações de manipulação de amostras.

O presente trabalho tem como finalidade caracterizar o comportamento dinâmico de gotas de biofluidos sobre uma superfície hidrofóbica, com e sem atuação electrostática e descrever o efeito de alguns factores que são habitualmente alterados nas amostras (composição da amostra, concentração, pH).

Prepararam-se diversas superfícies microestruturadas e quimicamente alteradas, cuja molhabilidade com os biofluidos selecionados foi previamente estudada, para seleccionar aquelas que apresentavam uma maior hidrofobicidade e conseqüentemente facilitavam o movimento da gota, minimizando a energia dissipada na linha de contacto gota-superfície.

Ao longo do estudo utilizaram-se as seguintes soluções: cloreto de sódio, a simulação do plasma sanguíneo (5,6mM de glucose, 100mM de NaCl e 1,2mM da proteína BSA) e BSA. Para averiguar a viabilidade da amostra, estudou-se mais aprofundadamente a proteína BSA, avaliando os espectros de absorção, para averiguar se ocorreu desnaturação desta proteína durante os ensaios.

Os resultados mostram que ocorre adsorção de BSA pelo substrato, que é particularmente evidente em ensaios de longa duração, causando a saturação do ângulo de contacto, por alteração local da molhabilidade e impedindo que este decresça quando se aplicam tensões mais elevadas. A variação do pH promove esta adsorção, mas conduz também a uma reorganização das cadeias de BSA com o substrato que facilita o espalhamento da gota em *electrowetting*.

Palavras-chave

Electrowetting, biofluidos, molhabilidade, BSA, superhidrofobicidade, Teflon e microgotas.

Abstract

The study of electrowetting, more particularly for the transport of droplets based on the change in the surface tension, has been explored for various applications in bioengineering, biochemical and biomedical engineering, which require different sample handling operations.

This study aims to characterize the dynamic behaviour of droplets of biofluids over a hydrophobic surface, with and without electrostatic actuation and describe the effect of some factors, which are commonly altered in samples (sample composition, concentration, pH).

Several surfaces were microstructured, chemically altered and then characterized to quantify their wettability with the various biofluids used here and select those who were more hydrophobic and promoted droplet's motion with a minimum of energy dissipated at the contact line droplet-surface.

Throughout this study several solutions were used: sodium chloride, simulation of blood plasma (5.6mM glucose, 100mM NaCl and 1.2mM BSA protein) and BSA. To infer on the viability of the sample after the electrowetting tests, the adsorption spectra of the BSA protein were analysed, to determine if the protein suffered denaturation.

The results evidence the occurrence of passive adsorption of BSA by the substrate, which is particularly evident in long-term tests, causing the saturation of the static contact angle, by local modification of the wettability and precluding the angle to decrease further, when higher voltages are applied. Varying the pH further promotes the adsorption of the protein, but it also promotes the spreading, which is attributed to a rearrangement of the chains of BSA with the substrate.

Key-words

Electrowetting, biofluids, wettability, BSA, superhydrophobicity, Teflon and microdroplets.

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	V
Índice	VII
Índice de figuras	IX
Índice de tabelas	XI
Nomenclatura	XIII
Secção 1	1
Introdução	1
1.1 – Contexto e motivação	1
1.2 – Estado da arte sobre a resposta de fluidos biológicos à atuação electrostática (electrowetting)	3
1.3 – Objectivos	5
1.4 – Organização	6
Secção 2	9
Caracterização da molhabilidade do par líquido-superfície: pré-seleção dos materiais a testar sob ação electrostática	9
2.1 – Fundamentos teóricos sobre molhabilidade	9
2.2 – Instalação experimental	13
2.3 – Materiais e métodos	15
2.3.1 – Preparação das soluções	15
2.3.2 – Caracterização das propriedades das soluções.....	15
2.3.3 – Caracterização das superfícies	18
2.3.4 – Medição dos ângulos de contacto	20
2.4 – Metodologia de pré-seleção dos pares líquido-superfície a testar	22
Secção 3	27
Caracterização da molhabilidade de biofluidos sob ação electrostática (electrowetting)	27
3.1 – Fundamentos teóricos sobre electrowetting	27
3.2 – Instalação experimental: configuração utilizada nos ensaios de electrowetting	30
3.3 – Materiais e métodos	31
3.3.1 – Preparação das soluções	31
3.3.2 – Medição dos ângulos de contacto estáticos e dos diâmetros de espalhamento	31

3.3.3 – Testes de viabilidade da proteína.....	32
3.4 – Apresentação e discussão dos resultados.....	33
3.4.1 – Efeitos de concentração	33
3.4.2 – Efeito do pH	37
3.4.3 – Análise da viabilidade da proteína.....	40
Secção 4.....	43
Conclusão e trabalho futuro	43
4.1 – Conclusão	43
4.2 – Trabalho futuro	44
Bibliografia	47
Anexo	51
Artigo científico apresentado na 26th International Conference of Liquid Atomization and Spray Systems – ILASS 2014.....	51

Índice de figuras

Figura 1.1: Definição do ângulo de contacto e classificação proposta por (Koch & Barthlott 2009) da molhabilidade de uma superfície de acordo com o ângulo de contacto.....	2
Figura 2.1: Definição de ângulo de contato entre uma gota líquida e uma superfície.	9
Figura 2.2: Forças atuando em átomos ou moléculas no interior e na superfície de um material (neste caso um líquido).	10
Figura 2.3: Possíveis cenários de molhabilidade em superfícies rugosas: a) molhabilidade homogénea; b) molhabilidade heterogénea. θ_R é o ângulo de contacto aparente, medido na superfície rugosa. Imagens adaptadas de (Moita 2009).	12
Figura 2.4: Instalação experimental. a) Representação esquemática de todos os elementos utilizados; b) vista de pormenor do interior da câmara de Perspex.	14
Figura 2.5: Representação gráfica do sistema de coordenadas utilizado para calcular a tensão superficial. a) Representação dos raios de curvatura; b) Sistema alternativo de coordenadas. Adaptado de (Harris & Byers 1989).	16
Figura 2.6: Imagem ilustrativa do cálculo da tensão superficial através do software One Attension..	17
Figura 2.7: a) Esquema representativo da definição das dimensões a e λ que caracterizam a topografia das superfícies microestruturadas; b) exemplo de um perfil de rugosidade regular onde é possível quantificar as dimensões λ e h_R	19
Figura 2.8: Esquema exemplificativo do posicionamento da linha de base e da linha tangente para a medição do ângulo de contacto estático. Imagens adaptadas de: http://www.bioline.scientific.com/attension/applications/?card=AA7	21
Figura 2.9: Imagem ilustrativa da medição do ângulo de contacto estático através do software One Attension.....	21
Figura 2.10: Espalhamento de uma gota de solução mimética de plasma ($D_0=3,2\text{mm}$) forçado pelo impacto da gota sobre a superfície S3, a uma velocidade $U_0=0,44\text{m/s}$	24
Figura 2.11: Representação do espalhamento da simulação do plasma sanguíneo com $D_0=3,2\text{mm}$ e $U_0=0,44\text{m/s}$ sobre várias superfícies sem atuação electrostática.	25
Figura 3.1: Esquema da configuração habitualmente usada em estudos de electrowetting.	27

Figura 3.2: Esquema representativo da configuração de electrowetting utilizada neste trabalho.....	30
Figura 3.3: Curva ilustrativa do ângulo de contacto estático em função da tensão aplicada a uma gota de NaCl com uma concentração de 200mM. O diâmetro inicial das gotas é $D_0=2,8\text{mm}$	32
Figura 3.4: Ângulo de contacto em função da tensão aplicada para soluções de NaCl a diferentes concentrações. O diâmetro inicial das gotas é $D_0=2,8\text{mm}$	34
Figura 3.5: Ângulo de contacto em função da tensão aplicada para soluções de BSA com diferentes concentrações. O diâmetro inicial das gotas é $D_0=2,8\text{mm}$	35
Figura 3.6: Representação gráfica do $\cos\theta_e$ em função de V^2 para soluções de BSA com concentrações de a) 1mM e b) 5mM.....	35
Figura 3.7: Representação gráfica da evolução temporal do diâmetro de espalhamento induzido por atuação electrostática, adimensionalizado pelo diâmetro da gota depositada para $V=0$. a) NaCl (50mM), b) NaCl (100mM), c) NaCl (200mM), d) BSA (1mM) e e) BSA (2,5mM).....	37
Figura 3.8: Efeito do pH na evolução do ângulo de contacto estático com a tensão aplicada para soluções de BSA a diferentes concentrações a) 1mM e b) 2,5mM. O diâmetro inicial das gotas é $D_0=2,8\text{mm}$	38
Figura 3.9: Efeito do pH no diâmetro de espalhamento induzido em soluções de BSA (1mM) por atuação electrostática, adimensionalizado pelo diâmetro da gota depositada para $V=0$. a) pH=5, b) pH=7, c) pH=10.	39
Figura 3.10: Efeito do pH no diâmetro de espalhamento induzido em soluções de BSA (2,5mM) por atuação electrostática, adimensionalizado pelo diâmetro da gota depositada para $V=0$. a) pH=5, b) pH=7, c) pH=10.	40
Figura 3.11: Espectros de absorção obtidos para as soluções de BSA com concentrações de a) 1mM e b) 50mM antes e depois dos ensaios de electrowetting.....	41
Figura 3.12: Espectros de absorção obtidos para a solução de BSA com concentração de 50mM, obtidos na ausência de atuação electrostática. a) Espectro da solução recolhida antes das gotas serem depositadas no substrato. b) Espectro da solução obtido por análise das gotas depositadas no substrato, durante um período de tempo idêntico ao requerido para concluir um ensaio de electrowetting.	42

Índice de tabelas

Tabela 2.1: Propriedades físicas dos líquidos de trabalho utilizados.	18
Tabela 2.2: Topografia das superfícies utilizadas no presente estudo. a representa o comprimento do lado do quadrado de seção transversal de cada pilar nas superfícies micro-estruturadas, h_R é a altura dos pilares e λ é a distância entre os pilares.....	20
Tabela 2.3: Representação dos ângulos de contacto em equilíbrio para os pares líquido-superfície em estudo.....	22

Nomenclatura

a	Comprimento do lado da área de secção transversal dos pilares quadrangulares nas superfícies microestruturadas [μm];
d	Diâmetro de espalhamento da gota [mm];
c_H	Capacidade [F];
D_0	Diâmetro inicial da gota [mm];
d_H	Espessura da camada dielétrica [μm];
f_R	Fracção da área projetada na superfície sólida que é molhada pelo líquido;
g	Constante da aceleração da gravidade [ms^{-2}];
H	Altura de libertação da gota [mm];
h_R	Altura dos pilares quadrangulares nas superfícies micro-estruturadas [μm];
p_e	Pressão de espalhamento [Nm^{-1}];
R_0	Raio inicial da gota [mm];
R_a	Rugosidade média [μm];
R_1	Principais raios da curvatura [mm];
R_2	Principais raios da curvatura [mm];
r_f	Factor de rugosidade;
R_z	Rugosidade média pico-a-vale [μm];
S_e	Factor de espalhamento [Nm^{-1}];
t	Tempo [ms]
U	Potencial eléctrico [V];
U_{pzc}	Potencial de carga zero. [V];
U_0	Velocidade de impacto da gota [ms^{-1}];
V	Tensão [V];
W_a	Trabalho de adesão [Nm^{-1}];
W_c	Trabalho de coesão [Nm^{-1}];

Símbolos gregos

$\Delta\rho$	Diferença de densidade entre a interface dos líquidos [kgm^{-3}];
β	Factor de forma;
Φ	Ângulo de feixe [°];
λ	Comprimento de onda principal para o perfil de rugosidade [μm];
μ	Viscosidade dinâmica [kg/ms];
θ	Ângulo de contacto estático [°];
ε	Constante dielétrica da camada dielétrica;
ε_0	Permissividade do vácuo [Fm^{-1}];

ϵ_1	Constante dieléctrica do líquido;
θ_e	Ângulo de contacto com atuação electrostática [°];
θ_r	Ângulo de contato estático de recuo [°];
ρ	Densidade [gcm ⁻³];
ρ_{sl}	Densidade da carga [kgm ⁻³];
γ^{eff}	Tensão interfacial efetiva [Nm ⁻¹];
γ_s	Tensão superficial da superfície [Nm ⁻¹];
γ_{LS}	Tensão interfacial entre o líquido e a superfície [Nm ⁻¹];
γ_{LV}	Tensão da superfície no líquido [Nm ⁻¹];
γ_{SV}	Tensão interfacial entre a superfície e o vapor [Nm ⁻¹];

Abreviaturas

BSA	Bovine Serum Albumine
CCD	Charge-coupled device
EWOD	Electrowetting on dielectric
PTFE	Politetrafluoretileno

Secção 1

Introdução

1.1 – Contexto e motivação

A microfluídica digital tem ganho na última década um lugar de destaque em diversas aplicações, nomeadamente na manipulação de pequenas amostras em sistemas micro electromecânicos que integram uma ou várias funções laboratoriais num único *chip*, com dimensões de dezenas ou centenas de milímetros quadrados, os denominados *lab-on-a-chip*. Os sistemas existentes usam frequentemente microcanais para procederem ao transporte das amostras. No entanto, a complexidade destes sistemas tende a ser elevada, exigindo frequentemente a adição de bombas, sensores e válvulas. A esta complexidade associam-se diversos problemas tais como o acesso às amostras e o entupimento dos canais, que dificultam as diversas operações de manipulação (Barbulovic-Nad et al. 2008), (Mohamed et al. 2007), (Kaler et al. 2010). Alternativamente, alguns autores têm sugerido uma nova abordagem que consiste no transporte das amostras em pequenas gotas, com volumes que, dependendo da aplicação, podem variar de microlitros a picolitros, sobre padrões químicos e mecanicamente criados sobre o *chip*, numa configuração aberta, denominada por superfície microfluídica (Hong & Pan 2011). Por exemplo, (Barbulovic-Nad et al. 2008) utilizaram gotas com 11µl para introduzir um novo método de implementação de ensaios com células. Já (Welch et al. 2011) investigaram a realização de sequenciamento de DNA numa plataforma microfluídica digital através de *electrowetting*, numa escala de picolitros, mais concretamente com o volume de 300pL.

Para que este transporte seja possível, é necessário alterar a molhabilidade da superfície. A molhabilidade quantifica a facilidade com que um líquido se espalha sobre o sólido. Considerando uma gota que é depositada sobre uma superfície, o balanço das tensões interfaciais que atuam na gota é dado, numa situação de equilíbrio, pela equação de Young (1.1):

$$\gamma_{LV} \cdot \cos \theta + \gamma_{LS} = \gamma_{SV} \quad (1.1)$$

onde γ_{LV} , γ_{LS} e γ_{SV} são as tensões interfaciais entre o líquido, o sólido e o gás ou vapor circundante. θ é o ângulo de contacto, tal como definido na Figura 1.1. O ângulo de contacto é frequentemente usado para classificar a molhabilidade de uma superfície por um determinado líquido. Embora esta temática seja abordada mais detalhadamente na próxima secção, pode-se desde já adoptar a classificação proposta por (Koch & Barthlott 2009) segundo a qual as superfícies são superhidrofílicas para $\theta < 10^\circ$, hidrofílicas para $10^\circ < \theta < 90^\circ$, hidrofóbicas para $90^\circ < \theta < 150^\circ$ e superhidrofóbicas para $\theta > 150^\circ$.

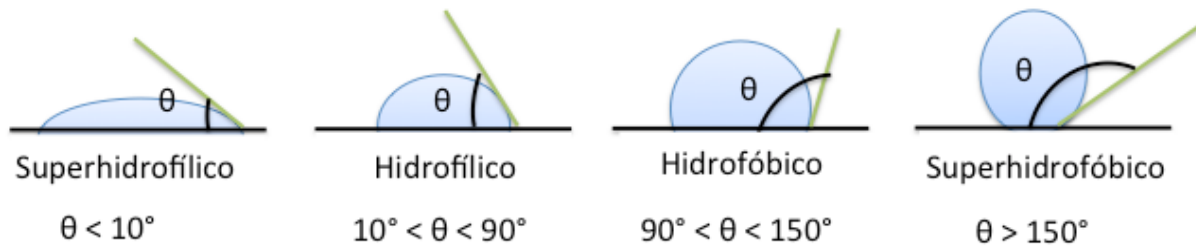


Figura 1.1: Definição do ângulo de contacto e classificação proposta por (Koch & Barthlott 2009) da molhabilidade de uma superfície de acordo com o ângulo de contacto.

Assim, a superfície é química e/ou mecanicamente alterada para se tornar hidrofóbica ou superhidrofóbica, por forma a facilitar o movimento da gota. Este movimento, por sua vez é obtido por atuação electrostática, comumente denominada na literatura inglesa por *electrowetting*.

No *electrowetting*, o campo eléctrico gera uma força que desequilibra o balanço descrito pela equação de Young, causando a diminuição do ângulo de contacto e promovendo o espalhamento da gota sobre a superfície. Se a superfície for hidrofóbica e se verificarem condições de reversibilidade, a gota regressa a uma posição próxima da inicial, após a interrupção da atuação electrostática. Usando um *chip* com uma configuração adequada, onde a corrente eléctrica passa por um conjunto de eléctrodos, alternadamente, a uma dada frequência, é possível controlar o movimento da gota. Este processo tem sido explorado nos últimos anos, para realizar diversas operações microfluídicas que são necessárias na miniaturização de várias aplicações bioquímicas, tais como a geração, o transporte, a separação e a junção de pequenas gotas (por exemplo (Pollack et al. 2011) e (Park et al. 2010)). (Goellner et al. 2012) afirmam inclusivamente que o *electrowetting* é particularmente indicado para a manipulação de suspensões celulares.

Apesar do potencial de utilização do *electrowetting* para o transporte de amostras biológicas exemplificado nos trabalhos supracitados e da investigação intensiva que se tem realizado nesta temática, essencialmente na última década, existem ainda muitas questões por resolver, que colocam entraves ao desenvolvimento de sistemas comerciais de manipulação de amostras. Do ponto de vista do desenvolvimento do sistema, é necessário definir a configuração adequada, o posicionamento dos eléctrodos e a seleção apropriada dos materiais (Cooney et al. 2006). Estas questões são particularmente relevantes, nos sistemas abertos, para uso das superfícies microfluídicas. A seleção dos materiais, principalmente os utilizados na superfície de contacto com a gota, depende naturalmente da composição desta e das propriedades dos fluidos biológicos que se pretende transportar, que por sua vez, também afectam a resposta da gota à atuação electrostática. Assim, a par com este processo de construção do sistema, é necessário determinar se as gotas que se pretende transportar têm as propriedades electroquímicas apropriadas para permitir a modificação efetiva do ângulo de contacto por atuação electrostática e até que ponto é possível alterar a sua composição para promover uma resposta mais eficiente da gota, sem comprometer a viabilidade da amostra. Neste contexto, existem ainda poucos estudos apresentados na literatura consultada. Embora relevantes, a maioria dos trabalhos identificam alguns problemas, mas não sugerem soluções, nem apresentam ainda uma descrição adequada dos fenómenos observados. Deste modo, o trabalho apresentado nesta dissertação pretende contribuir para a colmatação na falta de

informação sobre o efeito de alguns factores que são habitualmente alterados nas amostras (composição da amostra, concentração, pH) na eficácia do processo de espalhamento da gota por atuação electrostática. Para melhor contextualizar o trabalho desenvolvido nesta dissertação, relativamente à investigação que se tem realizado nesta temática, é relevante apresentar uma breve revisão bibliográfica sobre o transporte de biofluidos por *electrowetting*.

1.2 – Estado da arte sobre a resposta de fluidos biológicos à atuação electrostática (*electrowetting*)

O transporte de gotas baseado na alteração da tensão superficial tem vindo a ser explorado para diversas aplicações em bioengenharia, bioquímica e engenharia biomédica, que requerem diversas operações de manipulação de amostras, como recentemente revisto por (Pollack et al. 2011). De facto, o controlo do movimento de fluídos à microescala através da modificação tensão superficial é vantajoso, uma vez que evita o uso de muitas partes eletromecânicas. Isto acontece porque a esta escala, as forças de tensão de superficial tornam-se dominantes sobre as forças de pressão e de dissipação viscosa. Neste contexto, a microfluídica digital já utilizada, por exemplo para ensaios celulares, apresenta muitas mais vantagens quando comparada com as técnicas utilizadas atualmente (Barbulovic-Nad et al. 2008), (Mohamed et al. 2007). Entre outras, podem destacar-se a redução significativa de amostras para análise e de reagentes, análises mais rápidas como resultado das menores distâncias de difusão que permitem, conseqüentemente um controlo mais eficiente dos processos e portabilidade dos sistemas. No entanto, como referido anteriormente, a maioria dos dispositivos desenvolvidos até à data, baseiam o transporte das amostras no fluxo contínuo de um fluido através de canais fechados (Mugele & Baret 2005). Esta configuração fechada é mais fácil de implementar, mas possui várias limitações associadas ao entupimento dos canais, à limpeza e ao acesso às amostras em estudo, como referido anteriormente. Para solucionar estes problemas e retirar o máximo partido das vantagens dos sistemas microfluídicos, investigadores como (Pollack et al. 2011) e (Hong & Pan 2011) têm explorado configurações alternativas para o desenvolvimento de sistema de configuração aberta, ou seja, uma única superfície que permita o transporte de amostras sob a forma de microgotas. O transporte da gota numa superfície exige alterações de molhabilidade na interface entre a superfície e a gota que facilitem o seu movimento. Infelizmente, a dominância das forças de capilares à microescala, não trás só vantagens, dado que a esta escala se levantam também diversas dificuldades, nomeadamente relacionadas com o facto do balanço das forças que atuam na interface gota-superfície ser fortemente influenciado pelas condições na fronteira associadas à homogeneidade química e à rugosidade da superfície. Estas condições na fronteira introduzem assimetrias e irreversibilidade no processo de espalhamento e recessão da gota, que está na base do seu movimento. O espalhamento da gota, por modificação local da tensão superficial pode obter-se por diversos métodos, sendo o *electrowetting* um dos mais populares. (Park et al. 2010) consideram que este método constitui um pilar fundamental no desenvolvimento da microfluídica digital, com enorme potencial para utilização no transporte de biofluidos. Porém, a

maioria dos autores recorre a este método para processos específicos de separação e análise de DNA e proteínas, principalmente em diagnósticos biomédicos (Jakeway et al. 2000), (Hong & Quake 2003) e ainda poucos investigadores exploraram efetivamente o *electrowetting* para o transporte específico de biofluidos.

Os princípios básicos de electrocapilaridade, sobre os quais assenta o *electrowetting* foram introduzidos por (Lippmann 1875). Os estudos deste investigador basearam-se em gotas de electrólito sobre mercúrio. O uso de soluções aquosas, tais como as usadas no presente trabalho, só se tornou possível graças a Berge (Berge 1993) que introduziu o conceito de EWOD - *electrowetting on a dielectric*. Esta camada dielétrica evita o problema da electrólise da água, que ocorre com a aplicação de tensões de apenas algumas centenas de milivolts. Desde então, o *electrowetting* tem sido estudado por inúmeros investigadores, que abordaram diversas questões tais como o efeito das propriedades dos electrólitos que formam as microgotas, o efeito das propriedades e da espessura do material dielétrico, revistos detalhadamente por (Mugele & Baret 2005) e, mais recentemente, os efeitos relacionados com a rugosidade da superfície, que podem induzir assimetrias na forma da gota e acentuar a dissipação de energia na linha de contacto (Jones 2005). (Mugele & Baret 2005) referem também que existem morfologias particulares das gotas que poderão instabilizar e dificultar o processo de espalhamento.

A teoria que descreve o *electrowetting* foi também abordada por diversos autores. A teoria de Lippmann baseia-se essencialmente num balanço termodinâmico das tensões interfaciais (Adamson 1990). Alternativamente, outros autores, tais como (Jones 2005) e (Kuo et al. 2003) derivam modelos electromecânicos que descrevem a redução do ângulo de contacto no *electrowetting*, associada à ação das forças eléctricas aplicadas. (Mugele & Baret 2005) derivou um modelo baseado na minimização de energia, seguindo a abordagem introduzida por (Berge 1993). Neste contexto, (Bahadur & Garimella 2006) argumentam que o gradiente de energia é de facto o efeito que produz o movimento induzido pelo *electrowetting* e não somente a redução do ângulo de contacto. Efetivamente, as abordagens são análogas dado que as equações de equilíbrio das tensões interfaciais podem derivar-se também por minimização da energia livre do sistema gota-superfície-gás circundante (Vignes-Adler, 2000).

A maioria dos trabalhos revistos até agora considera apenas o *electrowetting* em condições de equilíbrio estático. Embora estas sejam as condições consideradas na maioria dos casos analisados nesta dissertação, considerar-se-á também uma análise dinâmica, na qual têm de ser incluídos fenómenos hidrodinâmicos tais como a dissipação viscosa no volume de líquido da gota e a dissipação por fricção na linha de contacto líquido-superfície. O processo de *electrowetting* em ângulos de contacto dinâmicos foi estudado, por exemplo por (Blake et al. 2000), por (Decamps & De Coninck 2000) e mais recentemente por (Wang & Jones 2005) numa folha de líquido (mistura de água e glicerol) sobre uma superfície de Teflon. Estes autores detectaram que o ângulo de contacto dinâmico diminuía sob a aplicação de uma tensão eléctrica, para qualquer velocidade imposta no escoamento da folha de líquido, em intervalos de tempo da ordem das dezenas ou centenas de milissegundos. Neste contexto, o movimento e espalhamento de gotas de água em superfícies de Teflon foi simulado por exemplo por (Annapragada et al. 2011).

A dificuldade na aplicabilidade destes resultados em sistemas do tipo *lab-on-a-chip* está precisamente no uso de fluidos biológicos. (Mugele & Baret 2005) refere que um dos desafios que se consegue no desenvolvimento de aplicações do tipo *lab-on-a-chip* consiste precisamente em assegurar a biocompatibilidade dos materiais e dos procedimentos, que é fortemente dependente de questões relacionadas com a adsorção das biomoléculas na superfície de contacto com as gotas e com propriedades específicas tais como a polaridade das proteínas. Embora alguns autores tais como (Srinivasan et al. 2004) e (Wheeler et al. 2004) apresentem estudos de transporte induzido por *electrowetting* em proteínas, DNA e em fluidos fisiológicos, os fenómenos de transporte são fortemente afectados pelos factores acima referidos, de uma forma ainda pouco clara. Por outro lado, o efeito da concentração dos compostos biológicos e do pH é também ainda pouco estudado.

(Yoon & Garrell 2003) utilizaram um sistema EWOD para estudar soluções de BSA, lisozima de clara de ovo de galinha branca e DNA de timo de vitelo. Estes autores referem a ocorrência de adsorção biomolecular pelo substrato e indicam, que esta pode ser evitada ou minimizada através da limitação do potencial aplicado, escolhendo o pH apropriado da solução e a polaridade de eléctrodos. (Yoon & Garrell 2003) propuseram dois mecanismos de adsorção biomolecular sob condições EWOD confinados: adsorção passiva resultante de interações hidrofóbicas e adsorção electrostaticamente acionada quando um campo eléctrico externo é aplicado. Este estudo efectuado poderá ser útil para controlar a adsorção biomolecular em outras aplicações com materiais dieléctricos hidrofóbicos. (Quinn et al. 2003) indicaram uma importante dependência em relação ao pH, que depende da força iónica e composição do polímero, que podem assim influenciar o comportamento do *electrowetting*.

Embora a relevância destes estudos seja indiscutível, também neste caso o efeito da modificação da concentração e do pH é ainda pouco elucidativa. As eventuais alterações sofridas pelos compostos biológicos durante o processo de transporte são também por vezes descuradas.

O trabalho apresentado na presente dissertação enquadra-se assim, no estado da arte brevemente descrito, como um estudo fundamental que se pretende que possa contribuir para aumentar o conhecimento sobre o comportamento real de microgotas de fluidos biológicos em *electrowetting* e melhorar a descrição e compreensão dos processos envolvidos nos fenómenos observados. Apesar do seu carácter fundamental, este estudo é fulcral para responder ao desafio, apontado por (Mugele & Baret 2005) de criar microssistemas de transporte verdadeiramente biocompatíveis.

1.3 – Objectivos

Este é o primeiro passo de um projeto a longo prazo para o desenvolvimento de um sistema de transporte de amostras biológicas.

No seguimento do contexto e do estado da arte apresentados nas subsecções anteriores, o objectivo principal deste trabalho consiste em caracterizar a resposta de microgotas de fluidos biológicos à atuação electrostática e descrever o efeito de alguns factores que são habitualmente alterados nas amostras (composição da amostra, concentração, pH). Pretende-se assim averiguar

como se podem ajustar estes factores de forma a promover a resposta da gota à atuação electrostática, garantindo a viabilidade da amostra.

Para que estes objectivos sejam cumpridos é necessário construir uma instalação que permita a realização dos ensaios. Pretende-se que a caracterização dos fenómenos observados seja baseada na descrição correta dos processos físicos e químicos que os governam. Como tal, a análise realizada deve abranger a alteração da molhabilidade em condições estáticas e dinâmicas, aproximando-se as últimas das condições reais de resposta da gota. Nesse sentido, a instalação utilizada terá de possibilitar o acesso óptico para a aplicação de técnicas de visualização que permitam a caracterização da dinâmica da gota em tempo real (com escalas temporais da ordem dos milissegundos).

Esta análise deverá ser útil para identificar os materiais e as configurações básicas (nomeadamente o posicionamento dos eléctrodos e as dimensões e espessuras características) a serem testadas num chip, que sirva de base para o desenvolvimento do sistema de transporte, a realizar na próxima fase do projeto.

1.4 – Organização

Esta dissertação encontra-se dividida em quatro secções, incluindo a presente Introdução, que enquadra o trabalho desenvolvido, num contexto de aplicação ao desenvolvimento de um sistema de transporte de amostras de biofluidos. Nesse contexto apresenta-se uma breve revisão bibliográfica dos estudos realizados nesta temática, dando particular ênfase ao transporte das gotas por *electrowetting*, dado que é o processo estudado em pormenor nesta dissertação. No seguimento deste contexto, indicam-se os objectivos principais do trabalho.

A segunda secção apresenta detalhadamente a metodologia seguida para seleccionar os materiais e os fluidos que serão testados sob atuação electrostática. Esta seleção baseia-se na caracterização das propriedades dos fluidos e na quantificação da molhabilidade do par líquido-superfície, baseada em medições do ângulo de contacto e do diâmetro de espalhamento das gotas. Dada a especificidade do tema, é necessário introduzir nesta secção os fundamentos teóricos sobre molhabilidade, que são fundamentais para a compreensão do trabalho. Esta secção inclui também a descrição da instalação experimental e das técnicas de medida utilizadas.

Os fluidos e materiais seleccionados na **secção 2**, são posteriormente testados para caracterizar a resposta das gotas à atuação electrostática (*electrowetting*) mediante a alteração de diversos factores, como apresentado na **secção 3**. Os resultados são discutidos com o intuito de descrever os processos físicos e químicos que governam os fenómenos observados. Os fundamentos teóricos que são especificamente necessários para uma correta interpretação destes resultados são brevemente introduzidos no início desta secção. A configuração utilizada nos ensaios de *electrowetting* e a metodologia seguida para caracterizar a resposta das gotas são também aqui descritas.

Finalmente, na **secção 4**, resumem-se as principais conclusões do trabalho e sugerem-se linhas de ação para a prossecução do mesmo, nomeadamente no que diz respeito à construção do *chip* que deverá servir de base para o desenvolvimento do sistema de transporte.

A estrutura seguida é um pouco diferente da usual. Porém dada a complexidade dos conceitos associados à molhabilidade, aos quais se somam os conceitos relativos ao *electrowetting*, é mais fácil para a leitura e compreensão da dissertação, apresentá-los sucessivamente. Por outro lado, o estudo específico da resposta da gota à atuação electrostática, que compõe a parte fulcral desta dissertação, exigiu um trabalho preliminar muito significativo de familiarização dos conceitos de molhabilidade, de seleção de materiais e de domínio das técnicas de medida utilizadas, que têm ser apresentados detalhadamente, para melhor contextualização e compreensão de todo o trabalho realizado.

Secção 2

Caracterização da molhabilidade do par líquido-superfície: pré-seleção dos materiais a testar sob ação electrostática

2.1 – Fundamentos teóricos sobre molhabilidade

A molhabilidade de líquidos em superfícies sólidas pode ser descrita de diversas formas, sendo a medição do ângulo de contacto uma das mais usuais (Michalski & Saramago 2000). O ângulo de contacto (θ) tem sido muito estudado em diversas áreas, nomeadamente na físico-química de líquidos. Este ângulo pode ser 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. Assim sendo, a molhabilidade de uma dada superfície vai depender do equilíbrio termodinâmico existente entre as interfaces vapor, sólido e líquido, como representado na Figura 2.1. Normalmente, 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 linha de intersecção das três interfaces: vapor, sólido e líquido, denomina-se como linha de contacto. A Figura 2.1 representa uma gota no plano. A linha de contacto corresponde ao ponto de intersecção das tensões interfaciais (Adamson 1997).

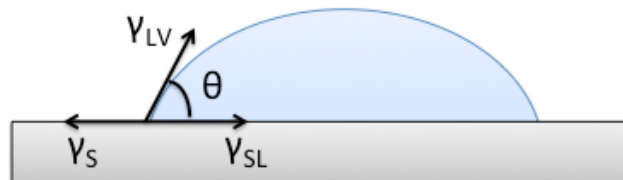


Figura 2.1: Definição de ângulo de contato entre uma gota líquida e uma superfície.

A molhabilidade e consequentemente a formação do ângulo de contacto para um dado sistema líquido-sólido-vapor pode também ser facilmente interpretada, recorrendo ao conceito de energia de superfície. Começando por analisar o líquido, os átomos e as moléculas podem mover-se livremente para procurar uma posição de menor energia potencial, isto é, a posição na qual as forças atrativas se equilibram com as repulsivas (Todd 1993). Por outro lado, as partículas na superfície livre do líquido (isto é na interface com o vapor) apresentam apenas forças direccionadas para o centro do líquido. A atuação das forças atrativas e repulsivas é esquematicamente ilustrada na Figura 2.2.

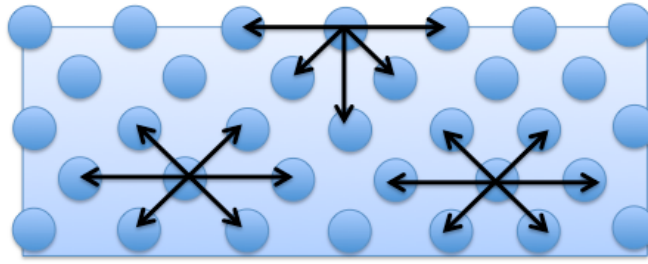


Figura 2.2: Forças atuando em átomos ou moléculas no interior e na superfície de um material (neste caso um líquido).

Seguindo este raciocínio de atuação das forças atrativas e repulsivas, é compreensível que a superfície do líquido seja a região de maior energia. Este raciocínio é válido para o sólido e para o vapor circundante. Assim, uma variação da área da superfície obriga à movimentação de átomos, do centro do líquido para a superfície e conseqüentemente a uma alteração da energia do sistema associada à diferença entre as energias das espécies na superfície e no interior do material (sólido, líquido ou gasoso). Neste contexto, a tensão interfacial define-se como a variação da energia do sistema por unidade de área, ou alternativamente o trabalho que é necessário realizar, por unidade de área, para criar uma nova superfície.

Como representado na Figura 2.1, γ_s representa a tensão superficial do sólido, mas apenas quando este se encontra no vácuo. Num sistema onde a gota e o sólido se encontram envolvidos por um meio gasoso, define-se uma tensão superficial do sólido em equilíbrio com o vapor γ_{sv} . A diferença entre estas duas tensões denomina-se por pressão de espalhamento, p_e :

$$p_e = \gamma_s - \gamma_{sv} \quad (2.1)$$

Contudo, assume-se que a adsorção de vapor pelo sólido é desprezável, principalmente se a energia de superfície do sólido é baixa (por exemplo nos metais (Vignes-Adler, 2000)) e se o líquido não for volátil. Assim sendo, $\gamma_{sv} = \gamma_s$ representa a tensão superficial do sólido numa atmosfera qualquer. Considerando que a gota está em equilíbrio, o balanço das tensões interfaciais sólido-líquido, sólido-vapor e líquido-vapor é dado pela equação de Young, como apresentada na equação (1.1).

Considerando que a situação de equilíbrio descrita pela equação de Young depende das forças adesivas e as forças coesivas, define-se trabalho de adesão W_a como o trabalho realizado para contrariar a tendência de espalhamento, ou seja o trabalho que seria necessário efetuar para separar o líquido da superfície. Esta quantidade pode expressar-se pela equação de Dupré:

$$W_a = \gamma_{LV} + \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad (2.2)$$

Introduzindo a equação de Young em (2.2) obtém-se a equação de Young-Dupré:

$$W_a = \gamma_{LV} \cdot (\cos \theta + 1) \quad (2.3)$$

Esta equação é mais útil no estudo de sistemas físico-químicos, já que relaciona duas grandezas determináveis com relativa facilidade e precisão: ângulo de contacto (θ) e tensão superficial do líquido (γ_{LV}). Inversamente, o trabalho de coesão W_c seria o trabalho necessário para romper a coesão da gota. Em termos unitários define-se como o trabalho necessário para causar o rompimento em duas partes de uma coluna líquida com uma área unitária. Fazendo o balanço entre o peso da coluna de água e a força de tensão superficial verifica-se que o trabalho de coesão tem de igualar o dobro de γ_{LV} . Como introduzido na **secção 1**, quanto menor for o ângulo de contacto, maior é a molhabilidade da superfície. Na situação extrema em que o líquido se espalha completamente pela superfície tal que $\theta=0^\circ$ e $W_a=W_c$. Por oposição, numa situação limite em que a gota não molha a superfície, $\theta=180^\circ$ e $W_a=0$. Em situações de molhabilidade parcial onde $0^\circ<\theta<90^\circ$, $W_a<0$ e no cenário oposto, isto é quando $0^\circ<\theta<90^\circ$, $W_a>0$. As situações extremas de $\theta=0^\circ$ e de $\theta=180^\circ$ não se verificam na realidade, pelo que vários autores propõem classificações alargadas, associadas a intervalos de valores do ângulo de contacto estático. Por exemplo, na classificação proposta por (Koch & Barthlott 2009), considera-se que a situação de molhabilidade perfeita ocorre para $\theta<10^\circ$ e a situação oposta, em que o líquido não molha o sólido ocorre para $\theta>150^\circ$. A fronteira exata para os valores de θ que definem a mudança entre os regime de molhabilidade não é universal, sendo uma questão complexa, ainda hoje debatida na literatura, como recentemente revisto por (Marmur 2011). Para tornar o raciocínio do balanço entre trabalho de coesão e de adesão mais intuitivo, pode introduzir-se factor de espalhamento S_e :

$$S_e = W_a - W_c = \gamma_{SV} - \gamma_{VL} - \gamma_{SL} \quad (2.4)$$

O factor de espalhamento é assim positivo quando o líquido se espalha completamente sobre o sólido e negativo se a molhabilidade for parcial (parcialmente molhável ou parcialmente não molhável).

A equação de Young é apenas válida para situações ideais em que a superfície é perfeitamente lisa, homogénea, plana e indeformável. Se a superfície for rugosa, podem surgir dois cenários representados esquematicamente na Figura 2.3, onde se aplicam, em alternativa à equação de Young, as equações de Wenzel (Wenzel 1936) e de Cassie e Baxter (Cassie & Baxter 1944) que relacionam o ângulo de Young com o ângulo aparente que é medido na superfície, θ_r . Conforme o estado de energia mínima no equilíbrio, a equação de Wenzel considera um regime de molhabilidade homogéneo, no qual o líquido penetra completamente entre as irregularidades da superfície (Figura 2.3 a). Neste caso, o ângulo de contacto aparente relaciona-se com o ângulo de Young através da equação:

$$\cos \theta_R = r_f \cdot \cos \theta \quad (2.5)$$

onde r_f é o factor de rugosidade na superfície molhada, a qual representa a relação entre a área realmente molhada para a área correspondente projetada. Esta relação é válida para superfícies com composição química homogénea.

A equação de Cassie e Baxter caracteriza um regime de molhabilidade heterogéneo, no qual o líquido não penetra completamente entre as irregularidades das superfícies, de modo que se podem aprisionar bolsas de ar entre o líquido e a superfície, o que contribui para aumentar a energia da interface e reduzir a área de contacto entre o líquido e o sólido. Neste regime o ângulo aparente e o ângulo de Young relacionam-se através da expressão:

$$\cos \theta_R = r_f \cdot \cos \theta - f_R (r_f \cdot \cos \theta + 1) \quad (2.6)$$

onde f_R representa a fracção da área projetada na superfície sólida que é molhada pelo líquido. Embora as equações de Wenzel e de Cassie and Baxter permitam estimar o ângulo de contacto aparente, medido sobre uma superfície rugosa, de uma forma mais fidedigna que a equação de Young, devem ser utilizadas com cuidado, uma vez que não existe ainda uma condição universal que estabeleça a transição entre os regimes de molhabilidade homogénea e heterogénea. Os regimes de molhabilidade heterogénea são difíceis de garantir e alguns autores, tais como (He et al. 2003) e (Varanasi et al. 2010) consideram que um regime de molhabilidade heterogénea estável tem de se manter após a introdução de pequenas instabilidades no sistema (por exemplo a indução de pequenos movimentos da gota ou deixando-a cair a de pequenas alturas, em vez de a depositar sobre a superfície. Por outro lado, esta classificação depende da escala a que se estiver a avaliar o fenómeno sendo que numa escala nanométrica é difícil assegurar uma molhabilidade perfeitamente homogénea ao longo de toda a linha de contacto (Santini et al. 2013). Porém, considerando a escala micrométrica adoptada na avaliação dos ângulos de contacto aparentes, que são considerados na discussão do presente trabalho, é lícito adoptar estas equações para estimar os regimes de molhabilidade em superfícies rugosas.

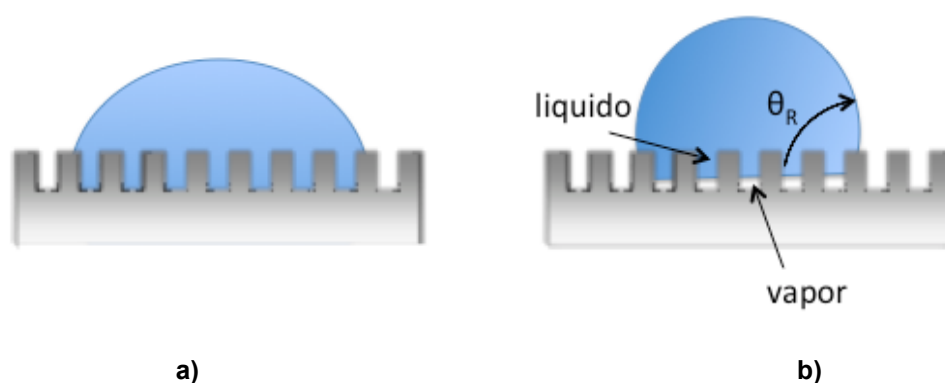


Figura 2.3: Possíveis cenários de molhabilidade em superfícies rugosas: **a)** molhabilidade homogénea; **b)** molhabilidade heterogénea. θ_R é o ângulo de contacto aparente, medido na superfície rugosa. Imagens adaptadas de (Moita 2009).

Para além dos ângulos de contacto de equilíbrio, podem ainda identificar-se ângulos de contacto quasi-estáticos e dinâmicos, de avanço e de recuo. O ângulo quasi-estático de avanço é o valor máximo do ângulo de contacto estável, medido imediatamente antes da linha de contacto avançar e a gota se começar a espalhar. Se a linha de contacto se move no sentido contrário, o menor ângulo estável obtido antes do movimento de retracção é o ângulo quasi-estático de recuo. A diferença

entre os dois é definida como histerese. Na realidade não existem sistemas termodinâmicos perfeitamente reversíveis, sendo a histerese o resultado dessa irreversibilidade. Deste modo, quando uma gota se espalha a partir de uma determinada situação de equilíbrio, mesmo que o líquido retraia pela acção coesiva da tensão interfacial líquido-vapor, ela nunca irá regressar exactamente à sua forma inicial. A histerese é essencialmente provocada por heterogeneidades químicas e/ou geométricas da superfície (rugosidade).

Os ângulos de contacto dinâmicos são avaliados a cada instante do espalhamento ou retracção da gota e são essencialmente relevantes para caracterizar estados de “molhabilidade dinâmica” que ocorrem quando a velocidade de deslocação da linha de contacto é consideravelmente diferente de zero (Moita & Moreira 2007) (Vignes-Adler 2000).

2.2 – Instalação experimental

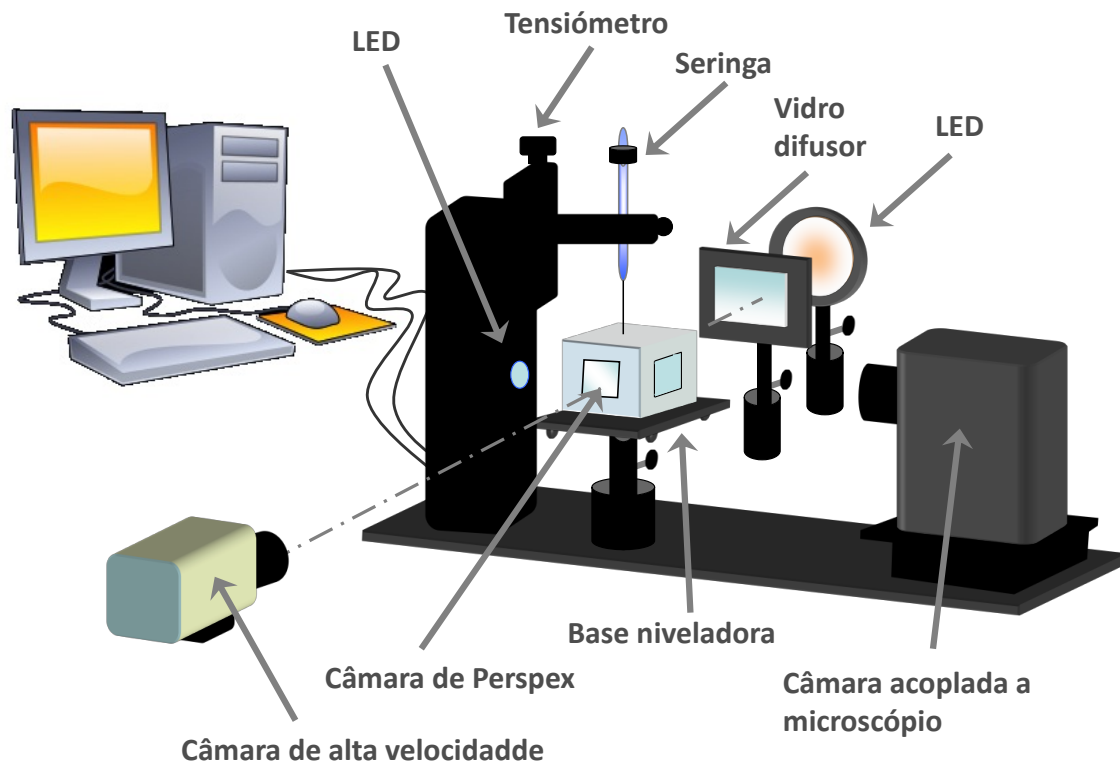
A instalação experimental está apoiada num tensiómetro óptico Attension modelo Theta com a exatidão de 0,1%, que basicamente é composto por uma base regulável (com três graus de liberdade), uma fonte de iluminação, um sistema de geração de gotas e um sistema de aquisição de imagens, que inclui uma câmara de CCD (charge-coupled device) monocromática acoplada a um microscópio. As imagens captadas por este sistema têm uma dimensão de 640x480 pixel. Para o sistema óptico usado, a resolução espacial é de 15,6 μm /pixel. As gotas são geradas na extremidade de uma agulha que é fixa a um suporte regulável (com dois graus de liberdade) que permite que se ajuste a distância e a posição da agulha (e conseqüentemente, da gota) em relação à superfície em estudo. O caudal de líquido que alimenta a agulha é bombeado por uma pequena bomba de seringa. Todo o sistema é controlado pelo *software* One Attesion, para assegurar a formação de gotas uniformes. Todos os ensaios foram realizados no interior de uma câmara de Perspex, que é previamente saturada com o fluido em estudo à temperatura ambiente (cerca de 20°C). Esta câmara de dimensões totais 65x70x65mm³ tem quatro janelas de quartzo com as dimensões de 55x55mm², para evitar distorções e minimizar os erros de medição associados a estas distorções. A câmara é fixa à base do tensiómetro.

Esta instalação permite assim a medição dos ângulos de contacto estáticos e quasi-estáticos, para todos os pares líquido-superfície testados, bem como da tensão superficial dos líquidos utilizados. As superfícies são colocadas no topo de um pequeno cilindro de cobre (com cerca de 22mm de diâmetro e 18mm de altura) que está dentro da câmara de Perspex e que será necessário nos ensaios de *electrowetting*. Deste modo garante-se que configuração geométrica utilizada nos ensaios é semelhante, com e sem atuação electrostática.

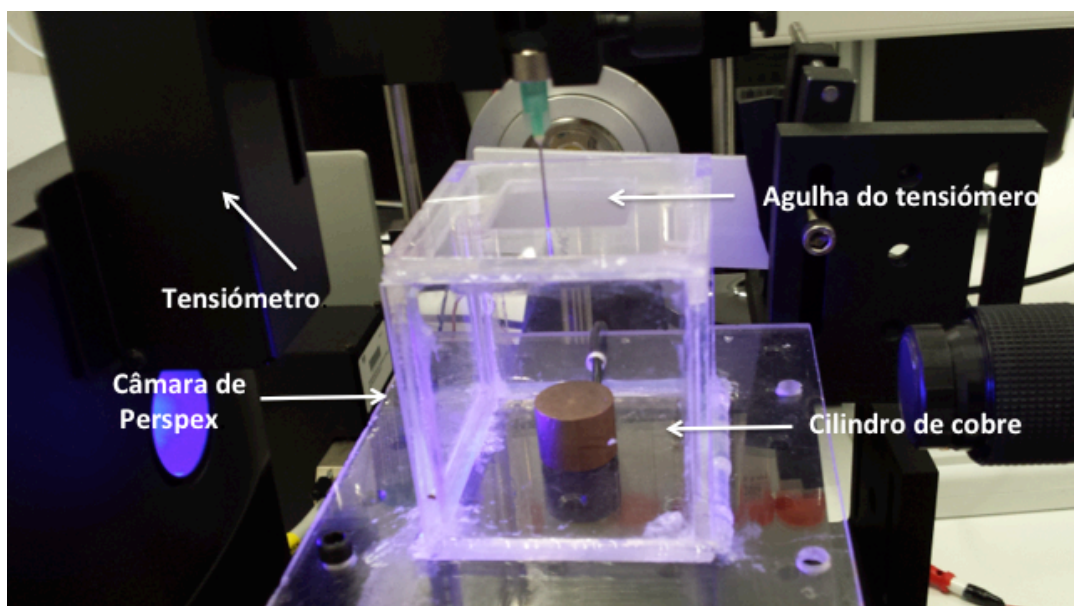
Para além dos ângulos de contacto estáticos e quasi-estáticos, é necessário avaliar a variação do diâmetro de espalhamento da gota no tempo. Dado que os tempos característicos de espalhamento estudados neste trabalho são da ordem dos milissegundos, o processo de espalhamento é visualizado usando uma câmara de alta velocidade (Phantom v4.2 da Vision Research Inc.). A câmara é colocada perpendicularmente ao plano de deposição da gota. As imagens são gravadas a uma taxa de aquisição fixa de 2200 *frames* por segundo (cada imagem tem uma dimensão de

512x512 pixels). Para a configuração utilizada neste trabalho a resolução espacial é de $25\mu\text{m}/\text{pixels}$ e a resolução temporal é de $0,45\text{ms}$.

A Figura 2.4 ilustra esquematicamente a instalação utilizada e apresenta em pormenor a disposição dos elementos no interior da câmara.



a)



b)

Figura 2.4: Instalação experimental. **a)** Representação esquemática de todos os elementos utilizados; **b)** vista de pormenor do interior da câmara de Perspex.

2.3 – Materiais e métodos

2.3.1 – Preparação das soluções

Nesta fase inicial do trabalho selecionaram-se como líquidos de trabalho água destilada, soluções de cloreto de sódio (NaCl), preparadas com diferentes concentrações e uma solução mimetizando o plasma sanguíneo. A água destilada é utilizada como líquido de controlo e as soluções de cloreto de sódio foram selecionadas por serem frequentemente usadas em ensaios de *electrowetting*. A solução mimetizando o plasma sanguíneo, considerada como um fluido biológico de interesse para análise, contém a proteína BSA (bovine serum albumin), que poderá influenciar o processo de transporte por *electrowetting*. Nesta fase consideraram-se ainda outras soluções, tais como soluções de glucose e de DNA. Porém todas estas soluções são aquosas, não se tendo verificado nenhuma diferença significativa na molhabilidade com as superfícies testadas, nomeadamente em comparação com a água destilada. Por outro lado, não é previsível pela bibliografia consultada que o transporte destas soluções por *electrowetting* seja muito diferente daquele obtido com a água, pelo que estas soluções não foram consideradas nos ensaios finais.

Assim sendo, as soluções utilizadas nesta fase inicial foram as soluções de NaCl (Chem-Lab) a diferentes concentrações: 50mM, 100mM, 200mM e 400mM e uma solução que simula o plasma sanguíneo e cuja a composição é: 5,6mM de glucose (Chem-Lab), 100mM de NaCl (Chem-Lab) e 1,2mM de BSA (Sigma) (Fournier 1999). Estas soluções foram todas preparadas em água destilada para um volume final de 20ml.

2.3.2 – Caracterização das propriedades das soluções

As propriedades físicas mais relevantes das soluções, que se podem caracterizar à priori neste trabalho são a tensão superficial (ou tensão interfacial líquido-gás γ_{LV}), a densidade ρ e a viscosidade dinâmica μ .

A tensão interfacial foi medida no tensiómetro através do método da gota pendente. A forma de uma gota em suspensão na extremidade da agulha é determinada a partir do equilíbrio de forças, que incluem a força de tensão superficial desse líquido e o peso da massa de líquido. A forma da gota é governada pela equação de Laplace:

$$\Delta p = \gamma_{LV} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (2.7)$$

onde Δp é a diferença de pressão entre os dois lados da interface, R_1 e R_2 são os principais raios de curvatura e γ_{LV} é a tensão interfacial líquido-gás. Considere-se o sistema de coordenadas adequado, onde x e y são as coordenadas horizontal e vertical em qualquer secção meridional da gota e define-se uma coordenada s , para localizar os pontos da curvatura da gota em função dos raios de curvatura e de um ângulo Φ , definido entre os raios de curvatura e os eixos x e y (Figura 2.5).

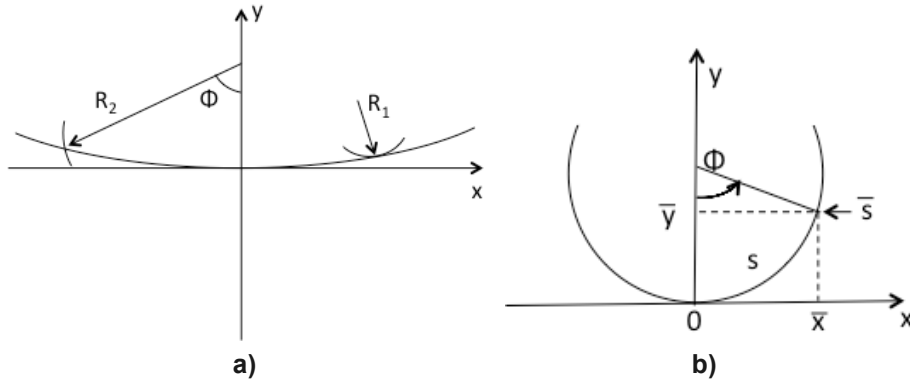


Figura 2.5: Representação gráfica do sistema de coordenadas utilizado para calcular a tensão superficial. **a)** Representação dos raios de curvatura; **b)** Sistema alternativo de coordenadas. Adaptado de (Harris & Byers 1989).

Deste modo, é possível definir um sistema alternativo de coordenadas $x'=dx/ds=\cos\phi$ e $y'=dy/ds=\sin\phi$ e assim estabelecer um conjunto de equações adimensionais de 1ª ordem que permitem resolver a equação de Young-Laplace a partir do perfil geométrico da gota, como descrito em pormenor por (Cheng et al. 1990). Estas equações definem o chamado factor de forma β . Para o ponto $x=y=0$ que coincide com a curvatura da gota quando esta se forma, $R_1=R_2=R_0$, pelo que nesse caso:

$$\Delta p = \frac{2\gamma_{LV}}{R_0} \quad (2.8)$$

Para outros valores de y , a diferença de pressão Δ_p é dada pela pressão hidrostática $\Delta_p=\Delta_\rho g y$, onde g é a constante de aceleração da gravidade. Assim a equação de Young-Laplace pode reescrever-se na forma:

$$\gamma_{LV} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) = -\Delta_\rho g y + \frac{2\gamma_{LV}}{R_0} \quad (2.9)$$

Adimensionalizando e manipulando este conjunto de equações juntamente com o factor de forma, é possível determinar a tensão interfacial na interface líquido-gás, pela expressão:

$$\gamma_{LV} = \frac{\Delta_p g R_0^2}{\beta} \quad (2.10)$$

onde:

- γ_{LV} – tensão superficial do líquido
- Δ_p - diferença de densidade entre a interface dos líquidos
- g - constante de aceleração da gravidade

R_0 - raio de curvatura da gota quando se forma

β - factor de forma

Esta é a expressão utilizada pelo *software* One Attention para determinar a tensão superficial dos líquidos. O perfil geométrico da gota é detectado a partir das imagens captadas pelo tensiómetro que são processadas, sendo utilizado um algoritmo de detecção de contornos para o efeito. De um modo simplificado, as imagens da câmara monocromática correspondem a uma matriz de dimensão $n \times m$ pixels (dimensão da imagem), onde cada entrada da matriz corresponde a um valor de intensidade numa escala de cinzentos (de zero a 255, onde zero corresponde à cor preta e 255 à cor branca). O processamento de imagens consiste num conjunto de operações matemáticas aplicadas a essas matrizes. No caso particular dos algoritmos de detecção de contornos, esta detecção está associada a um gradiente da intensidade na escala de cinzentos. Se esse gradiente exceder um determinado valor imposto, o *software* detecta que nessa região existe um contorno. Todo este processo é automaticamente realizado pelo *software* do tensiómetro. O algoritmo de implementação do método da gota pendente encontra-se descrito detalhadamente por (Harris & Byers 1989) e mais recentemente por (Cheng et al. 1990).

Relativamente ao procedimento experimental seguido, a gota pendente é gerada na agulha e diversas imagens são captadas pela câmara do tensiómetro, em intervalos de 80ms. Cada imagem é posteriormente processada automaticamente pelo *software*, que determina um valor para a tensão superficial. No final do ensaio determina-se então um valor médio. Para cada líquido testado, estes ensaios foram repetidos quinze vezes, sendo o valor final considerado para a tensão superficial, o valor médio da totalidade dos ensaios. Este procedimento foi seguido para avaliar a tensão superficial de todas as soluções utilizadas. A título ilustrativo, a Figura 2.6 mostra uma imagem retirada durante o processamento para determinação da tensão superficial pelo método da gota pendente.

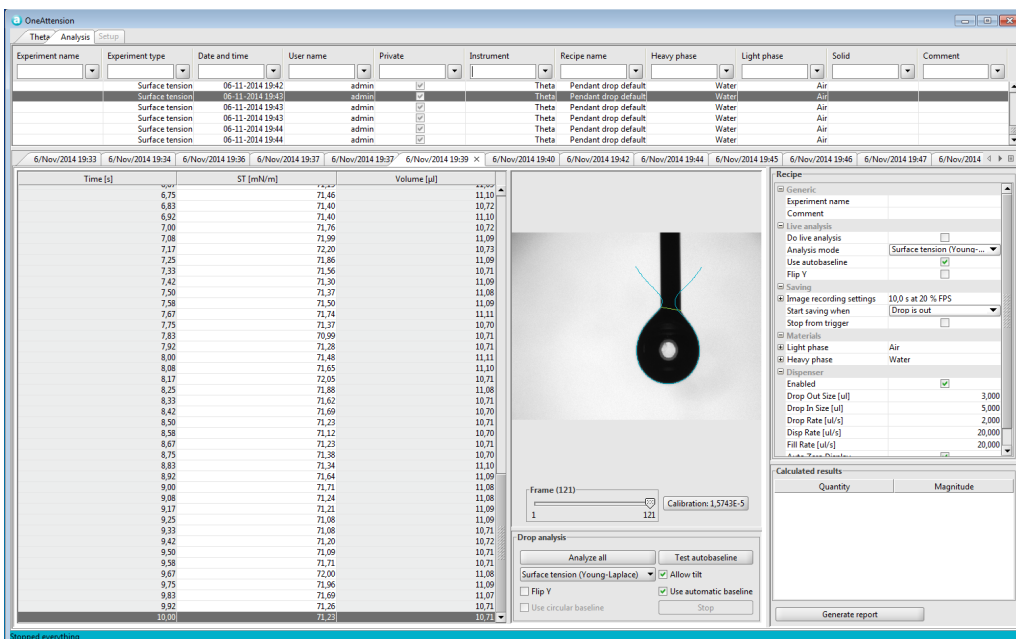


Figura 2.6: Imagem ilustrativa do cálculo da tensão superficial através do *software* One Attention.

A densidade das soluções foi avaliada usando um picnómetro de líquidos, embora se tenha verificado que a densidade de todas as soluções utilizadas é muito próxima da densidade da água, a 20°C. O mesmo se verificou para a viscosidade dinâmica, que foi considerada como aproximadamente constante e igual à da água a 20°C (1×10^{-3} kg/(ms)) (White 1994).

A Tabela 2.1 resume os valores destas propriedades, determinados para as soluções utilizadas nesta parte do trabalho.

Tabela 2.1: Propriedades físicas dos líquidos de trabalho utilizados.

	Densidade ρ [gcm ⁻³]	Tensão superficial γ_{LV} [Nm ⁻¹]
Água destilada	0,9980	72,2±0,7
NaCl _{100mM}	1,0470	71,3±0,3
Solução mimética de plasma	1,0059	73,8±0,4
BSA _{2,5nM}	1,0560	72,3±0,5

2.3.3 – Caracterização das superfícies

Como explicado na **secção 1**, as superfícies utilizadas para o transporte das amostras devem ser hidrofóbicas ou superhidrofóbicas. O ângulo de contacto é afectado pela rugosidade, ou mais especificamente pela topografia da superfície. Atualmente sabe-se que não é possível criar superfícies com as quais soluções aquosas tenham um ângulo de contacto superior a 120°, sem se alterar efetivamente essa topografia (por exemplo (Kietzig 2011)). Nesse contexto, criaram-se anteriormente inúmeras superfícies, microestruturadas com diversos padrões, preparadas para apresentarem diferentes características de molhabilidade. Estas superfícies foram fabricadas no Laboratório de Materiais Semicondutores e Conversão de Energia – LMSCE do Centro de Physica Moléculas do IST, usando *wafers* (bolachas) de silício, nas quais os diversos micro-padrões foram transferidos por litografia. Estes padrões foram então talhados na superfície por uma combinação de *wet e plasma etching*. O *plasma etching* produz radicais livres enérgicos, carga neutra, que vão reagir com o *photoresist* colocado durante o processo de litografia e com uma pequena camada de alumínio que foi depositada por cima da bolacha com o intuito de promover a altura dos pilares desejada até à superfície da bolacha. Quando este processo fica completo, coloca-se a bolacha dentro de um banho de produto corrosivo, que tem de ser agitada para alcançar um bom controlo do processo. Este banho pode ser com uma solução química que pode ser um ácido, uma base ou um álcool que vai remover seletivamente o material. Este processo tem o nome de *wet etching* que foi utilizado para remover os resíduos de filme de alumínio que ficaram durante o processo de *plasma etching*.

Deste processo resultaram superfícies microestruturadas, com padrões regulares de pilares de secção quadrangular, de lado a , distanciados entre si de λ e com uma altura de h_R , como identificado

na Figura 2.7a). A altura dos pilares foi medida por um perfilómetro Dektak 3 (Veeco) com uma resolução vertical de 200Angstroms (Figura 2.7b).

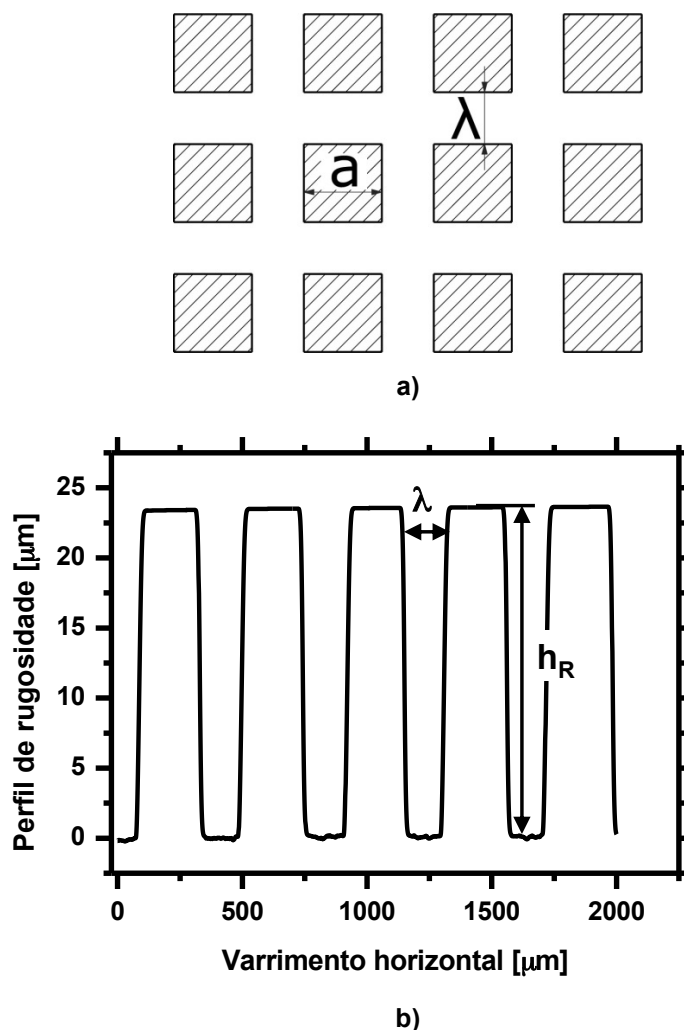


Figura 2.7: a) Esquema representativo da definição das dimensões a e λ que caracterizam a topografia das superfícies microestruturadas; b) exemplo de um perfil de rugosidade regular onde é possível quantificar as dimensões λ e h_R .

Para além destas superfícies, testaram-se também superfícies de Teflon (PTFE - politetrafluoroetileno) e de alumínio, que foram alteradas química e mecanicamente para serem superhidrofóbicas. Contrariamente às superfícies criadas a partir de *wafers* de silício, estas apresentam perfis de rugosidade estocásticos, pelo que, neste caso a rugosidade é quantificada por quantidades médias, nomeadamente a rugosidade média R_a (determinada de acordo com a norma BS1134) e a rugosidade média pico-a-vale R_z (calculada de acordo com a norma DIN4768), seguindo os procedimentos utilizados em trabalhos anteriormente apresentados na literatura (Moita & Moreira 2007) e (Moreira et al. 2010). Estas quantidades são avaliadas automaticamente pelo perfilómetro DekTak 3 (Veeco).

A molhabilidade de todas as superfícies criadas foi avaliada, medindo o ângulo de contacto estático com água, à temperatura ambiente. No total, testaram-se quinze superfícies, tendo-se selecionado apenas aquelas que apresentavam ângulos de contacto superiores a 100°. As principais características topográficas dessas superfícies estão resumidas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Topografia das superfícies utilizadas no presente estudo. a representa o comprimento do lado do quadrado de seção transversal de cada pilar nas superfícies micro-estruturadas, h_R é a altura dos pilares e λ é a distância entre os pilares.

Superfície	Material	Nº	a [μm]	h_R [μm]	λ [μm]	R_a [μm]	R_z [μm]
Micro- estruturadas	Wafer silício	S1	134	23	171	-	-
	Wafer silício	S2	173	23,4	112	-	-
Perfil estocástico de rugosidade	Alumínio revestido	S3	-	-	-	4,2	8
	PTFE	S4	-	-	-	~0	~0

2.3.4 – Medição dos ângulos de contacto

As medições dos ângulos de contacto foram efetuadas recorrendo ao método da gota séssil (Cheng et al. 1990), à temperatura ambiente (20°C) para todos os pares de líquido/superfície considerados no presente estudo, usando o tensiómetro óptico THETA (Attension). As medições realizaram-se no interior da câmara de Perspex, saturada com o líquido a medir à temperatura ambiente.

Gotas com um volume entre 2 a 3 μL são depositadas sobre cada uma das superfícies identificadas na Tabela 2.2. A câmara acoplada ao microscópio do tensiómetro grava então um conjunto de 120 imagens com intervalos de 80ms. A evolução temporal do ângulo de contacto é posteriormente representada graficamente e o ângulo estático obtido para cada ensaio. Este ângulo é determinado pela média de pontos, obtidos na fase final da medida, quando o valor do ângulo já não varia devido a efeitos viscoelásticos (Serro 2001).

O *software* utilizado para a medição do ângulo de contacto detecta o perfil geométrico da gota por análise da imagem, utilizando um algoritmo de detecção de contornos. A forma da gota é então ajustada numericamente a este perfil utilizando a equação de Young-Laplace, manipulada como descrito anteriormente na **subsecção 2.3.2** para a medição da tensão interfacial γ_{LV} . (Cheng et al. 1990) refere que a precisão da obtenção do perfil da gota por este algoritmo é de $\pm 0,1^\circ$. O ângulo de contacto é determinado diretamente através da medição do ângulo formado entre o sólido e a tangente à superfície da gota. Assim, o *software* traça uma tangente que vai definir o ângulo de contacto, tanto à direita como à esquerda da gota e apresenta ambos os valores. Cabe ao utilizador

avaliar se considera uma média dos dois valores obtidos ou não. A linha tangente é determinada pelo ponto onde o gradiente da equação de Young-Laplace cruza a linha de base. Esta linha pode ser determinada automaticamente ou manualmente, isto é pode ser determinada geometricamente por um algoritmo de imagem que detecta a fase sólida ou então identifica pontos de reflexão da gota ou então é definida pelo utilizador (método manual). O método manual foi o mais utilizado ao longo deste estudo, uma vez que o algoritmo não estava a detectar corretamente a fronteira entre a gota e a fase sólida.

A Figura 2.8 exemplifica, para vários casos, como o *software* do tensiómetro (One Attention) traça a linha de base e a tangente ao perfil da gota para medir os ângulos de contacto. A Figura 2.9 ilustra o processo de medida. Para cada superfície, efetuaram-se cinco a seis medidas, em diferentes regiões da superfície, para se obterem valores médios representativos de toda a superfície.

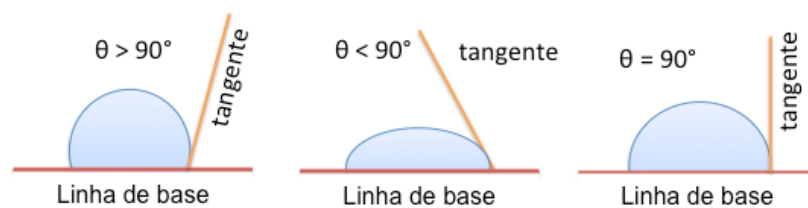


Figura 2.8: Esquema exemplificativo do posicionamento da linha de base e da linha tangente para a medição do ângulo de contacto estático. Imagens adaptadas de: <http://www.biolinscientific.com/attention/applications/?card=AA7>.

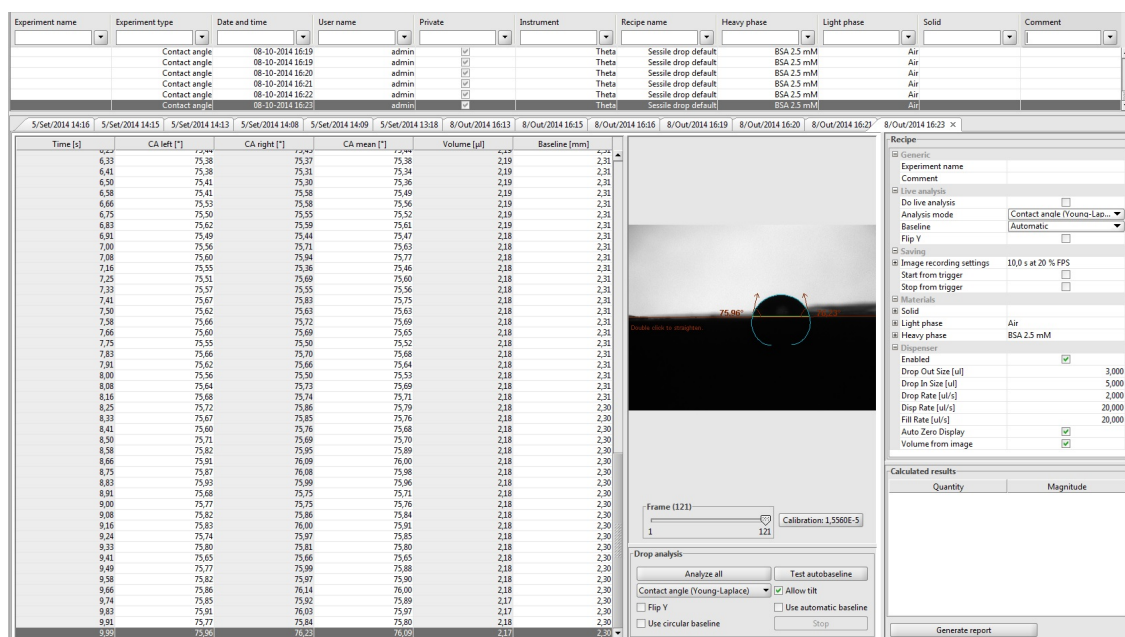


Figura 2.9: Imagem ilustrativa da medição do ângulo de contacto estático através do software One Attention.

Os ângulos quasi-estáticos de avanço e recuo foram também avaliados, mas apenas para estimar o valor da histerese, que é útil na discussão dos resultados apresentados na **subsecção 2.4**. Assim sendo, para a medição dos ângulos quasi-estáticos de avanço, a gota é depositada sobre a superfície e o caudal de líquido que alimenta a gota é controlado por forma a fazer variar o seu volume muito lentamente. O ângulo de avanço é então medido um pouco antes do avanço da interface. O ângulo de recuo é obtido da mesma forma, mas agora controlando a sucção de líquido para que o volume da gota diminua lentamente. Este procedimento encontra-se detalhadamente descrito, por exemplo por (Kietzig 2011).

2.4 – Metodologia de pré-seleção dos pares líquido-superfície a testar

Após a pré-seleção das superfícies a utilizar, baseada na medição dos ângulos de contacto estáticos com água, mediram-se os ângulos com as restantes soluções preparadas. Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 2.3 e confirmam a obtenção de ângulos de contacto estáticos elevados (superiores a 100°) entre as superfícies pré-selecionadas em todas as soluções estudadas. Não se registaram alterações significativas do ângulo estático para diferentes concentrações de cloreto de sódio, pelo que se apresentam aqui apenas os resultados obtidos para a concentração de 100mM.

Tabela 2.3: Representação dos ângulos de contacto em equilíbrio para os pares líquido-superfície em estudo.

	Água	NaCl (100mM)	Solução mimética do plasma
S1	140±6°	144±5°	145±5°
S2	116±5°	111±5°	116±6°
S3	152±4°	148±6°	150±6°
PTFE (S4)	112±5°	112±6°	112±5°

A obtenção de ângulos estáticos elevados é uma característica essencial que tem de ser verificada nas superfícies a utilizar nos ensaios de *electrowetting*, dado que é indicativa da hidrofobicidade das superfícies com as gotas dos líquidos que se pretende transportar. Porém, durante as medições, uma observação cuidada da linha de contacto não permitiu assegurar uma molhabilidade heterogénea estável e a previsão do ângulo aparente, pelas equações (2.5) e (2.6) também não permitiu avaliar com segurança a ocorrência de molhabilidade heterogénea estável, nas superfícies selecionadas. Seguindo a sugestão de (He et al. 2003), realizou-se um ensaio adicional que consistiu em deixar cair a gota de uma pequena altura, *H*, para tentar compreender se o

aparente estado de molhabilidade heterogéneo, indicado pelos ângulos estáticos elevados se mantinha ou não. Neste ensaio, o impacto das gotas de cada uma das soluções foi gravado utilizando a câmara de alta velocidade. As imagens foram adquiridas à taxa de 2200 *frames* por segundo. O impacto das gotas foi então visualizado e as imagens foram processadas para quantificar o diâmetro de espalhamento da gota $d(t)$, tal como definido na Figura 2.10.

As gotas testadas neste ensaio foram geradas pelo mesmo aparato experimental descrito na **subsecção 2.2**. O diâmetro inicial e de espalhamento das gotas foram determinados por análise das imagens, usando um algoritmo de detecção de contornos idêntico ao implementado no *software* do tensiómetro. O algoritmo de processamento de imagens foi implementado em ambiente Matlab, em trabalhos anteriores, nomeadamente por (Moita 2004), (Moita 2009) e posteriormente por (Hermann 2013). Dado que este tipo de processamento é muito sensível a pequenas variações na qualidade da imagem, medidas representativas do diâmetro inicial e do diâmetro de espalhamento foram também efectuadas recorrendo a um processamento manual da imagem em Photoshop, para verificar se o algoritmo de processamento automático estava a detectar os contornos das gotas corretamente. Cada curva apresentada resulta de uma média de cinco curvas medidas para gotas incidentes na superfície, em condições idênticas. O diâmetro inicial das gotas é de $D_0=3,0\pm 0,2\text{mm}$ e a sua velocidade de impacto é de $U_0=0,44\text{m/s}$, avaliada de acordo com a equação da queda de um grave, $U_0=(2gH)^{1/2}$. As medidas do diâmetro de espalhamento são obtidas com uma precisão de $\pm 25\mu\text{m}$. A cada impacto, as superfícies são lavadas num banho de água destilada, seguido de um banho de acetona e de um novo banho de água destilada, sendo finalmente secas.

A Figura 2.10 ilustra o processo de impacto e espalhamento de uma gota da solução mimética do plasma sanguíneo sobre a superfície S3, $t=0\text{ms}$ corresponde ao instante em que a gota contacta com a superfície.

Após o impacto a gota espalha-se radialmente sob a forma de um filme de líquido denominado por lamela. Nos ensaios de *electrowetting* a gota será igualmente forçada a espalhar-se mas a uma velocidade inferior. O diâmetro de espalhamento $d(t)$ aumenta no tempo, dominado pelas forças de inércia, até atingir um valor máximo (neste caso atingido sensivelmente a $t=5,1\text{ms}$), a partir do qual o líquido retrai, por ação das forças de tensão superficial. Dependendo de vários factores, que podem promover mais ou menos a dissipação da energia cinética durante o espalhamento e recuo da gota, este processo pode repetir-se diversas vezes até a gota atingir o seu diâmetro de equilíbrio.

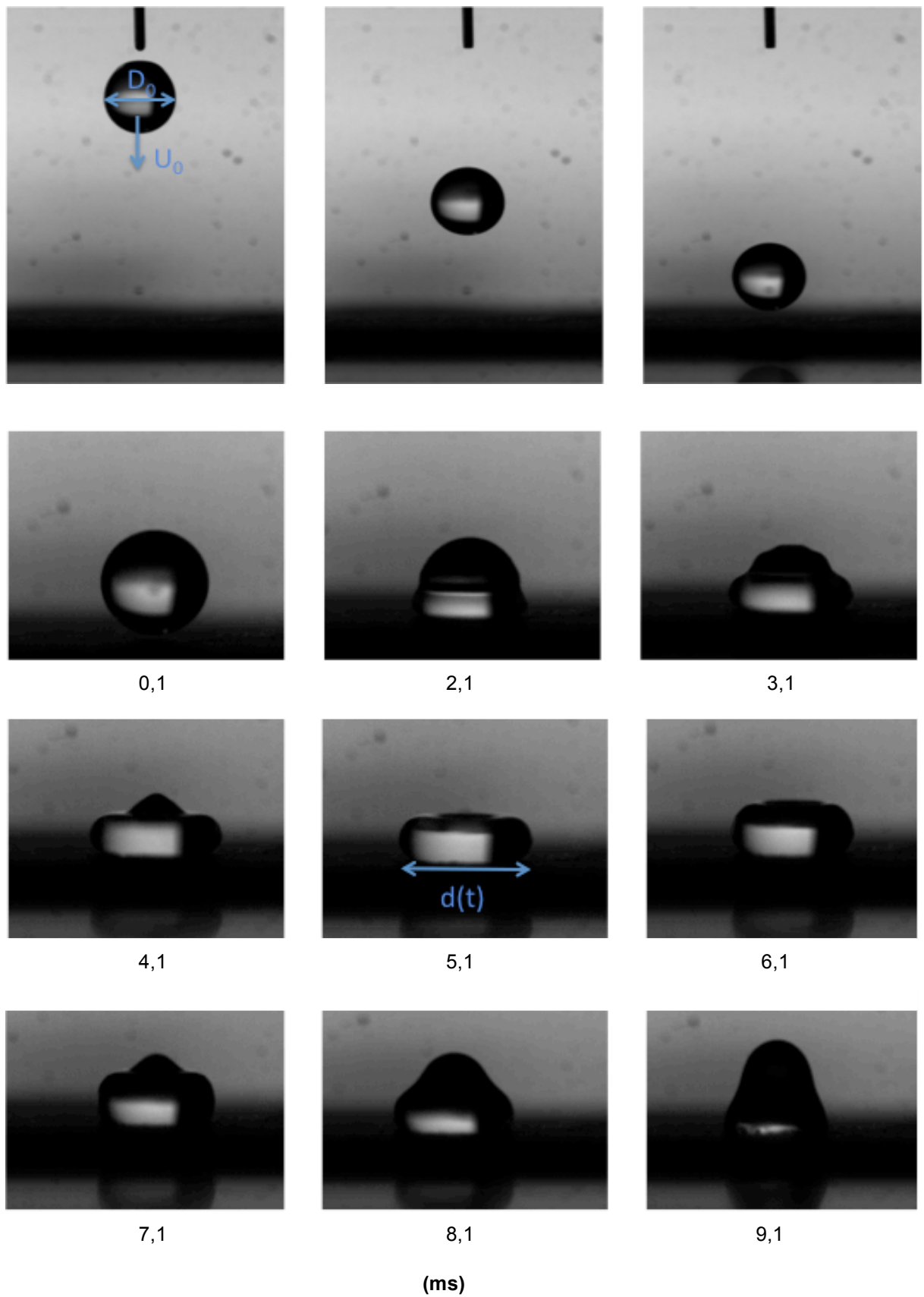


Figura 2.10: Espalhamento de uma gota de solução mimética de plasma ($D_0=3,2\text{mm}$) forçado pelo impacto da gota sobre a superfície S3, a uma velocidade $U_0=0,44\text{m/s}$.

Vários estudos sobre o comportamento dinâmico de gotas incidentes em superfícies demonstram que o processo de espalhamento e recuo da gota dependem fortemente das condições de molhabilidade (por exemplo, (Rioboo et al. 2001), (Moreira et al. 2010)). Assim, se a molhabilidade da superfície pela gota for baixa, isto é, se os ângulos de contacto forem elevados, a gota tende a espalhar-se rapidamente e a apresentar um movimento de recuo acentuado. Este comportamento não está no entanto relacionado apenas com os ângulos de contacto altos. Efetivamente, se o regime de molhabilidade heterogéneo não for estável, o líquido da gota vai penetrar nas irregularidades da superfície que vão contribuir para a histerese. Por outro lado, a dissipação viscosa durante o processo de espalhamento é também promovida pela rugosidade da superfície, tanto durante o processo de espalhamento como no de recuo. Naturalmente que o líquido no interior da lamela é acelerado durante os primeiros milissegundos após o impacto e vai sendo desacelerado à medida que a lamela se aproxima do diâmetro máximo. Assim, quanto maior for a dissipação ocorrida durante o espalhamento, menos acentuado será o movimento de recuo.

Para evitar uma descrição exaustiva de resultados idênticos, discute-se apenas o espalhamento das gotas do fluido biológico (a solução mimética de plasma). A Figura 2.11 apresenta o diâmetro de espalhamento da gota da solução mimética de plasma sobre as diversas superfícies identificadas na Tabela 2.3, para as quais se obtiveram ângulos de contacto estáticos elevados. A Figura 2.11 mostra uma evolução idêntica do aumento do diâmetro da gota até se atingir o diâmetro máximo, durante o espalhamento da gota sobre todas as superfícies. Dado que o processo de espalhamento é inicialmente dominado pelas forças de inércia, não se verificam diferenças significativas para as curvas obtidas, até próximo do instante onde ocorre o diâmetro máximo, no qual as forças de inércia começam a ser equilibradas pelas forças de tensão superficial.

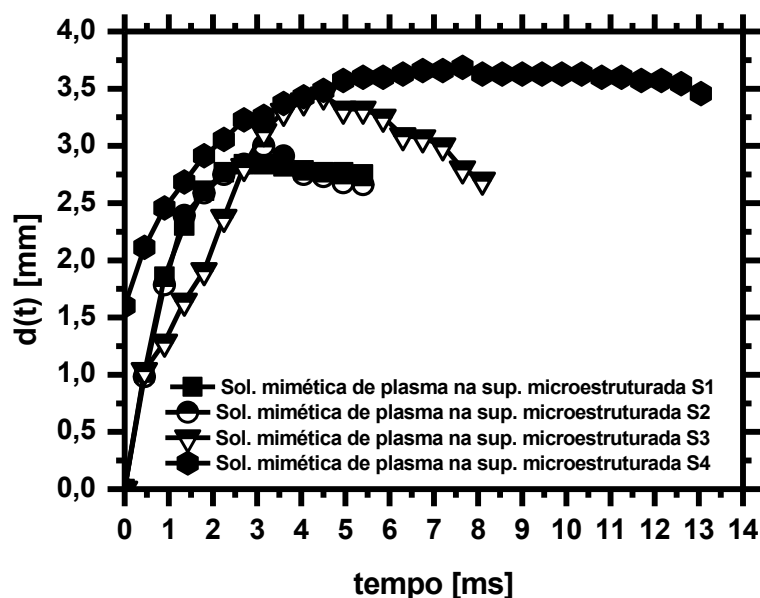


Figura 2.11: Representação do espalhamento da simulação do plasma sanguíneo com $D_0=3,2\text{mm}$ e $U_0=0,44\text{m/s}$ sobre várias superfícies sem atuação electrostática.

Porém, é bem evidente que as curvas obtidas sobre as superfícies S1 e S2 atingem rapidamente o valor do diâmetro máximo (para $t=4\text{ms}$ após o impacto) mais cedo que as nas outras superfícies, sendo este valor máximo muito inferior ao obtido na superfície S3. Esta evolução das curvas pode justificar-se pela acentuada dissipação de energia ocorrida durante o espalhamento, devido ao estabelecimento de um regime de molhabilidade heterogéneo instável, nas superfícies S1 e S2. Assim, apesar de no equilíbrio, se conseguirem medir ângulos de contacto elevados entre estas superfícies e a solução mimética de plasma, durante o processo de espalhamento forçado pelo impacto, o líquido penetra entre os micropilares, que atuam agora no sentido de contribuir para a dissipação da energia durante o espalhamento. Consequentemente, o diâmetro máximo obtido é inferior e o processo de recuo é muito lento (não foi capturado pelas imagens analisadas, apenas qualitativamente). Este comportamento contrasta com o registado durante o espalhamento da gota sobre a superfície S3, que após atingir o diâmetro máximo, possui ainda energia de superfície suficiente para iniciar um processo de recuo do líquido, já bem evidente entre os instantes $t=5$ e $t=8\text{ms}$ após o impacto. Na superfície de PTFE (S4), o processo de recuo é menos existente mas ainda se observa, ao contrário do que acontece nas superfícies S1 e S2. A dissipação de energia na linha de contacto é proporcional à histerese (Pereira et al. 2014). A histerese medida foi superior a 30° para todas as superfícies, excepto para a PTFE (S4), para a qual a histerese é aproximadamente igual a 19° e para a superfície S3, para a qual a histerese é aproximadamente igual a 8° , o que corrobora a explicação do andamento da curva de espalhamento nestas superfícies, em comparação com as superfícies S1 e S2.

No espalhamento induzido por *electrowetting*, a velocidade do líquido deverá ser inferior à obtida neste caso de impacto, pelo que a dissipação por efeito das forças viscosas deverá ser menos significativa. Porém, a dissipação na linha de contacto que é proporcional à histerese é igualmente relevante. Tendo em conta que para se conseguir transportar a gota por *electrowetting*, o movimento de espalhamento tem de ser o mais reversível possível, por forma a que o líquido recue o suficiente para induzir movimento, superfícies que promovam uma elevada dissipação de energia, tais como S1 e S2 não devem ser utilizadas. Neste contexto, apenas as superfícies S3 e a PTFE (S4) foram seleccionadas para realizar os ensaios de *electrowetting*.

Secção 3

Caracterização da molhabilidade de biofluidos sob ação electrostática (*electrowetting*)

3.1 – Fundamentos teóricos sobre *electrowetting*

O *electrowetting* pode ser definido como uma alteração das propriedades de molhabilidade, mais concretamente do ângulo de contacto sob a aplicação de um campo eléctrico.

Geralmente, os estudos realizados em *electrowetting* encontram-se focados no processo de transporte da gota, consideram o efeito das propriedades dos electrólitos (líquidos que compõem a gota) na molhabilidade de todo o sistema, em substratos sólidos e planos, com uma configuração semelhante à esquematizada na Figura 3.1. Em muitos destes trabalhos, as gotas são compostas por soluções aquosas de sais e, apesar de existirem aplicações que requerem dimensões características das gotas na ordem do micrómetro ou mesmo do nanómetro, as gotas usadas nestes estudos mais fundamentais possuem tipicamente diâmetros da ordem dos milímetros. O meio ambiente utilizado nesta técnica pode ser ar ou outro fluido que seja imiscível com o que compõe a gota, como por exemplo um óleo (Zhao & Wang 2013). Neste último caso a configuração considera o uso de microcanais e não de superfícies microfluídicas.

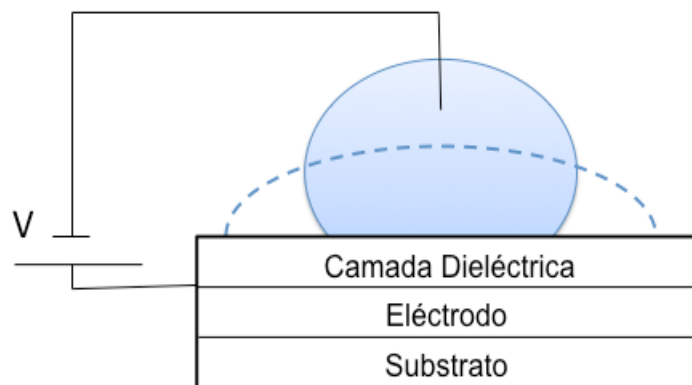


Figura 3.1: Esquema da configuração habitualmente usada em estudos de *electrowetting*.

Como referido na **secção 1**, o *electrowetting* é utilizado em substratos homogéneos. A descrição do *electrowetting* do ponto de vista termodinâmico e electroquímico está na base da derivação de Lippmann, que essencialmente usa os conceitos de tensão interfacial e energia livre de Gibbs para obter o ângulo de contacto sob ação de um campo eléctrico.

Após a aplicação de uma tensão dU , ocorre a formação espontânea de uma dupla camada eléctrica na interface sólido-líquido que composta pelas cargas distribuídas sobre a superfície do

metal e por uma nuvem de carga oposta de contra-íões distribuídos sobre o lado líquido da interface. Esta acumulação de cargas é um processo espontâneo, que conduz a uma redução da tensão interfacial efectiva γ_{sl}^{eff} . Assim, obtém-se:

$$d\gamma_{sl}^{eff} = -\rho_{sl} dU \quad (3.1)$$

onde $\rho_{sl} = \rho_{sl}(U)$ é a densidade de carga da superfície de contra-íões. A dependência da tensão γ_{sl}^{eff} é calculada através da integração da equação (3.1). Regra geral, este integral requer algum conhecimento acerca da distribuição de tensão dependente de contra-íões perto da interface. Para uma melhor simplificação considera-se que os contra-íões estão todos localizados a uma distância d_H fixa, na ordem dos nanómetros, a partir de uma superfície (modelo de Helmholtz). Neste caso em concreto, a camada dupla tem uma capacidade por unidade de área fixa, $c_H = \frac{\epsilon_0 \epsilon_1}{d_H}$, onde ϵ_1 é a constante dieléctrica do líquido e ϵ_0 é a permissividade no vácuo. Assim sendo, obtém-se:

$$\gamma_{sl}^{eff}(U) = \gamma_{sl} - \int_{U_{pzc}}^U \rho_{sl} d\tilde{U} = \gamma_{sl} - \int_{U_{pzc}}^U c_H \tilde{U} d\tilde{U} = \gamma_{sl} - \frac{\epsilon_0 \epsilon_1}{2d_H} (U - U_{pzc})^2 \quad (3.2)$$

onde U_{pzc} é o potencial (diferença) de carga zero. É de salientar que muitos materiais sólidos adquirem uma carga espontânea quando são imersos em soluções de electrólitos com a tensão zero, sendo U_{pzc} a tensão necessária para compensar esta carga espontânea.

A contribuição química γ_{sl} para a energia interfacial, que surge na equação de Young (1.1), assume-se independente da tensão aplicada. Assim, para se obter a resposta do ângulo de contacto à aplicação do campo eléctrico, é necessário inserir a equação (3.2) na equação de Young (Mugele & Baret 2005). Seguindo o procedimento de Lippmann e colocando a gota de electrólito diretamente sobre a superfície do sólido que atua como eléctrodo, obtém-se a seguinte equação:

$$\cos \theta_e = \cos \theta + \frac{\epsilon_0 \epsilon_1}{2\gamma_{lv} d_H} (U - U_{pzc})^2 \quad (3.3)$$

Neste caso existirá um problema, se o electrólito for uma solução aquosa, uma vez que a água sofrerá electrólise. Como referido na **secção 1**, essa questão foi resolvida por (Berge 1993) que introduziu uma camada dieléctrica entre o eléctrodo e o electrólito. Assim, considerando a diferença de tensão aplicada V e impondo uma camada dieléctrica entre a gota e o eléctrodo pode obter-se a forma mais habitual da equação de Young-Lippmann (Yoon & Garrell 2003):

$$\cos \theta_e = \cos \theta + \frac{\varepsilon \varepsilon_2}{2\gamma_{lv}d_H} V^2 \quad (3.4)$$

Se os ensaios não forem realizados em vácuo, mas sim ao ar, como é o caso do presente trabalho, ε_2 é a constante dielétrica do ar e ε constante dielétrica da camada dielétrica. θ_e é o ângulo de contacto quando a diferença de tensão é aplicada, θ é o ângulo de contacto para $V=0$ e d_H é a espessura do filme de polímero, neste caso PTFE. De acordo com a equação de Lippmann, quando a tensão aplicada aumenta a tensão interfacial liquido-vapor (tensão superficial do líquido) diminui, assim como o ângulo de contacto. A equação de Young-Lippmann é válida para tensões relativamente baixas. Vários autores tais como (Dubois et al. 2006) verificaram que os valores de ângulo de contacto teóricos, previstos pela equação de Lippmann estavam em concordância com os resultados experimentais apenas para tensões inferiores a 60V. Uma das razões apontadas para este desvio é o facto do ângulo de contacto tender, a partir de uma dada tensão, para um valor constante, num fenómeno de saturação, que não está previsto pela descrição efectuada por Lippmann. O motivo para esta saturação do ângulo de contacto ainda não está completamente esclarecido tal como referido por exemplo por (Yoon & Garrell 2003) e por (Restolho et al. 2009).

Dado que, na bibliografia consultada, a maioria dos estudos realizados para observar a alteração de molhabilidade das gotas de electrólito em *electrowetting* foi realizada usando soluções aquosas de sais e nalguns casos como em (Dubois et al. 2006) e em (Restolho et al. 2009) líquidos iónicos, existe muito pouca informação disponível para a aplicação usando biofluidos. Nesta parte do trabalho, para além das soluções de NaCl deu-se particular atenção à solução mimética do plasma e em particular a um dos seus componentes, a proteína BSA. A detecção e análise de proteínas é muito importante em diversas aplicações em bioengenharia e, tal como apresentado na revisão bibliográfica (**secção 1**) existe ainda um número considerável de estudos envolvendo esta proteína, embora a maioria se tenha focado em processos de adsorção. Por outro lado, como as proteínas têm carga, podem eventualmente influenciar o processo de espalhamento da gota nos ensaios de *electrowetting*.

A carga das proteínas está associada ao seu ponto isoelétrico, que é o valor de pH para o qual a sua carga eléctrica líquida é igual a zero. Alterando o pH pode-se assim variar a carga das moléculas da proteína o que poderá influenciar também o processo de espalhamento da gota. Neste contexto, a análise dos resultados obtidos usando a solução de BSA considera, em particular, a influência da concentração desta proteína na solução, bem como a forma como a variação do pH da solução afecta o processo de espalhamento da gota.

A atuação electrostática e a variação do pH da solução poderão alterar a estrutura molecular da proteína. Quando as proteínas são sujeitas a condições distintas daquelas em que foram produzidas, podem perder a sua estrutura secundária e/ou terciária, ou seja, o arranjo tridimensional da cadeia polipeptídica é rompido, num processo denominado por desnaturação. Geralmente, uma proteína desnaturada perde quase sempre a sua atividade biológica característica, pelo que será importante neste trabalho verificar em que condições de *electrowetting* a proteína se mantém viável.

3.2 – Instalação experimental: configuração utilizada nos ensaios de *electrowetting*

A configuração de *electrowetting* utilizada é semelhante à descrita nos fundamentos teóricos e está representada na Figura 3.2. Assim sendo, a superfície hidrofóbica selecionada foi o Teflon (Goodfellow Cambridge Ltd.) e o cilindro de cobre irá funcionar como contra-eléctrodo. Os ensaios decorrem no interior de uma câmara de Perspex, que fica situada na base do tensiómetro óptico da Attension modelo Theta como descrito anteriormente na **secção 2**.

Durante a colocação do Teflon podem formar-se pequenas bolhas que dificultam a condução. Para reduzir esse efeito é aplicada uma pequena quantidade de uma solução de cloreto de sódio entre o Teflon e o cobre, como recomendado por (Restolho et al. 2009). Utilizou-se um eléctrodo de tungsténio com um diâmetro de 25 μ m (Goodfellow, Cambrigde Ltd) que é colocado no interior na gota, como representado na Figura 3.2.

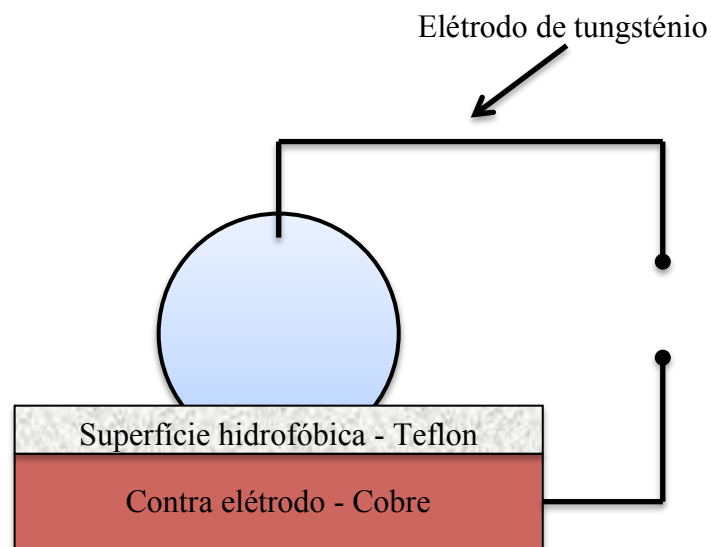


Figura 3.2: Esquema representativo da configuração de *electrowetting* utilizada neste trabalho.

O eléctrodo e o contra eléctrodo são ligados a uma fonte de alimentação da Sorensen Company modelo DCR600-.75B e os ensaios são realizados aplicando valores sucessivamente superiores de tensão, com acréscimos de 25V numa gama entre 0 a 220V. Apesar de alguns autores, como por exemplo (Jones 2005) defenderem que os sistemas de *electrowetting* respondem melhor usando corrente alterna, neste trabalho utilizou-se corrente contínua. Como explicado por (Mugele & Baret 2005) a resposta em *electrowetting* à variação de frequência depende das propriedades do líquido. Para baixas frequências o líquido pode ser considerado como um condutor perfeito, mas em frequência limite pode atuar como um dieléctrico. Os resultados apresentados por (Mugele & Baret 2005) sugerem que a frequência da corrente alterna não deveria ser suficientemente elevada para

que o líquido se comporte como um dielétrico. Porém, o estudo do efeito da frequência não foi realizado para os líquidos usados no presente trabalho, pelo que se optou por usar corrente contínua. Por outro lado, o estudo do efeito da frequência na eficácia do transporte das gotas está previsto para uma fase futura do projeto de desenvolvimento do sistema de transporte de amostras, pelo que a sua realização saía fora do âmbito desta fase do trabalho.

O filme de Teflon utilizado possui uma espessura de 10 μ m, como recomendado por (Restolho et al. 2009). Apesar desta não ser a superfície que, de acordo com o estudo apresentado na **secção 2.4** seria a mais indicada para os ensaios de *electrowetting* dado que não era a que possuía uma maior superhidrofobidade a todas as soluções testadas, nem a que menos promovia a dissipação de energia na linha de contacto em condições de espalhamento forçado da gota, verificou-se que a melhor superfície (S3) tem uma espessura muito elevada para ser utilizada nestes ensaios, pelo que se optou por usar o 2º substrato que apresentava as melhores características, neste caso a superfície de Teflon (S4).

3.3 – Materiais e métodos

3.3.1 – Preparação das soluções

Nesta fase do trabalho e tendo em conta a relevância dos estudos envolvendo proteínas na área da Bioengenharia, para além das soluções de cloreto de sódio e da solução que simula o plasma sanguíneo, estudaram-se soluções adicionais onde se usou apenas a proteína BSA. Estas soluções que contém a proteína BSA (Sigma) foram testadas para concentrações de 1mM, 2,5mM, 5mM e 50mM. Tal como as anteriores, estas soluções foram também preparadas para um volume de 20ml em água destilada.

Para estudar o efeito do pH foi necessário elaborar duas soluções tampão, uma de citrato, para pH=5 e outra de carbonato para pH=10. As soluções foram preparadas de acordo com o protocolo próprio (Promega 2012). As medições do pH foram efectuadas na 691 pH Meter da Metrohm.

3.3.2 – Medição dos ângulos de contacto estáticos e dos diâmetros de espalhamento

Para os ensaios de medição da variação do ângulo de contacto estático em *electrowetting*, uma gota de cada solução em estudo é depositada sobre o substrato de Teflon, no interior da câmara de Perspex, saturada com o líquido em estudo à temperatura ambiente. Posteriormente, o eléctrodo é colocado em contacto com a gota sendo-lhe aplicada uma tensão. Durante este período de atuação, retiram-se imagens pelo sistema de aquisição de imagens do tensiómetro (câmara acoplada a um microscópio), pelo processo descrito na **subsecção 2.3.4**, que são posteriormente analisadas, para determinação do ângulo de contacto. Aplica-se uma nova tensão e repete-se o processo até se atingir um valor máximo de tensão de 220V.

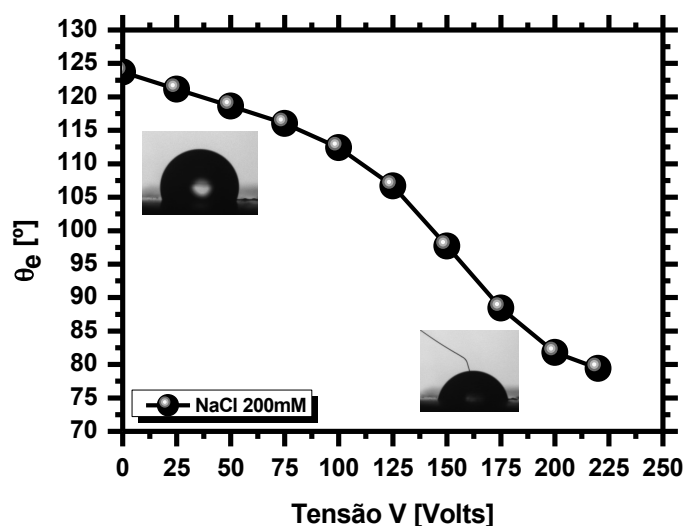


Figura 3.3: Curva ilustrativa do ângulo de contacto estático em função da tensão aplicada a uma gota de NaCl com uma concentração de 200mM. O diâmetro inicial das gotas é $D_0=2,8\text{mm}$.

Este procedimento é repetido pelo menos 6 vezes para se obterem pontos representativos da evolução do ângulo de contacto em função da tensão aplicada. Assim, cada curva obtida, semelhante à apresentada na Figura 3.3, a título ilustrativo resulta de uma média de pelo menos 6 curvas. O primeiro valor obtido na curva corresponde ao ângulo de contacto medido para $V=0\text{V}$, que serve de controlo a possíveis alterações significativas de molhabilidade no par líquido-substrato que não tenham sido previstas no estudo de molhabilidade previamente realizado, sem atuação electrostática (descrito na **secção 2**).

Complementarmente a esta caracterização, mediram-se também os diâmetros de espalhamento das gotas, durante a atuação electrostática, por processamento das imagens captadas pela câmara de alta velocidade Phantom v4.2 da Vision Research Inc, que é colocada perpendicularmente ao plano de deposição da gota. Contrariamente à medição dos ângulos estáticos, neste caso forma-se uma nova gota numa região diferente do substrato a cada valor novo da tensão que é testado.

As imagens são gravadas a uma taxa de aquisição fixa de 2200 *frames* por segundo. O diâmetro de espalhamento das gotas é avaliado no tempo, por processamento das imagens usando o mesmo procedimento já descrito na **secção 2**. Cada curva da evolução temporal do diâmetro de espalhamento da gota resulta da média de pelo menos 6 medições obtidas em condições idênticas. As medidas são efectuadas com um erro de $\pm 25\mu\text{m}$.

3.3.3 – Testes de viabilidade da proteína

Para verificar a viabilidade da proteína, nomeadamente se sofreu desnaturação durante os ensaios de *electrowetting* observaram-se os espectros de absorção das soluções de BSA que foram analisadas antes e depois dos ensaios de *electrowetting*. Este espectros foram obtidos através de um espectrofotómetro 2000c NanoDrop/2000 UV-Vis da Thermo Scientific. A análise dos espectros

foi realizada na gama de comprimentos de onda de 250-400nm, utilizando um volume de 2µl das soluções.

3.4 – Apresentação e discussão dos resultados

3.4.1 – Efeitos de concentração

Os efeitos da concentração do componente biológico foram inicialmente investigados avaliando a evolução do ângulo de contacto em função da tensão aplicada. Antes porém, avaliou-se este efeito para as soluções de cloreto de sódio. A Figura 3.4 apresenta a evolução do ângulo de contacto estático em função da tensão aplicada para diversas concentrações de cloreto de sódio. Os resultados sugerem um ligeiro efeito da concentração: o ângulo de contacto diminui mais acentuadamente com a tensão aplicada quando a concentração aumenta de 50 a 20mM. Apesar das curvas não se iniciarem todas para o mesmo valor de θ_e (ângulo de contacto com atuação electrostática) para $V=0$, devido a ligeiras heterogeneidades que existem sempre no substrato, o declive das curvas é ligeiramente superior para as soluções com concentrações mais elevadas. Porém continuando a aumentar a concentração de NaCl, a curva obtida aproxima-se novamente daquela das concentrações menores, o que sugere que depois de um dado valor de concentração “ótimo” o efeito do aumento da concentração é prejudicial e deverá dificultar o espalhamento da gota.

A maioria dos autores tais como (Berge 1993) e (Verheijen & Prins 1999) descreve um efeito insignificante da concentração de NaCl sobre a diminuição induzida por *electrowetting* do ângulo de contato. Porém, as concentrações utilizadas são geralmente inferiores às consideradas neste trabalho. A seleção de concentrações tão elevadas relaciona-se com a sua relevância em termos de estudos de biofluidos. Por exemplo o plasma sanguíneo apresenta uma concentração de NaCl de 100mM que é da ordem das concentrações consideradas neste trabalho. Esta evolução do ângulo de contacto, incluindo a ocorrência de valores máximos de concentração, a partir dos quais o espalhamento da gota passa a ser dificultado, pode explicar-se pela adsorção de sais pelo substrato, que provoca uma alteração local da molhabilidade do substrato (Quinn et al. 2005), (Mugele & Baret 2005).

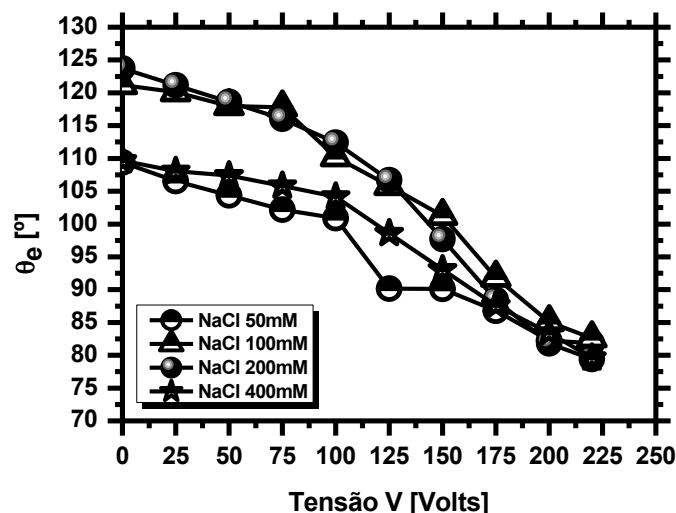


Figura 3.4: Ângulo de contacto em função da tensão aplicada para soluções de NaCl a diferentes concentrações. O diâmetro inicial das gotas é $D_0=2,8\text{mm}$.

A adsorção de BSA pelo substrato pode de facto justificar a evolução dos ângulos de contacto com a tensão aplicada, representados na Figura 3.5. Assim, verifica-se uma diminuição dos ângulos ligeiramente mais acentuada, para um pequeno aumento da concentração da BSA de 1 para 2,5mM, mas continuando a aumentar a concentração da proteína, o ângulo atinge rapidamente uma situação de saturação em que praticamente não varia com a aplicação da tensão.

Este comportamento é concordante com os resultados apresentados por (Yoon & Garrell 2003) e por (Mugele & Baret 2005) que argumentam que a adsorção de biomoléculas e proteínas conduz geralmente a um aumento local da molhabilidade e do histerese. Adicionalmente, diversos autores referem que as biomoléculas são prontamente e irreversivelmente adsorvidas em superfícies hidrofóbicas tais como Teflon (Rupp & Axmann 2002) (Freitas 2003).

Este processo de adsorção é facilmente afectado por propriedades biomoleculares ou superficiais tais como tamanho, carga, estabilidade da estrutura, composição, hidrofobia, a heterogeneidade e potencial (Horbett Thomas & Brash John 1987), mas da mesma forma, afecta o espalhamento e a reversibilidade em sistemas de *electrowetting* (Bayiati et al. 2007).

Dado que nestes ensaios, a gota é depositada na superfície e aí permanece sendo-lhe então aplicadas tensões sucessivamente superiores, o tempo de duração do ensaio é suficiente para que ocorra a adsorção da proteína, que altera a molhabilidade na linha de contacto e não permite que o ângulo decresça mais.

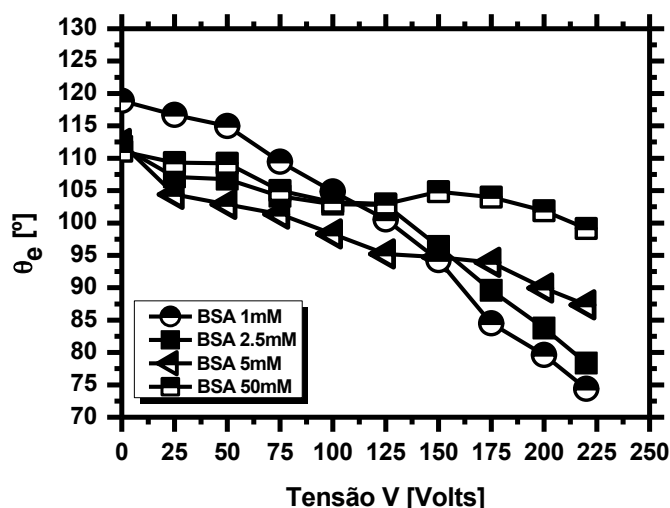


Figura 3.5: Ângulo de contacto em função da tensão aplicada para soluções de BSA com diferentes concentrações. O diâmetro inicial das gotas é $D_0=2,8\text{mm}$.

O aumento da concentração da proteína favorece a possibilidade de adsorção. Olhando para uma representação equivalente, mas desta vez apresentando $\cos\theta_e$ em função de V^2 para as soluções de BSA com as concentrações extremas de concentrações de 1mM e 5mM, tal como representado na Figura 3.6, é mais fácil detectar uma tendência nos valores experimentais obtidos para as concentrações mais elevadas em evoluírem para um patamar, para as concentrações superiores. Os valores experimentais são também confrontados com os valores teóricos obtidos pela equação de Young-Lippmann, apresentados por linhas. Tal como esperado, de acordo com as diversas referências consultadas, a concordância entre eles é baixa e resume-se apenas aos 2 ou 3 primeiros pontos, que se obtém quando as tensões aplicadas são relativamente baixas (inferiores a 100V).

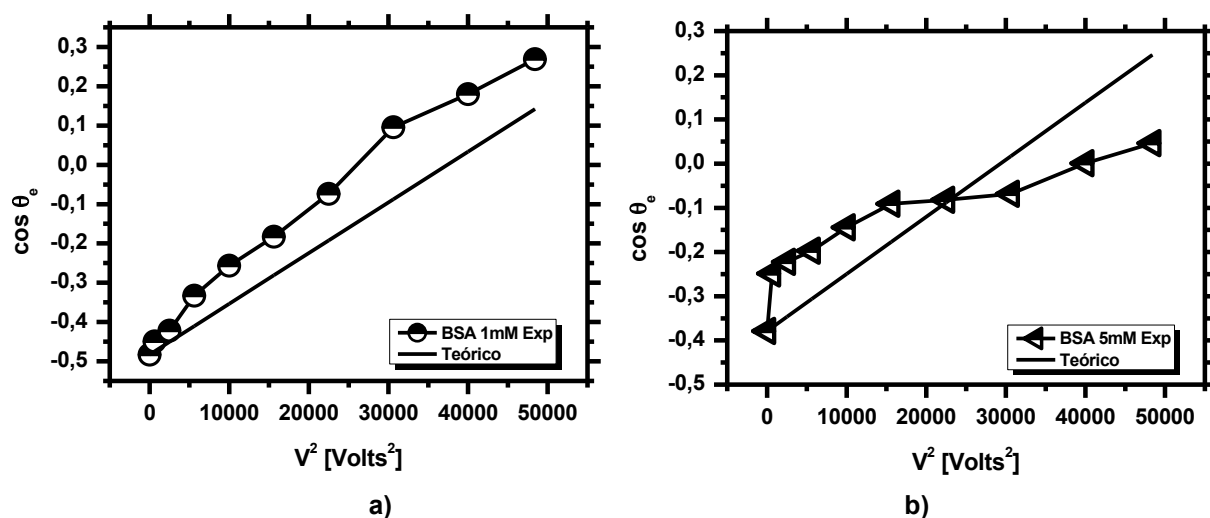
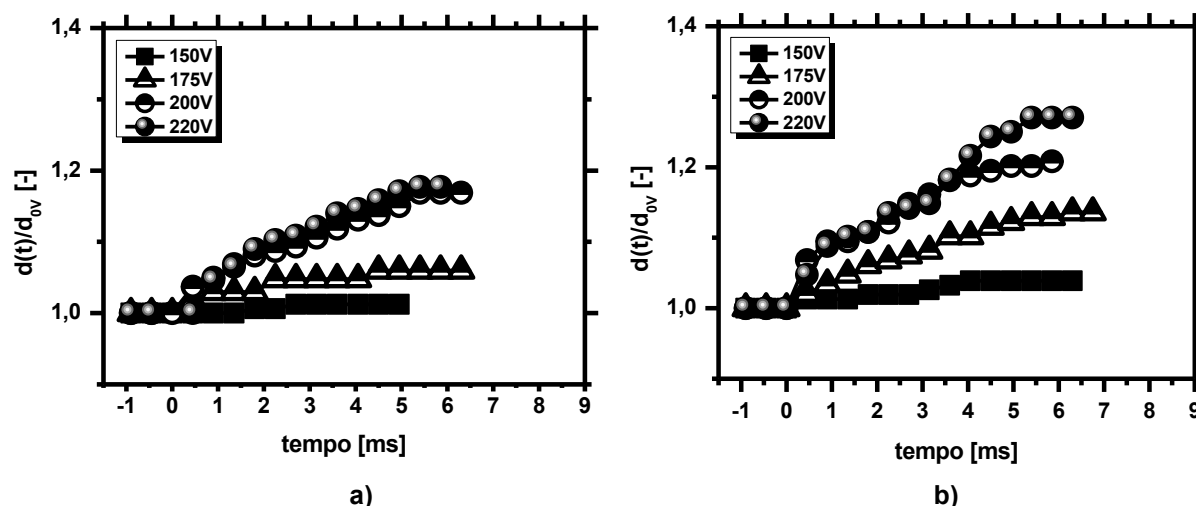


Figura 3.6: Representação gráfica do $\cos\theta_e$ em função de V^2 para soluções de BSA com concentrações de a) 1mM e b) 5mM.

Complementarmente a estas medidas, avaliou-se a evolução do diâmetro de espalhamento das gotas induzido por atuação electrostática, representada na Figura 3.7. Neste caso, o período em que as gotas permanecem na superfície é substancialmente reduzido face ao tempo necessário para os ensaios de caracterização dos ângulos estáticos. Por outro lado, é utilizada uma nova gota a cada aumento da tensão aplicada, para evitar que o espalhamento das gotas a tensões mais elevadas seja afectado pela irreversibilidade causada pelo histerese, que impede que a gota regresse à sua forma inicial, quando a atuação electrostática é interrompida. As curvas obtidas foram adimensionalizadas pelo diâmetro inicial da gota quando depositada (para $V=0$), para reduzir a influência das condições de molhabilidade iniciais e das eventuais diferenças na dimensão das gotas geradas. Deve salientar-se que $t=0\text{ms}$ corresponde ao instante em que se inicia a atuação electrostática.

De um modo geral, a evolução temporal dos diâmetros de espalhamento apresentada na Figura 3.7 está de acordo com a tendência discutida nos parágrafos anteriores, uma vez que o espalhamento induzido pela atuação electrostática é ligeiramente promovido pelo aumento da concentração. Porém, a variação do diâmetro de espalhamento em tensões mais elevadas é agora mais evidente para as concentrações mais altas, em comparação com a variação do ângulo de contacto, discutida nas Figuras anteriores. Este resultado reforça a hipótese avançada da ocorrência de adsorção da proteína pelo substrato, que inicialmente pode favorecer o espalhamento da gota, mas que posteriormente dificulta os ensaios de *electrowetting*, particularmente nas medidas dos ângulos de contacto estáticos, que requerem ensaios de maior duração.

As curvas apresentadas na Figura 3.7 estão qualitativamente de acordo com os resultados apresentados por (Annapragada et al. 2011). Quantitativamente o diâmetro das gotas do presente trabalho expande-se menos e de forma um pouco mais lenta, mas os electrólitos utilizados são completamente distintos nestes dois estudos.



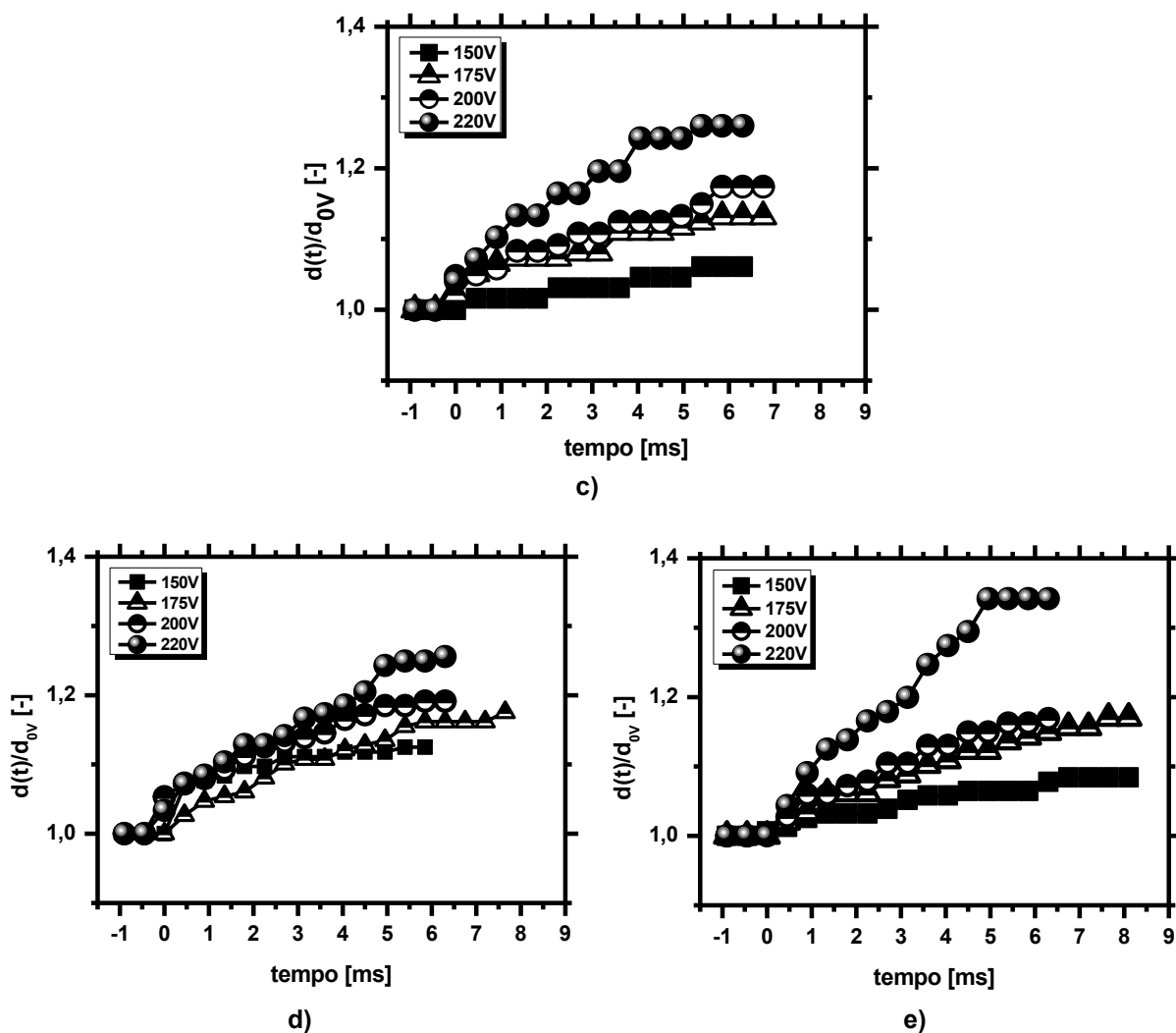


Figura 3.7: Representação gráfica da evolução temporal do diâmetro de espalhamento induzido por atuação electrostática, adimensionalizado pelo diâmetro da gota depositada para $V=0$. **a)** NaCl (50mM), **b)** NaCl (100mM), **c)** NaCl (200mM), **d)** BSA (1mM) e **e)** BSA (2,5mM).

3.4.2 – Efeito do pH

O efeito do pH foi estudado apenas nas soluções de BSA, dado que o efeito da modificação do pH para extremos distantes do ponto isoelétrico da proteína poderá afectar o processo de adsorção, mas também poderá promover alterações na densidade de carga na gota.

O ponto isoelétrico da BSA é 4.7 (Yoon & Garrell 2003) pelo que uma variação significativa do pH no meio ácido implicaria que se preparassem soluções com valores de pH muito baixos (inferiores a 3). A utilização destas soluções colocava sérios riscos de segurança do utilizador e do próprio equipamento. Por outro lado, (Chevalliot et al. 2012) referem que valores extremos de pH são incompatíveis com a viabilidade da maioria dos biofluidos, pelo que não são relevantes em aplicações em bioengenharia. Neste contexto, optou-se por considerar um valor de $pH=5$, próximo do ponto isoelétrico da BSA e dois valores significativamente mais elevados, de $pH=7$ e $pH=10$.

Autores como por exemplo (Yoon & Garrell 2003) argumentam que a adsorção de biomoléculas é facilitada em meios com pH elevado. Neste contexto, em condições iniciais, a rápida adsorção pode até promover o espalhamento da gota, mas em ensaios de longa duração atingem-se rapidamente valores limite do ângulo de contacto, que dificultam a continuidade do espalhamento por ação de tensões superiores. Adicionalmente a histerese aumenta, promovendo a irreversibilidade. Assim, o efeito do pH na evolução do ângulo estático não é muito evidente, como observado na Figura 3.8, parecendo existir apenas uma tendência para os ângulos serem ligeiramente mais baixos, quando se aumenta o pH de 5, para 7 e para 10. No entanto, para tensões elevadas, devido ao efeito de adsorção, os valores do ângulo obtidos para pH=5 chegam a ser idênticos aos obtidos para pH's superiores, que tendem a estagnar num patamar. Esta tendência é mais notória para as maiores concentrações de BSA.

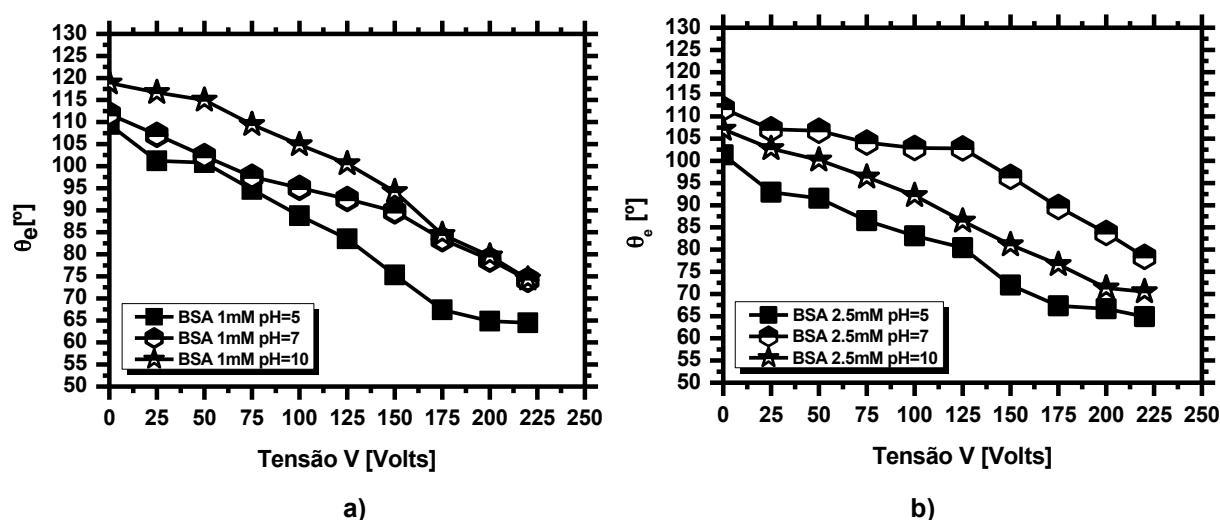


Figura 3.8: Efeito do pH na evolução do ângulo de contacto estático com a tensão aplicada para soluções de BSA a diferentes concentrações a) 1mM e b) 2,5mM. O diâmetro inicial das gotas é $D_0=2,8\text{mm}$.

Porém, a análise dos diâmetros de espalhamento, apresentados nas Figuras 3.9 e 3.10 evidencia uma tendência para os meios de pH mais elevado favorecerem o espalhamento induzido das gotas de BSA, para as concentrações de 1mM e 2,5mM, respectivamente. Para além do efeito da adsorção da BSA já referido, que dificulta a atuação para valores de tensão mais elevados, em ensaios de longa duração, a variação do pH para valores elevados poderá motivar uma modificação na densidade de carga na gota, como sugerido por (Li et al. 2008), que justifica o maior espalhamento induzido nas gotas para pH=7 e para pH=10. Assim, para pH básicos (pH=10) o tampão utilizado foi o de carbonato e sabe-se através da literatura, que a adsorção de prótons (H^+) e iões hidróxido (HO^-) para superfícies dão origem a uma superfície de potencial. Nestas condições, quando o pH é superior ao ponto isoelétrico da proteína, (Li et al. 2008) referem que ocorre um rearranjo das cadeias de BSA junto ao substrato que origina uma tendência contrária à do restante líquido da gota.

Assim, se as cargas na gota ficam repulsivas, as cadeias junto ao substrato tornam-se atrativas, favorecendo localmente o espalhamento da gota. Desta forma, o aumento do pH favorece a ocorrência de 2 processos que, nos ensaios a longa duração são concorrentes, mas que favorecem o espalhamento da gota em curtos intervalos de tempo, quando ainda não se atingiram valores limitantes do ângulo de contacto.

Deve porém salientar-se que existe uma irreversibilidade neste processo de espalhamento que impossibilitará um transporte efetivo das gotas. Revendo os mecanismos de adsorção propostos por (Yoon & Garrell 2003), neste caso ocorre uma adsorção passiva, que não é solucionada por modificação do pH, como sugerido por estes autores. Neste contexto, o problema da adsorção da proteína torna-se dominante e exige um estudo apropriado do mecanismo que está a ocorrer, a desenvolver num trabalho futuro, por forma a garantir a seleção de um substrato mais adequado.

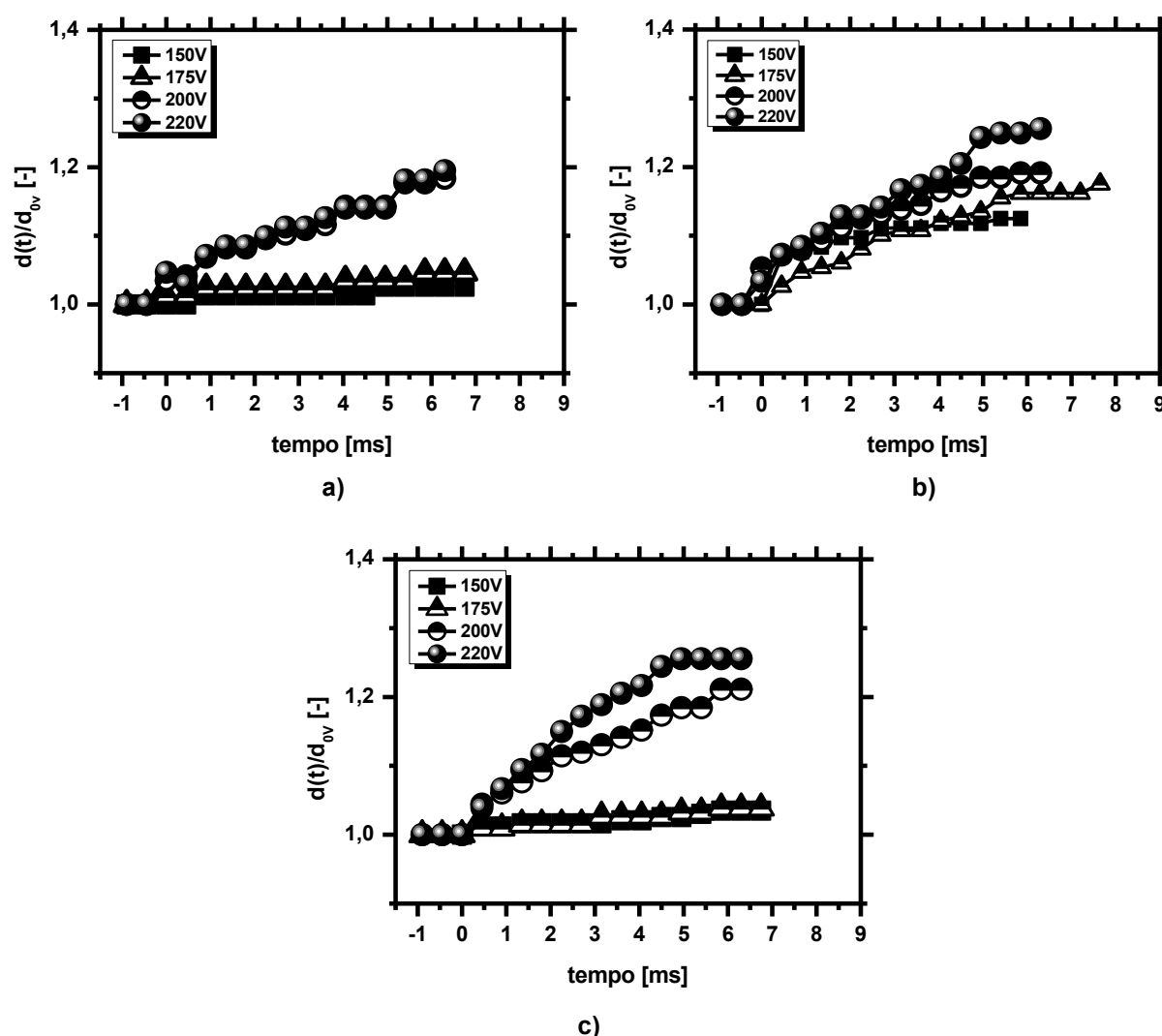


Figura 3.9: Efeito do pH no diâmetro de espalhamento induzido em soluções de BSA (1mM) por atuação electrostática, adimensionalizado pelo diâmetro da gota depositada para $V=0$. **a)** pH=5, **b)** pH=7, **c)** pH=10.

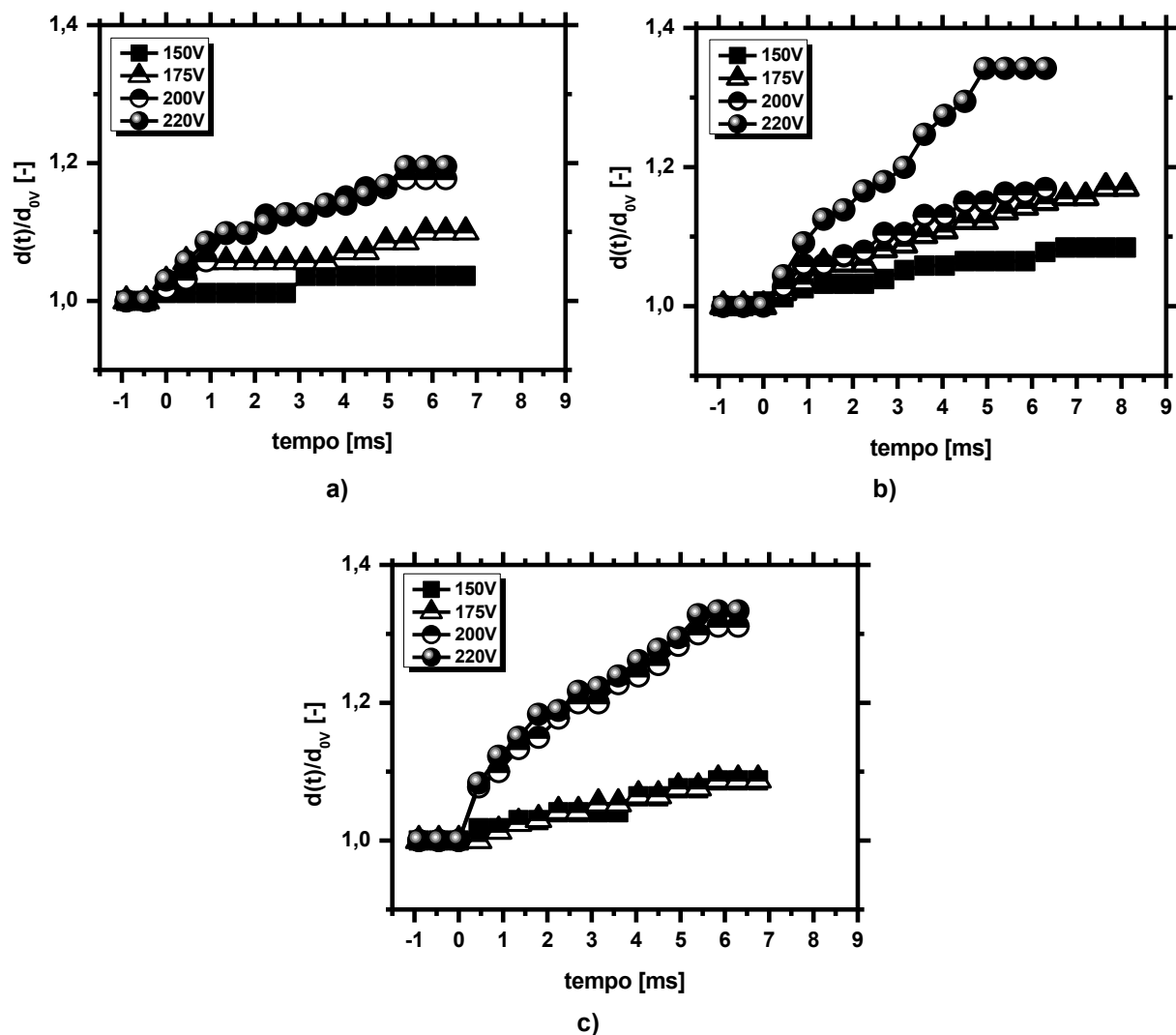


Figura 3.10: Efeito do pH no diâmetro de espalhamento induzido em soluções de BSA (2,5mM) por atuação electrostática, adimensionalizado pelo diâmetro da gota depositada para $V=0$. **a)** pH=5, **b)** pH=7, **c)** pH=10.

3.4.3 – Análise da viabilidade da proteína

A potencial alteração sofrida pela BSA durante os ensaios de *electrowetting* foi avaliada comparando os espectros de absorção das soluções, antes e depois dos ensaios. Para esta análise consideram-se as soluções com concentrações extremas de 1mM e 50mM. Os espectros de absorção obtidos apresentam-se na Figura 3.11.

Quando a proteína sofre desnaturação, a sua estrutura e a sua dimensão alteram-se e os espectros de absorção são distintos, verificando-se normalmente alterações na posição dos picos nos comprimentos de onda que estão associados às espécies químicas que as compõem. Neste caso, os espectros obtidos antes e depois dos ensaios são muito semelhantes, para ambas as concentrações testadas. O aumento do pico de absorção após os ensaios, que é visível em ambas as concentrações, particularmente na maior, devem-se possivelmente a efeitos evaporativos que

ocorrem durante a atuação electrostática e que conduzem a um aumento da concentração de BSA na gota de 1,5 vezes. Estima-se que este aumento de concentração esteja associado a uma redução do volume da gota por evaporação de cerca de 30%.

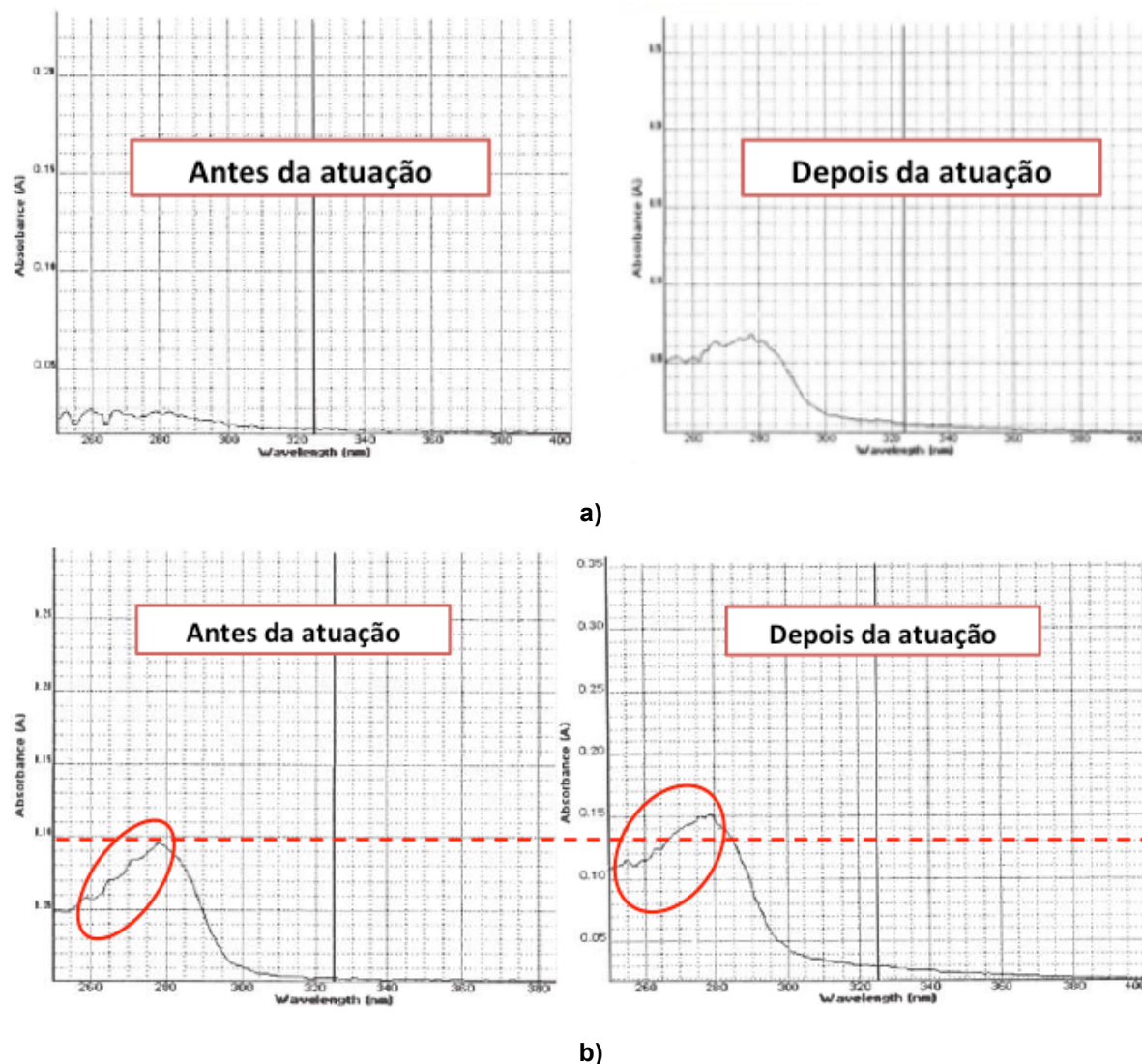


Figura 3.11: Espectros de absorção obtidos para as soluções de BSA com concentrações de a) 1mM e b) 50mM antes e depois dos ensaios de *electrowetting*.

Apesar dos ensaios terem sido realizados no interior de uma câmara de Perspex, previamente saturada com as soluções em estudo, à temperatura ambiente, para assegurar que a evaporação das gotas ocorre durante a atuação electrostática e não se deve a efeitos de difusão de massa para o ar no interior da câmara, os espectros de absorção foram analisados para as mesmas concentrações, mas desta vez, as gotas foram simplesmente depositadas no substrato, não sendo sujeitas à atuação electrostática. As gotas ficaram depositadas durante um período de tempo idêntico ao necessário para concluir um ensaio de *electrowetting*.

Os resultados apresentados na Figura 3.12 mostram que sem atuação electrostática não ocorrem variações indicativas de alteração da concentração da proteína na gota, pelo que os efeitos evaporativos observados na Figura 3.11 podem efetivamente atribuir-se à atuação electrostática. A exactidão dos ensaios são de $\pm 2\%$ @ 0,76 absorbância.

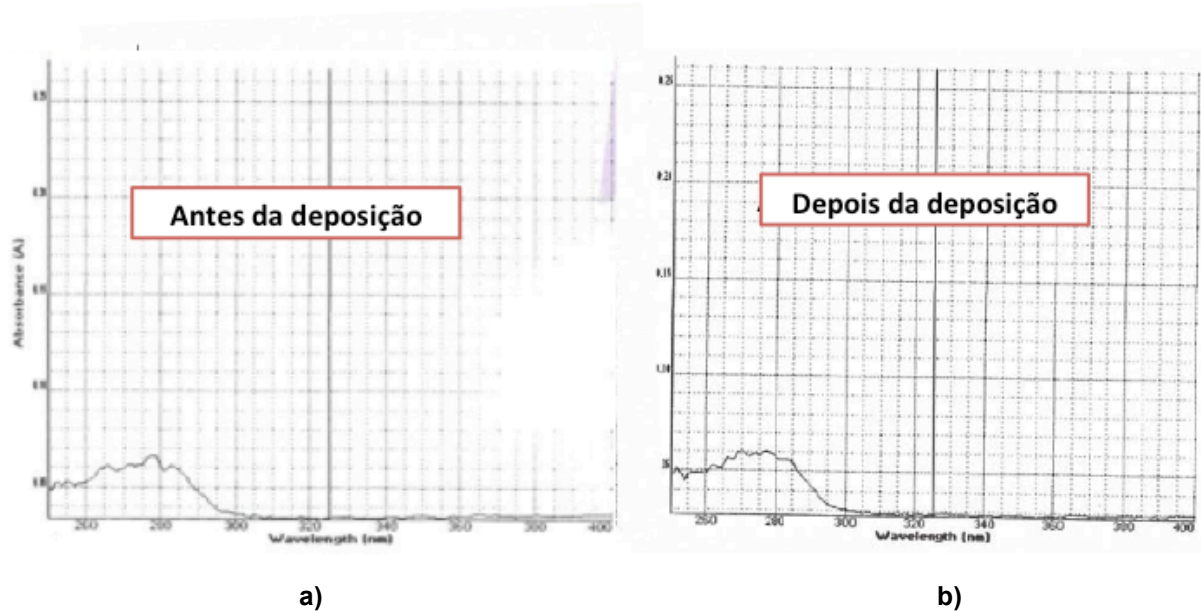


Figura 3.12: Espectros de absorção obtidos para a solução de BSA com concentração de 50mM, obtidos na ausência de atuação electrostática. **a)** Espectro da solução recolhida antes das gotas serem depositadas no substrato. **b)** Espectro da solução obtido por análise das gotas depositadas no substrato, durante um período de tempo idêntico ao requerido para concluir um ensaio de *electrowetting*.

Secção 4

Conclusão e trabalho futuro

4.1 – Conclusão

O presente trabalho teve como finalidade caracterizar o comportamento dinâmico de gotas de biofluidos sobre uma superfície hidrofóbica, com e sem atuação electroestática e descrever o efeito de alguns factores que são habitualmente alterados nas amostras (composição da amostra, concentração, pH).

Ao longo do trabalho, utilizaram-se as seguintes soluções: cloreto de sódio, a simulação do plasma sanguíneo (5,6mM de glucose, 100mM de NaCl e 1,2mM de BSA) e a proteína BSA, preparadas em água destilada com um volume final de 20ml.

Assim sendo, inicialmente seleccionou-se a superfície superhidrofóbica que iria ser utilizada durante este estudo. Esta seleção é feita com base na obtenção de ângulos estáticos elevados que é uma característica essencial que tem de se verificar nas superfícies a utilizar nos ensaios de *electrowetting*, dado que é indicativa da hidrofobicidade das superfícies com as gotas dos líquidos que se pretende transportar. Por outro lado, observou-se a evolução do diâmetro de espalhamento numa situação de espalhamento forçado, sem atuação electrostática, para avaliar a presença de movimento de recuo do líquido, que é tanto mais evidente quanto menor for a irreversibilidade do processo de espalhamento, devido à dissipação de energia na linha de contacto gota-superfície. Este estudo conduziu à seleção de duas superfícies, sendo que se optou pela segunda melhor superfície (a superfície de Teflon) por restrições associadas à espessura da que apresentava as melhores propriedades.

Nos ensaios de atuação electrostática estudou-se o efeito de concentração e do pH no ângulo de contacto estático e no diâmetro de espalhamento da gota. Os resultados mostram que ocorre adsorção passiva da proteína BSA pelo substrato, que é promovida pelo aumento da concentração da mesma na solução da gota. Assim, os ângulos de contacto estático decrescem um pouco mais acentuadamente para pequenos acréscimos de concentração da proteína até sensivelmente 2,5mM, ocorrendo posteriormente uma rápida saturação que não permite que o ângulo decresça, mesmo com a aplicação de tensões elevadas. Este efeito de saturação do ângulo é menos evidente na medição dos diâmetros de espalhamento da gota, dado que o tempo de deposição é significativamente menor.

O efeito do pH foi estudado apenas nas soluções de BSA dado que o efeito da modificação do pH para extremos distantes do ponto isoelétrico da proteína poderá afectar o processo de adsorção, mas também promover alterações da densidade de carga na gota. O aumento do pH promove ligeiramente a adsorção, o que dificulta a interpretação dos resultados obtidos em relação à medição dos ângulos estáticos. A análise dos diâmetros de espalhamento permite identificar uma tendência para os meios de pH mais elevados favorecerem o espalhamento induzido das gotas de BSA, para

as concentrações de 1mM e 2,5mM. Este resultado pode explicar-se, mais uma vez, pelo tempo de realização dos ensaios de medição dos diâmetros de espalhamento, mas também por um efeito de rearranjo das cadeias de BSA junto ao substrato, que ocorre para valores do pH superiores ao ponto isoelétrico da BSA (i.e. meios básicos) que origina uma tendência contrária à do restante líquido da gota. Assim, se as cargas na gota ficam repulsivas, as cadeias junto ao substrato tornam-se atrativas, favorecendo localmente o espalhamento da gota. Deste modo, o aumento do pH favorece a ocorrência de dois processos que, nos ensaios a longa duração são concorrentes, mas que favorecem o espalhamento da gota em curtos intervalos de tempo, quando ainda não se atingiram valores limitantes do ângulo de contacto.

Para averiguar se a atuação electrostática alterava a conformação da proteína BSA, analisaram-se os espectros de absorção das soluções, antes e depois dos ensaios. Para esta análise consideram-se as soluções com concentrações extremas de 1mM e 50mM. Com base nos espectros obtidos verifica-se um aumento do pico de absorção após os ensaios, que é visível em ambas as concentrações, particularmente na mais elevada. Este pico deve-se a efeitos evaporativos que ocorrem durante a atuação electrostática e que conduzem a um aumento da concentração de BSA na gota de 1,5 vezes. Estima-se que este aumento de concentração esteja associado a uma redução do volume da gota por evaporação de cerca de 30%. Este efeito não se encontra ainda bem descrito na literatura mas poderá ser um problema no desenvolvimento de aplicações do tipo *lab-on-a-chip*, que requeiram análises da concentração da amostra a transportar.

É de salientar que o trabalho desenvolvido ao longo deste estudo deu origem a um artigo científico (Ramos et al. 2014) que foi apresentado na 26th International Conference of Liquid Atomization and Spray Systems – ILASS 2014.

4.2 – Trabalho futuro

Os resultados obtidos sugerem um efeito significativo de adsorção passiva da proteína pelo substrato, que não foi minimizada por variação do pH, como sugerido por outros autores, em trabalhos realizados anteriormente. Dado que muitos *chips* usados em *electrowetting* possuem frequentemente depósitos finos de Teflon na superfície de contacto com as gotas, para favorecer a sua movimentação devido à hidrofobicidade, é relevante estudar mais detalhadamente este mecanismo de adsorção e identificar materiais e/ou tratamentos superficiais que reduzam este efeito.

A questão da evaporação da gota também deve ser aprofundada, dado que tem sido abordada essencialmente em aplicações de *electrowetting* para arrefecimento de microcomponentes, onde a evaporação da gota é atribuída maioritariamente pela transmissão de calor com a superfície do componente a arrefecer e onde a principal preocupação está centrada no arrefecimento do componente e não em manter a integridade da composição da gota. Neste caso, a evaporação provoca um efeito secundário de aumento de concentração do componente a transportar, que poderá afectar a análise do mesmo. Neste contexto, devem testar-se outros electrólitos biocompatíveis, no sentido de tentar minimizar este efeito evaporativo.

Com base no trabalho elaborado, seria também interessante efetuar a construção e teste de um *chip* que não favorecesse apenas o espalhamento da gota, mas que permitisse o seu movimento efetivo. Uma vez fabricado o *chip* e tendo já uma avaliação de quanto as gotas se espalham, em função das tensões aplicadas, (pelo método de medição dos diâmetros usado neste trabalho) é possível realizar um conjunto de *chips* de teste, para avaliar a melhor configuração e posicionamento dos eléctrodos, tomando como referência os valores aqui obtidos.

Dado que também se selecionaram neste trabalho os padrões de estruturação mais adequados para criar uma superfície superhidrofóbica, eles poderão ser aplicados a um material com menor afinidade para a adsorção de biomoléculas.

Bibliografia

- Adamson, A. W. & Gast, A. P., 1997. *Physical Chemistry of Surfaces*, A Wiley-Interscience Publication, 6th Edition, New York, USA.
- Adamson, A.W. 1990. *Physical Chemistry of Surfaces*, 5th Edition, Wiley, New-York, USA.
- Annappagada, S.R. et al., 2011. Dynamics of droplet motion under electrowetting actuation. *Langmuir*, 27(13), pp.8198–8204.
- Bahadur, V. & Garimella, S. V., 2006. An energy-based model for electrowetting-induced droplet actuation. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 16(8), pp.1494–1503.
- Barbulovic-Nad, I. et al., 2008. Digital microfluidics for cell-based assays. *Lab on a chip*, 8(4), pp.519–526.
- Bayiati, P. et al., 2007. Biofluid transport on hydrophobic plasma-deposited fluorocarbon films. *Microelectronic Engineering*, 84, pp.1677–1680.
- Berge, B., 1993. Electrocapillarity and wetting of insulator films by water. *Comptes Rendus De L'Academie Des Sciences, Séries II*, 317, pp.157–163.
- Blake, T., Clarke, A. & Stattersfield, E., 2000. An investigation of electrostatic assist in dynamic wetting. *Langmuir*, 16(6), pp.2928–2935.
- Cassie, A.B.D. & Baxter, S., 1944. Wettability of porous surfaces. *Transactions of the Faraday Society*, 40, pp.546–551.
- Cheng, P. et al., 1990. Automation of axisymmetric drop shape analysis for measurements of interfacial tensions and contact angles. *Colloids and Surfaces*, 43, pp.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, pp.1909–1930.
- Cooney, C.G. et al., 2006. Electrowetting droplet microfluidics on a single planar surface. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2(5), pp.435–446.
- Decamps, C. & De Coninck, J., 2000. Dynamics of spontaneous spreading under electrowetting conditions. *Langmuir*, 16(26), pp.10150–10153.
- Dubois, P. et al., 2006. Ionic liquid droplet as e-microreactor. *Analytical Chemistry*, 78(14), pp.4909–4917.
- Fournier, R. L., 1999, *Basic Transport Phenomena in Biomedical Engineering*, Taylor and Francis, Lillington, NC.
- Freitas, Robert A. Jr., 2003. *Nanomedicine, Volume IIA: Biocompatibility*, Landes Bioscience, Georgetown, TX, capitulo 15.3.4.1 —Protein Adsorption on Teflon Surfaces.
- Goellner, B. et al., 2012. Design Optimization of an Electrowetting Cell Sorter Chip Platform. *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, 57(SI-1 Track-G), pp.978–981.

- Harris, M.T. & Byers, C.H., 1989. An advanced technique for interfacial tension measurement in liquid-liquid systems, Report prepared by the OAK Ridge National Laboratory for the U.S. Department of Energy
- He, B., Patankar, N.A. & Lee, J., 2003. Multiple equilibrium droplet shapes and design criterion for rough hydrophobic surfaces. *Langmuir*, 19(12), pp.4999–5003.
- Hermann, D., 2013. Impact of non-Newtonian liquid droplets onto solid surfaces. Dissertação para a conclusão da Licenciatura em Engenharia Aeroespacial, Universität Stuttgart, 2013.
- Hong, J.W. & Quake, S.R., 2003. Integrated nanoliter systems. *Nature Biotechnology*, 21, pp.1179–1183.
- Hong, L. & Pan, T., 2011. Surface microfluidics fabricated by photopatternable superhydrophobic nanocomposite. *Microfluidics and Nanofluidics*, 10(5), pp.991–997.
- Horbett Thomas, A. & Brash John, L., 1987. Proteins at Interfaces: Current Issues and Future Prospects. In *Proteins at Interfaces: Physicochemical and Biochemical Studies*. Washington, D.C.: American Chemical Society, pp. 1–33.
- Jakeway, S.C., de Mello, A.J. & Russell, E.L., 2000. Miniaturized total analysis systems for biological analysis. *Journal of Analytical Chemistry*, 366(6-7), pp.525–539.
- Jones, T.B., 2005. An electromechanical interpretation of electrowetting. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 15(6), pp.1184–1187.
- Kaler, K.V.I.S., Prakash, R. & Chugh, D., 2010. Liquid dielectrophoresis and surface microfluidics. *Biomicrofluidics*, 4(2), pp.1–17.
- Kietzig, A.M., 2011. Comments on “an essay on contact angle measurements” - An illustration of the respective influence of droplet deposition and measurement parameters. *Plasma Processes and Polymers*, 8(11), pp.1003–1009.
- Koch, K. & Barthlott, W., 2009. Superhydrophobic and superhydrophilic plant surfaces: an inspiration for biomimetic materials. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 367(1893), pp.1487–1509.
- Kuo, J.S. et al., 2003. Electrowetting-induced droplet movement in an immiscible medium. *Langmuir*, 19, pp.250–255.
- Li, Y. et al., 2008. Effects of pH on the interactions and conformation of bovine serum albumin: comparison between chemical force microscopy and small-angle neutron scattering. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(12), pp.3797–3806.
- Lippmann, G., 1875. Relation entre les phénomènes électriques et capillaires. *Annales de Chimie et de Physique*, 5(V), pp.494–549.
- Marmur, a., 2011. Measures of wettability of solid surfaces. *The European Physical Journal Special Topics*, 197(1), pp.193–198.
- Michalski, M. & Saramago, B., 2000. Static and Dynamic Wetting Behavior of Triglycerides on Solid Surfaces. *Journal of colloid and interface science*, 227(2), pp.380–389.
- Mohamed, H., Turner, J.N. & Caggana, M., 2007. Biochip for separating fetal cells from maternal circulation. *Journal of Chromatography A*, 1162(2), pp.187–192.

- Moita, A.S. & Moreira, A.L., 2007. Experimental study on fuel drop impacts onto rigid surfaces: Morphological comparisons, disintegration limits and secondary atomization. *Proceedings of the Combustion Institute*, 31(2), pp.2175–2183.
- Moita, A.S., 2004. Dynamic behaviour of droplets impacting onto flat surfaces. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Mecânica. Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa.
- Moita, A.S., 2009. Thermal and fluid dynamics of droplet wall interactions. Dissertação para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Mecânica. Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa.
- Moreira, a. L.N., Moita, A.S. & Panão, M.R., 2010. Advances and challenges in explaining fuel spray impingement: How much of single droplet impact research is useful? *Progress in Energy and Combustion Science*, 36(5), pp.554–580.
- Mugele, F. & Baret, J.-C., 2005. Electrowetting: from basics to applications. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 17(28), pp.R705–R774.
- 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), pp.1–8.
- Pereira, P.M.M. et al., 2014. Characterization of the topography and wettability of english weed leaves and biomimetic replicas. *Journal of Bionic Engineering*, 11(3), pp.346–359.
- Pollack, M.G. et al., 2011. Applications of electrowetting-based digital microfluidics in clinical diagnostics. *Expert review of molecular diagnostics*, 11(4), pp.393–407.
- Promega, 2012. I . What a Buffer System Is and How It Works 15Buffers for Biochemical Reactions PROTOCOLS & APPLICATIONS GUIDE PROTOCOLS & APPLICATIONS GUIDE.
- Quinn, A., Sedev, R. & Ralston, J., 2005. Contact angle saturation in electrowetting. *The journal of physical chemistry B*, 109(13), pp.6268–6275.
- Quinn, A., Sedev, R. & Ralston, J., 2003. Influence of the Electrical Double Layer in Electrowetting. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107, pp.1163–1169.
- Ramos, J.A. et al., 2014. Dynamics of droplets of biological fluids over enhanced surfaces with and without electrostatic actuation. *ILASS-Europe 2014, 26th Annual Conference on Liquid Atomization and Spray Systems. Bremen Germany*, pp.1–12.
- Restolho, J., Mata, J.L. & Saramago, B., 2009. Electrowetting of Ionic Liquids: Contact Angle Saturation and Irreversibility. *Journal of Physical Chemistry C*, 113(21), pp.9321–9327.
- Rioboo, R., Tropea, C. & Marengo, M., 2001. Outcomes from a drop impact on solid surfaces. *Atomization and Sprays*, 11(2), pp.155–165.
- Rupp, F. & Axmann, D., 2002. Adsorption/desorption phenomena on pure and Teflon® AF-coated titania surfaces studied by dynamic contact angle analysis. *Journal of Biomedical Materials Research*, 62(4), pp.567–578.
- Santini, M., Guilizzoni, M. & Fest-Santini, S., 2013. X-ray computed microtomography for drop shape analysis and contact angle measurement. *Journal of Colloid and Interface Science*, 409, pp.204–210.

- Serro, A. P. V. A., 2001. Biomineralização de materiais de implante: estudos de molhabilidade. Dissertação para a obtenção do grau de Doutor em Química. Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa.
- 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, pp.310–315.
- Todd, P., 1993. Polarity, Miscibility, and Surface Tension of Liquids. *Journal of Chemical Education*, 70(3), p.253.
- Varanasi, K.K. et al., 2010. Droplet impingement and wetting hysteresis on textured hydrophobic surfaces. In: *Proceedings of 14th international heat transfer conference, IHTC-14, Washington DC, USA*, pp.1–10.
- Verheijen, H.J.J. & Prins, M.W.J., 1999. Reversible electrowetting and trapping of charge: Model and experiments. *Langmuir*, 15(20), pp.6616–6620.
- Vignes-Adler, M., 2000. Physico-Chemical Aspects of forced wetting, in *Drop-Surface interactions*, Edited by Martin Rein, SpringerWienNewYork.
- Wang, K.L. & Jones, T.B., 2005. Electrowetting dynamics of microfluidic actuation. *Langmuir*, 21(9), pp.4211–4217.
- Welch, E.R.F. et al., 2011. Picoliter DNA Sequencing Chemistry on an Electrowetting-based Digital Microfluidic Platform. *Biotechnology Journal*, 6(2), pp.165–176.
- Wenzel, R.N., 1936. Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 28(8), pp.988–994.
- Wheeler, A.R. et al., 2004. Electrowetting-Based Microfluidics for Analysis of Peptides and Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 76(16), pp.4833–4838.
- White, F. M., 1994. Fluid Mechanics, 3rd Edition, McGraw-Hill, Inc., USA.
- Yoon, J.Y. & Garrell, R.L., 2003. Preventing biomolecular adsorption in electrowetting-based biofluidic chips. *Analytical Chemistry*, 75(19), pp.5097–5102.
- Zhao, Y.-P. & Wang, Y., 2013. Fundamentals and Applications of Electrowetting. *Reviews of Adhesion and Adhesives*, 1(1), pp.114–174.

Anexo

**Artigo científico apresentado na 26th International Conference of
Liquid Atomization and Spray Systems – ILASS 2014**

Dynamics of droplets of biological fluids over enhanced surfaces with and without electrostatic actuation

J. A. Ramos^{1,2}, A. S. Moita^{*1}, D. M. F. Prazeres², A. L. N. Moreira¹

¹IN+, Center for Innovation, Technology and Policy Research, Dep. Mechanical Engineering, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Portugal

²IBB, Institute for Biotechnology and Bioengineering, Center for Biological and Chemical Engineering, Dep. Bioengineering, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Portugal

*Corresponding author: anamoita@dem.ist.utl.pt

Abstract

This study aims at characterizing the dynamic behaviour of droplets of biological samples over enhanced surfaces with and without electrostatic actuation, in the context of the development of a surface microfluidic chip for sample handling in lab-on-a-chip applications. The best performing enhanced surfaces are chosen based on the characterization of wettability (static and dynamic contact angles) and on the analysis of droplet impact at small velocities. Evaluating droplet impact is also used to identify and characterize non-Newtonian behaviour of the biological fluids used here.

The tests consider the use of 2-3 μ L droplets of sodium chloride (NaCl), bovine serum albumin (BSA) and blood plasma mock (100mmol/l NaCl, 1.2mmol/l BSA, 5.6mmol/l glucose) solutions with different concentrations. The results show a mild promotion of droplet motion by electrowetting when the concentration of the studied solutes (NaCl, BSA, glucose) was slightly increased. The apparent high saturation angle observed in the static characterization of the electrowetting of BSA solutions, which might cause a limitation in their transportation and handling is suggested to be caused by the adsorption of the molecules on the dielectric substrate, which may induce modifications of the local wettability if the droplet stays in contact with the substrate for sufficient time.

Analysis of the absorption spectra before and after electrowetting reveals that BSA remains unchanged after electrostatic actuation, but that the droplet partially evaporates causing an increase on the concentration of BSA. This effect can be a problem for applications in lab-on-a-chip devices, particularly for diagnostic purposes which rely on the detection of solutes like proteins and therefore deserves more attention in future studies.

Introduction

Droplet-based transport phenomena driven by surface tension have been explored as an automated pumping source for various chemical and biological applications. Recently, researchers (e.g. [1]) have suggested an alternative microfluidic approach to create fluidic pathways using hydrophobic or superhydrophobic patterns in an open surface configuration, referred to as surface microfluidics. Indeed, control of the fluid motion at the microscale via tailoring of surface tension is advantageous, as it does avoid many electromechanical parts, given that within this scale, surface tension forces become dominant over pressure and body forces. Local modification of the surface tension can be then obtained by a variety of methods, such as electrostatic actuation. This method is actually considered as the backbone of digital microfluidics [2] and its potential for transport and manipulation of biological fluids is pointed out by many authors. Some of these applications include DNA and protein analysis as well as biomedical diagnostics (e.g. [3-5]). Digital microfluidics for cell assays is also argued to be advantageous when compared to the currently used techniques [6-7]. However, most of the devices developed so far are based on continuous flow through closed channels [8]. Such closed configuration is the easiest to implement, but has several limitations associated to clogging and cleaning issues and difficulties in having access to the samples. The alternative is a single plate open configuration system [9], which brings many challenges in terms of the arrangement of the chip. Here, surface modification has a vital role, but also introduces additional complexity to the system, as the study of the wettability and electrowetting over micro-and-nano-structured surfaces often cause asymmetries in droplet shape (due to hysteresis [10]) and particular droplet morphologies which may not be stable [8]. Hence, although this open configuration has great potential for bioengineering and biomedical applications, as recently reviewed in [11], much research is still required for the production of commercially viable systems. The traditional concept of EWOD – electrowetting on dielectric, stands on the reduction of the dielectric-liquid interfacial energy by the application of a voltage between a conducting droplet and an underlying dielectric layer. The dielectric layer was introduced by Berge [12], simply to

avoid the problem of water electrolysis, which occurs at just a few hundred millivolts. Contrasting to the most current models, which consider the decrease of the contact angle as the governing effect of electrowetting controlled droplet motion, electromechanical [10,13] and energy minimization models [8,14] show that the energy gradient is in fact the driving effect behind electrowetting induced motion.

Although few authors report the successful electrowetting-induced transport of proteins, DNA and even physiological fluids [15-18], the transport phenomena seem to be affected by the adsorption of the biomolecules. Although electrochemical properties of these samples are suggested to be able to alter the transport of the microdroplets and to affect the value of the saturation angle, due to local modification and/or divergence of the electric fields near the contact line, very little research is yet reported which tries to address these issues.

Many biological samples have non-Newtonian properties. For instance, blood is known to be shear-thinning and therefore its viscosity can be well described by $\mu = K \dot{\gamma}^{n-1}$. Modifications of the values of the consistency coefficient K and of the power-law index n are suggested to be correlated with leukaemia [19]. Also, DNA can be sensitive to shear and therefore DNA samples are related in some studies to power law fluids [20]. On the other hand, although blood plasma has been reported to mainly depict a Newtonian behaviour in shear, viscoelastic characteristics may be observed in elongational flows [21]. Hence, the non-Newtonian nature of the biological fluids must be well determined and characterized.

In line with this, the present work aims at characterizing the dynamic behaviour of droplets of biological samples, such as DNA solutions and mock blood plasma solutions over enhanced surfaces with and without electrostatic actuation in the context of the development of a surface microfluidic chip for the transport of these fluids. The best performing enhanced surface is chosen based on the characterization of wettability (static and dynamic contact angles) as well as on the analysis of droplet impact at small velocities. Evaluating droplet impact will also be useful to identify and characterize non-Newtonian behaviour of the biological fluids used here. The results obtained will be compared with models reported in the literature for Newtonian and non-Newtonian fluids, as well as with our own results, partially presented in a previous work [22]. For comparative purposes, one will also analyse the behaviour of droplets of NaCl solutions with different concentrations. Afterwards, the static and dynamic angles are characterized under electrostatic actuation. This information is complemented with the dynamic analysis of the contact line motion (inducing droplet spreading) under electrostatic actuation, following the procedure reported in [23].

Material and methods

The experimental set-up is mounted on an optical tensiometer (THETA, from Attension), so that all the droplet formation system can be controlled by the computer. For this stage of the research, large droplets with initial diameter ranging between 2.4mm D_0 <math><3.3\text{mm}</math> are used to assure a good spatial accuracy of the measurements, which is vital for the precise description of the main fundamental quantities that are being investigated. For electrowetting tests the droplets are deposited on the enhanced surfaces. In the absence of electrostatic actuation the spreading is forced through impact over the surfaces with velocities U_0 ranging from 0.88 to 3m/s. As aforementioned in the Introduction, the experiments addressing droplet impact are performed to choose the best performing surfaces, i.e. those rendering the most hydrophobic behaviour for the largest number of biological samples. This initial study without electrostatic actuation is also used to discuss the Newtonian vs non-Newtonian behaviour of the biological fluids used in the present study.

All the tests are performed inside a Perspex chamber saturated with the working fluid at room temperature. This chamber has four 55x55mm² quartz windows to avoid distortion which introduces errors in the image based techniques.

The enhanced surfaces are made from a silicon wafer and are micro-patterned using square structural pillars, ranging from 5µm up to 200µm. Additional superhydrophobic surfaces made from aluminum and Teflon are also used. Surface topography is characterized using a Dektak 3 profile meter (Veeco) with a vertical resolution of 200Ångstroms. All the surfaces are checked by SEM/EDS analysis. Table 1 summarizes the topographical characteristics of the enhanced surfaces. The main dimensions defining the micro-patterns are identified in Figure 1. For the superhydrophobic aluminum and Teflon (PTFE – polytetrafluoroethylene) surfaces, which depict a stochastic roughness profile, surface topography was quantified by the mean roughness (determined according to standard BS1134) and by the mean peak-to-valley roughness (determined following standard DIN4768), as performed in previous work (e.g. [24-26]).

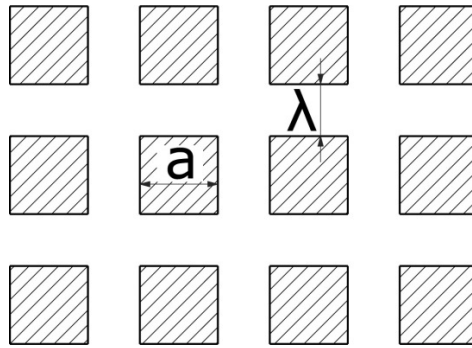


Figure 1. Schematic showing the definition of the dimensions a and λ characterizing the topography of the surfaces micro-structured with regular patterns.

Table 1. Surface topography and wettability with water of the surfaces used in the present study. Here a is the size of the side of the square cross section, h_R is the height of the squared pillars and λ is the pitch.

Surfaces	Material	Surface number	a [μm]	h_R [μm]	λ [μm]	R_a [μm]	R_z [μm]
Smooth	Silicon wafer	S1	-	-	-	~ 0	~ 0
Structured w/regular patterns	Silicon wafer 9	S2	134	23	171	-	-
	Silicon wafer 10	S3	173	23.4	112	-	-
	Silicon wafer 14	S4	158	23.1	132	-	-
Structured w/stochastic profile	Grafted aluminum	S5	-	-	-	4.2	8
	PTFE	S6	-	-	-	~ 0	~ 0

The wettability is quantified by the static q_e and dynamic q_d contact angles measured using the optical tensiometer. The fluids used here are water (for control), water + xanthan gum mixtures at different wt% concentration of the gum (namely 0.05%, 0.10%, 0.15% and 0.35%), plasma mock (100mmol/l NaCl, 1.2mmol/l BSA, 5.6mmol/l glucose), DNA (0.1mM and 1mM), NaCl (with concentrations of 50mM, 100mM, 200mM and 400mM) and BSA (with concentrations of 1mM, 2.5mM - the typical concentration in blood plasma- and 50mM) solutions.

The contact angles were measured at room temperature (ca. 25°C) for all the liquid/surface pairs considered in the present study using the optical tensiometer THETA (Attension). Four to five consistent measures were taken for each sample using the sessile drop method. Images of the deposited droplet were taken using a monochrome video-camera coupled with a microscope. The images size is 640×480 pixels and the spatial resolution of the system for the current optical configuration is 15.6 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. The images were post-processed by a drop detection algorithm based on Young-Laplace equation (One Attension software). The accuracy of the algorithms is argued to be of the order of $\pm 0.1^\circ$ (e.g. [27]). Contact angle hysteresis was assessed at room temperature as described by Kietzig [28]. Briefly, a small water drop is dispensed from a needle and brought into contact with the surface. The volume of the drop is increased and the advancing contact angle is taken as the one just before the interface diameter increases. Afterwards, the drop diameter is decreased and the receding contact angle is taken as the one just before the interface diameter decreases [28].

Then, complementary information is given by the spreading diameter, which is obtained from high-speed visualization and post-processing. The high-speed images were taken at 2200fps using a Phantom v4.2 from Vision Research Inc., with 512×512pixels@2100fps resolution and a maximum frame rate of 90kfps. For the present optical configuration the spatial resolution is 25pixel/ μm and the temporal resolution is 0.45ms.

The spreading diameter is evaluated based on a home made post-processing routine developed in Matlab. The spreading diameter measured with and without electrostatic actuation is averaged over 6 events, obtained at similar experimental conditions. Accuracy of the measurements is evaluated to be $\pm 25\mu\text{m}$. Regarding initial droplet diameters and impact velocities, the accuracy in the evaluation of the impact droplet diameter is $\pm 1.4\%$, while for the velocity it is better than 3%.

Non-Newtonian behaviour of the fluids

As further discussed in the following section, a non-Newtonian (shear-thinning) behaviour was only observed for the droplets of water+xanthan gum mixtures. The viscosity vs shear rate curves were fitted using the Cross model [29]:

$$\frac{\eta_{eff} - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = \frac{1}{1 + (C\dot{\gamma})^m} \quad (1)$$

being η_{eff} , η_0 and η_{∞} the effective, zero-shear (upper limit) and infinite-shear (lower limit) viscosities, respectively. C is the Cross time constant and $m=1-n$. Thus, as m increases, the mixture becomes more shear-thinning.

The fitting parameters are given in Table 2, together with the main physico-chemical properties of the mixtures, taken at ambient temperature and pressure. The rheological data was measured at controlled temperature conditions, at ATS RheoSystems (a division of CANNON® Instruments, Co). The accuracy of the data is within $\pm 5\%$. In the table, X stands for xanthan and the percentage following is the wt% of xanthan gum in the mixture with water. It is worth mentioning that except for the viscosity, all the other properties of the xanthan gum solutions are very close to those of water. All the other fluids depict a Newtonian behaviour, with liquid viscosity and surface tension values also close to those of water.

As for the biological fluids and NaCl solutions, the density, surface tension and viscosity are all also close to that of water ($1.0013 < \rho < 1.002 \text{ kg/m}^3$, $70.92 < \sigma_{lv} < 73.83 \times 10^{-3} \text{ N/m}$ and $\eta_0 \approx 8.9 \times 10^{-4} \text{ Pa.s}$). Nevertheless, to assure that any of these solutions depict non-Newtonian flowing behaviour, droplet dynamics without electrostatic actuation is briefly assessed as further discussed in the results.

Table 2. Thermophysical properties of the working fluids taken at 20°C. Here X stands for xanthan and the percentage following is the wt% of xanthan gum in the mixture with water.

Fluid	ρ [kg/m^3]	σ_{lv} [N/m] $\times 10^3$	η_0 [Pa.s]	η_{∞} [Pa.s]	C [s]	m [-]
Water	996	72.75	8.9×10^{-4}	8.9×10^{-4}	-	-
X0.05%	997	73.00	0.08	1.9	0.8	0.678
X0.10%	997	72.00	0.22	2.6	1.3	0.696
X0.15%	997	71.50	0.58	3.6	1.65	0.707
X0.35%	997	72.95	13.29	5.1	13.97	0.804

Electrowetting configuration

The electrostatic actuation is performed in a single-plate configuration, following the schematics presented in Figure 2.

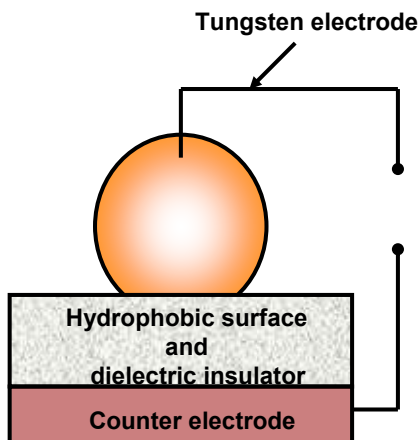


Figure 2. Schematic showing the configuration used for the electrowetting actuation experiments.

A 10 μ m Teflon film is used as the dielectric under the micro-structured surfaces. As recommended by Restolho *et al.* [30] a very thin film of sodium chloride was placed between the counter electrode and the dielectric to avoid the presence of an air gap.

The electrode dipped inside the droplet is a tungsten wire with 0.025mm diameter (Goodfellow Cambridge Ltd). The counter electrode is a copper cylinder. Both electrodes were connected to a Sorensen DCR600-.75B power supply and DC voltage is applied in increments of 25V. Reversibility measurements are performed decreasing the voltage from the maximum value down to 0V, also in steps of 25V. Although AC voltage is reported by some authors to lead to better performances of the electrowetting systems (e.g. [10]) one used DC voltage since the purpose of this work is to extrapolate some of these results to develop a test chip that may overcome the limiting frequencies for which the conditions for which Lippmann equation is valid are not satisfied [8]. At least 6 tests are performed to obtain an average curve (contact angle vs. applied voltage). An illustrative curve obtained for NaCl (50mM) is depicted in Figure 3.

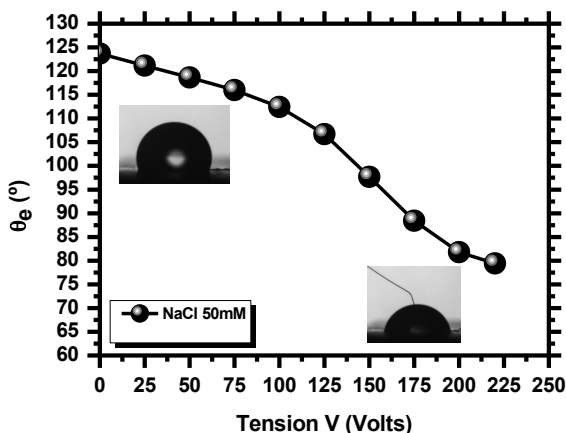


Figure 3. Illustrative curve of the contact angle as a function of the applied voltage, taken with a 3 μ L droplet of NaCl (50mM).

Viability tests

After the electrostatic actuation one must infer if the samples suffered significant modifications and if they are still viable. For the biological fluids used here, a major concern is the stability of the BSA protein, as this may denature due to the electrostatic actuation. This was checked by measuring the absorption spectra of the BSA solutions before and after the actuation experiments using a NanoDrop 2000c/2000 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific). The scans were performed in the 250-400 nm wavelength range using 2 μ l of solutions.

Results and Discussion

Static and dynamic wetting without electrostatic actuation

Table 3 summarizes the static angles for each of the liquid-surface pairs considered here. From a total of 15 tested surfaces, only those depicted in the table kept hydrophobic angles (over 100°) for all the liquids tested. The experiments performed also show no significant effect of varying the concentrations of NaCl or protein (BSA) in the solutions, so that only the results obtained for one illustrative concentration are depicted here. It is worth mentioning that although the static angles are overall quite high, only surface S5 rendered hysteresis of the order of 10° for the various liquids tested (i.e. the surface has superhydrophobic properties). This can be a problem during electrostatic actuation since it may preclude the occurrence of reversibility. To further investigate this issue and before submitting the samples to electrostatic actuation, forced droplet spreading was further characterized, by impacting the droplets on the surfaces at low velocities. The temporal evolution of the resulting contact diameter is depicted in Figure 4. In order to avoid an exhaustive description, results are only presented here for the spreading of plasma mock over surfaces S1, S2, S3 and S5. Given that the hysteresis is significantly high for most of these surfaces, pinning of the contact line may occur on the micro-patterns. Consequently, energy is dissipated at the contact line, so that a smaller spreading diameter of the droplets is observed over these surfaces. Also, the recoiling is lessened, thus suggesting that one will have an electrowetting induced irreversible motion over these surfaces. A similar trend was observed for all the other surfaces, including the PTFE surface.

Table 3. Equilibrium contact angles for the representative pairs liquid-surface used in the present work.

	Water	NaCl (100mM)	Plasma mock
S9	127	129.7	122
S10	140	143.7	144.9
S14	115.6	111	118
SHS	152.4	148.4	150
PTFE	112	112.2	112.4

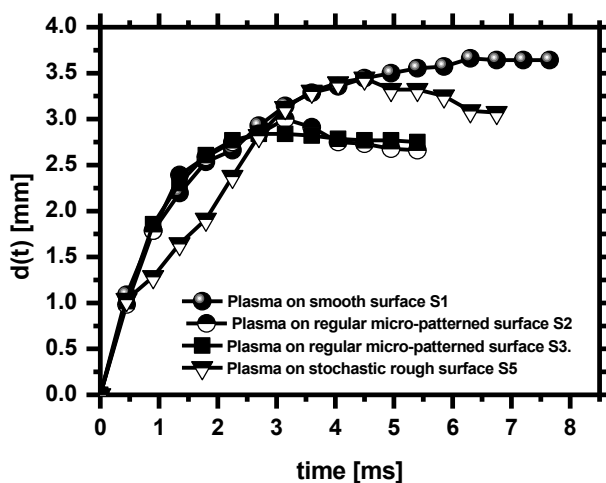


Figure 4. Spreading of a plasma mock droplet $D_0=3.2\text{mm}$, $U_0=0.44\text{m/s}$ over various surfaces without electrostatic actuation.

Non-Newtonian behaviour of the droplets

In agreement with the preliminary rheological analysis of the biological liquids, reported in the section of Materials and methods, the spreading morphology of these fluids does not depict any evident non-Newtonian behaviour. The

maximum spreading diameters of plasma mock and DNA droplets are further made dimensionless with the initial droplet diameter and are compared, in Figure 5, to the maximum spreading diameter of a Newtonian (water) and of non-Newtonian (water+xanthan mixtures) droplets, previous obtained in [31] and with the predictions of the Roisman *et al.* model [32].

This model was selected, as it was observed to be well fitted to a wide range of experimental impact conditions for Newtonian droplets, as reported in [31]. The reason for this good agreement is associated to a variable scaling of the viscous dissipation term in the energy balance, depending on the relative importance of this term in the spreading.

The results depicted in Figure 5 show that the experimental data obtained for plasma mock and DNA droplets are closer to those obtained for water and much apart from those obtained with water+xanthan mixture (0.35%wt), which has a strong non-Newtonian spreading behaviour. The differences observed between water when compared to the plasma mock and DNA data can be attributed to wetting differences due to the slight variation of the surface tension in the biological fluids.

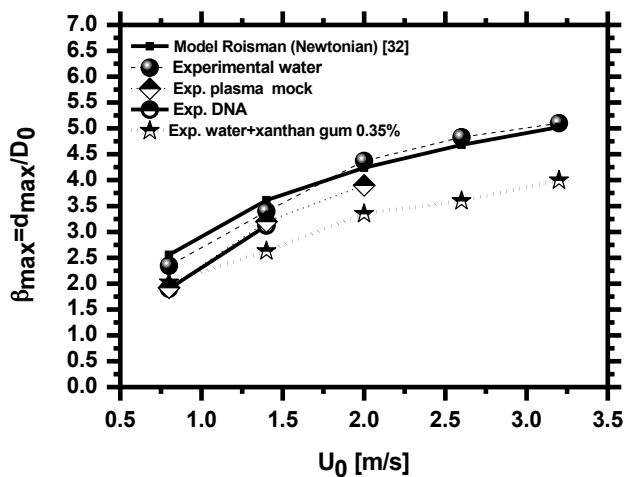


Figure 5. Characterization of possible non-Newtonian behavior of the DNA and plasma mock droplets by comparison with theoretical predictions of the spreading ratio $\beta_{max}=d_{max}/D_0$ and with other experimental results previously obtained in [31] with water+xanthan gum mixture droplets. All the droplets have a $D_0=3.2\text{mm}$ and impact on a smooth silicon surface at room temperature.

Static and dynamic wetting with electrostatic actuation

Droplet spreading induced by electrowetting was investigated for static and dynamic conditions. For static conditions the droplets were deposited on the substrates and actuated with gradually increasing voltage. For illustrative purposes, only the results with the PTFE substrate are shown as the surface is representative in terms of the static wetting effects as aforementioned, but one has not to deal with the additional effect of the regular micro-pattern, which requires deeper investigation.

In line with this, Figure 6 depicts the equilibrium contact angle as a function of the applied voltage for NaCl, blood plasma mock and BSA for different concentrations.

The results in the figure suggest a mild effect of the concentration for the various solutions. Hence, for NaCl, electrowetting is slightly enhanced (i.e. the contact angle decreases more with the applied voltage and this decrease is observed from lower values of the voltage) as the concentration increases from 50mM to 200mM. Then, electrowetting induced decrease of the contact angle becomes again less efficient for concentrations of 400mM. This suggests an optimum concentration around 100mM for the conditions tested here. Most of the authors (e.g. [12,33]) report an insignificant effect of the concentration of NaCl on the electrowetting-induced decrease of the contact angle. However these authors usually work with smaller droplets and lower salt concentrations. Also, [34] found an effect of pH and [8] suggest a possible modification of the electrical fields due to adsorption of the salts by the dielectric substrate which may in turn affect the electrowetting. The contact angle of the BSA solutions seem to be more difficult to decrease at lower actuation voltages, but shows a steeper slope for higher voltages, which suggests that the BSA transport is also promoted by small increases of its concentration. This may be also explained by the adsorption of the protein by the dielectric substrate, which affects the electrical field near the contact line, as BSA is negatively charged at the pH of the experiment. Hence, the relatively high saturation angle (about 80°) observed for the BSA solutions can be actually due to the time that the droplet is deposited over the surface that promotes the adsorption of the

molecules and locally changes the wettability, lowering the contact angle and making the motion of the contact line more difficult for the latest parts of the test, which correspond to the highest actuation voltage.

It is worth mentioning that the induced advance of the contact line was observed to be irreversible for all the electrowetting tests performed.

Additional information was obtained by observing the transient morphology of the actuated droplets, by high-speed visualization. In this case a new droplet is used for each droplet, to infer if the motion of the contact line was being influenced by the irreversibility caused by the decrease of the contact angle. Qualitative analysis of the high-speed videos (not shown here) evidences the occurrence of asymmetry in the shape of the droplet due to hysteresis. Also, in some cases the hysteresis leads so significant differences in the motion of the contact line that actually induce the slip of the droplet in the opposite direction.

Considering now a more quantitative analysis, Figure 7 shows the temporal evolution of the electrowetting induced spreading of the contact line, for the concentrations reported in Figure 6. $t=0$ corresponds to the time instant when the droplet is actuated. The curves obtained here are qualitatively in agreement with those reported by [23], exception made to the fact that our curves depict more oscillations. This maybe attributed to the high temporal resolution used here, which is larger than the velocity of contact line.

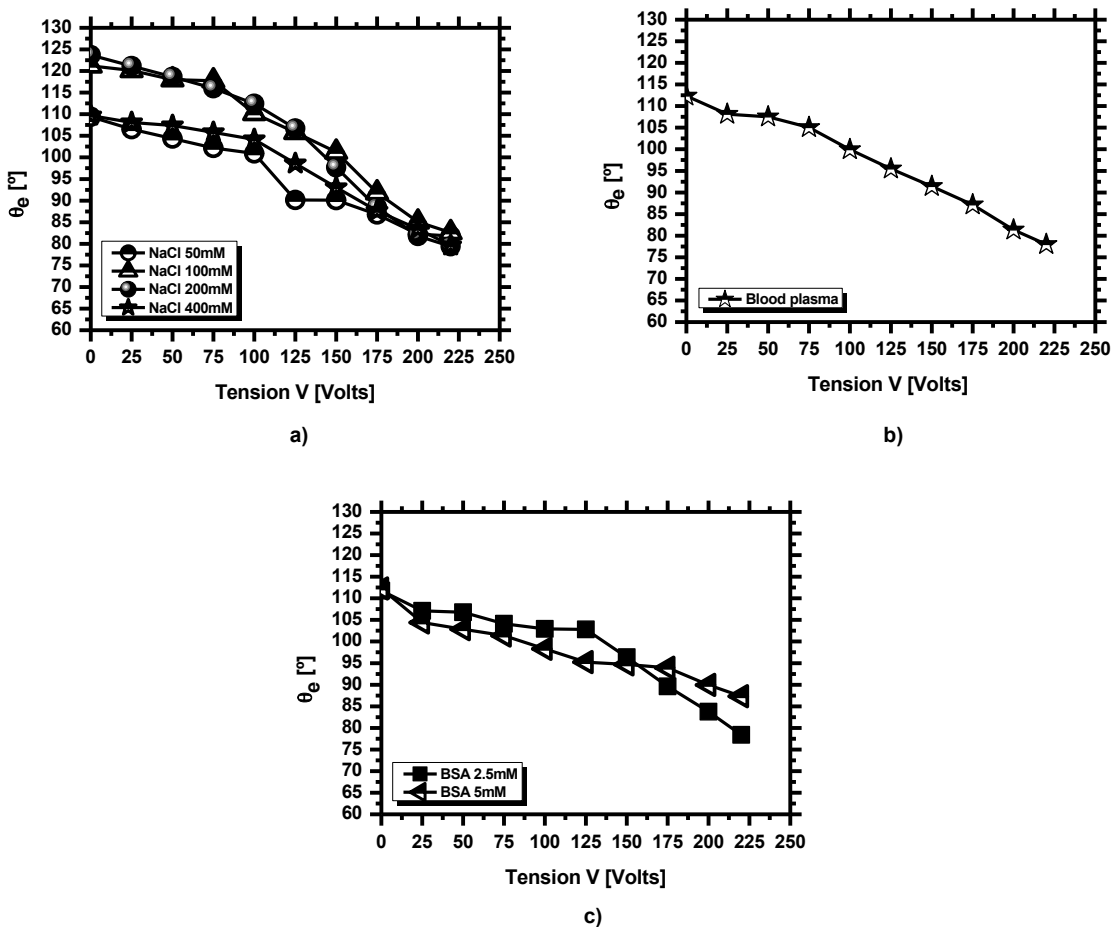


Figure 6. Contact angle as a function of the applied voltage for solutions of **a)** NaCl, **b)** plasma mock and **c)** BSA, for different concentration of the solutions. The droplets have an initial diameter $D_0=2.4$ mm.

Overall the spreading diameter is in agreement with the trends suggested in Figure 6, given that the electrowetting seems to be slightly promoted by the increase of the concentration. Here, the difficulty in the transport of the protein is not so clear, as the highest concentration BSA solution actually depicts one of the largest spreading diameters for the highest actuation voltage. Hence, the apparent limitation in droplet motion suggested in the static analysis for the solutions with higher concentration of BSA may be indeed related to local wetting modifications resulting from the long period that is available for adsorption of the molecules by the dielectric substrate.

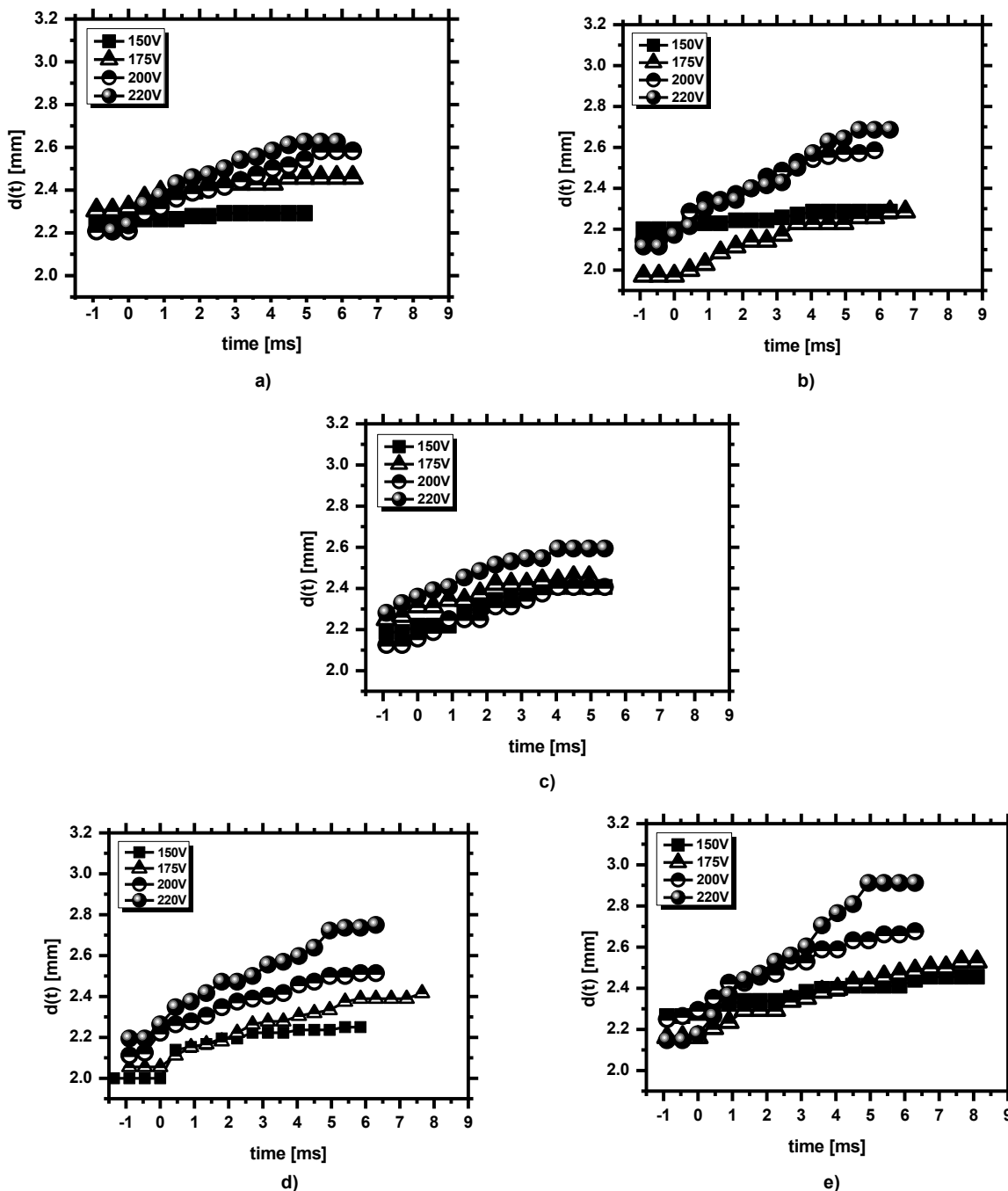


Figure 7. Electrowetting induced spreading of the contact line for solutions of **a)** NaCl (50mM), **b)** NaCl (100mM), **c)** plasma mock, **d)** BSA (1mM) and **e)** BSA (2.5mM). The droplets have an initial diameter $D_0=2.4$ mm.

Viability of the samples

The impact of electrostatic actuation on the stability of BSA was inferred by comparing the absorption spectra of the solutions before and after actuation. The tests were performed for the solutions with the lowest and highest concentrations of 1mM and 50mM, respectively. The obtained spectra, shown in Figure 8 reveal that BSA does not suffer any structural modification, as the spectra obtained before and after electrostatic actuation are similar. The increase in the absorption peak observed at 50mM concentration after electrowetting is ascribed to droplet evaporation, which leads to an increase in the concentration of 1.5times. This increase in the concentration is estimated to be indicative of a decrease in the volume of the droplet by evaporation of approximately 30%.

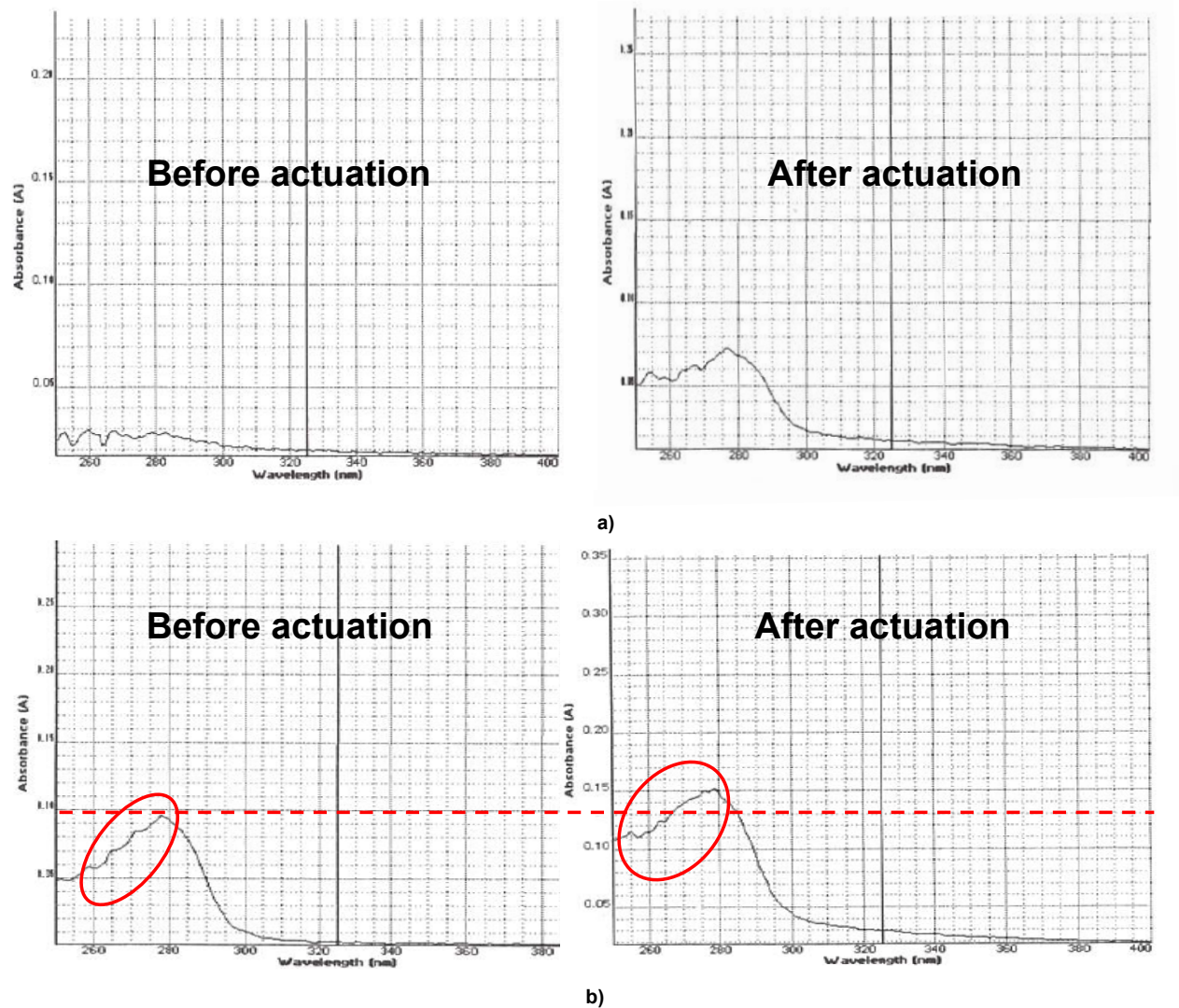


Figure 8. Absorption spectra obtained for the BSA solutions with **a)** 1mM and **b)** 50mM concentration before and after electrojetting.

To assure that droplet evaporation is actually caused by electrojetting and not by mass diffusion to the surrounding air, the absorption spectra were repeated on the samples by simply depositing the droplets over the substrate and waiting the time period that was required to complete tests with electrostatic actuation. The results, as depicted in Figure 9 confirm that the evaporation of the droplet is indeed caused by electrojetting. This maybe a problem for applications in lab-on-a-chip devices, particularly for diagnostic purposes which rely on the detection of the protein (or any other component transported in the droplet) and therefore deserves more attention in future studies.

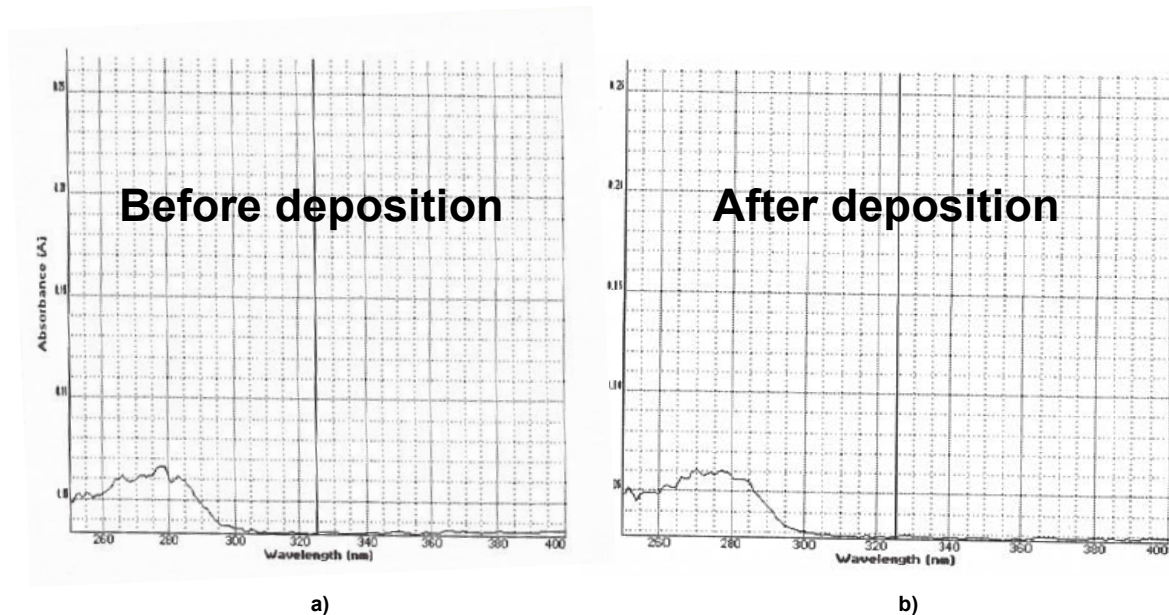


Figure 9. Absorption spectra obtained for a BSA solution (50mM) without electrostatic actuation. **a)** Spectrum of the original solution, **b)** spectrum of solution after deposition on the surface during the time period required for completion of the electro wetting tests.

Final Remarks

The present paper addresses the forced spreading of biological droplets over enhanced surfaces with and without electrostatic actuation, in the context of sample handling in lab-on-a-chip applications. The best performing enhanced surfaces are chosen based on the characterization of wettability (static and dynamic contact angles) and on the analysis of droplet impact at small velocities. The tests consider the use 2-3 μ L droplets of NaCl, plasma mock (100mmol/l NaCl, 1.2mmol/l BSA, 5.6mmol/l glucose) and BSA solutions with different concentrations.

Droplet spreading induced by electro wetting was investigated for static and dynamic conditions.

The results show a mild effect of the concentration of the salt and of the protein in promoting droplet motion by electro wetting. The static analysis of the electro wetting (based on the gradual evolution of the equilibrium angles) showed however a relatively high saturation angle for the BSA solutions, which limited the droplet motion at the highest actuation voltage. This information was however complemented with the dynamic analysis of the contact line motion (inducing droplet spreading) under electrostatic actuation, which refutes this trend showing large spreading of the contact line of BSA solutions, when actuated by the highest voltage. Hence, the apparent high saturation angle can be attributed to the adsorption of the molecules by the dielectric substrate, which may induce modifications of the wettability, if the droplet stays in contact with the dielectric for enough time.

Analysis of the absorption spectra of the samples before and after electro wetting reveals that the samples remain unchanged after electrostatic actuation, but that the transport droplet evaporates, causing an increase of the concentration of the biological sample.

Acknowledgements

The authors are grateful to Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) for partially financing the research under the framework of project PTDC/EME-MFE/109933/2009), which also supports J. A. Ramos with a fellowship. The work was also partially financed by FCT through the project RECI/EMS-SIS/0147/2012. A.S. Moita also acknowledges the contribution of FCT for Post-Doc Fellowship (Ref.:SFRH/BPD/63788/2009). Finally the authors would like to thank Professor J. L. Mata for his valuable help in setting up the electro wetting configuration.

References

- [1] Hong, L. and Pan, T., 2011, *Microfluid. Nanofluid.*, 10, pp. 991–997.
- [2] Park, J.K., Seung, J.L. and Kang, K.H., 2010, *Biomicrofluidics*, 4, pp. 024102.

- [3] Manz, A. and Becker, H., 1998, *Microsystem Technology in Chemistry and Life Science* (Springer Topics in Current Chemistry, 154).
- [4] Jakeway, S.C., de Mello, A.J. and Russel, E.L., 2000, *J. Anal. Chem.*, 355, pp. 525.
- [5] Hong, J.W. and Quake, S.R., 2003, *Nat. Biotechnol.* 21, pp. 1179.
- [6] Barbulovic-Nad, I., Yang, H., Park, P.S. and Wheeler, A. R., 2008, *Lab Chip*, 8, pp. 519-526.
- [7] Mohamed, H., Turner, J. N. and Caggana, M., 2007, *J. Chromatography A*, 1162, pp. 187-192.
- [8] Mugele, F. and Baret, J.-C., 2005, *J. Phys.: Condens. Matter*, 17, pp. R705-R774.
- [9] Cooney, C.G., Chen, C.-Y., Emerling, R., Nadim, A. and Sterling, J. D., 2006, *Microfluid Nanofluid*, 2, pp. 435-446.
- [10] Jones, T.B., 2005, *J. Micromechanics and Microengineering*, 15, pp. 1184-1187.
- [11] Pollack, M.G., Pamula, V.K., Srinivasan, V. and Eckhardt, A.E., 2011, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 11(4), pp.397-407.
- [12] Berge, B., 1993, *C. R. Acad. Sci*, II, 317, pp. 157.
- [13] Kuo, J.S., Spicar-Mihalic, P., Rodriguez, I. And Chiu, D., 2003, *Langmuir*, 19, pp. 250.-255.
- [14] Bahadur, V. and Garimella, S.V., 2006, *J. Micromechanics and Microengineering*, 16, pp. 1494-1503.
- [15] Srinivasan, V., Pamula, V.K. and Fair, R.B., 2004, *Lab Chip*, 4, pp. 310.
- [16] Srinivasan, V., Pamula, V.K. and Fair, R.B., 2004, *Appl. Phys. Lett.*, 82, pp. 4187.
- [17] Yoon, J.Y. and Garrell, R.L., 2003, *Anal. Chem.*, 75, pp. 5097.
- [18] Wheeler, A.R., Moon, H., Kim, C.J., Loo, J. and Garrell, R.L., 2004, *Anal. Chem.*, 76, pp. 4833.
- [19] Sharma, K. and Bhat, S.V., 1992, *Phys. Chemistry and Physics and Medical NMR*, 24(4), pp. 307-312.
- [20] Brust, M., Schaefer, C., Doerr, R., Pan, L., Arratia, P.E. and Wagner, C., 2013, *Phys. Rev. Lett.*, 110, pp. 078305.
- [21] Robins, *Trans. Faraday Soc.*, 1964, 60, pp. 1344-1351.
- [22] Moita, A.S., Herrmann, D. And Moreira, A.L.N., Sept. 1-4 2013, 25th European Conference on Liquid Atomization and Spray Systems, Chania, Greece.
- [23] Annapragada, S.R., Dash, S., Garimella, S.V. And Murthy, J.Y., 2011, *Langmuir*, 27(8), pp. 8198-8204.
- [24] Moita, A.S. and Moreira, A.L.N., 2007, *Int. J. Heat Fluid Flow*, 28, pp. 735-52.
- [25] Moreira, A.L.N., Moita, A.S. and Panão, M.R., 2010, *Progress in Energy and Combustion Science*, 36, pp. 554-80.
- [26] Rioboo R, Tropea C. and Marengo M., 2002, *Atom. and Sprays*, 11, pp. 155-65.
- [27] Cheng P., 2008, PhD Thesis, University of Toronto, Canada.
- [28] Kietzig AM., 2008, *Plasma Processes and Polymers*, 8, pp.1003-1009.
- [29] Cross, M.M., 1965, *J. Colloid Sci.*, 20, pp.417-437.
- [30] Restolho, J., Mata, J.L. and Saramago, B., 2009, *Langmuir*, 113, pp. 9321-9327.
- [31] Moita, A.S., Herrmann, D. and Moreira, A.L.N., 2014, *Applied Thermal Eng.*
- [32] Roisman, I. V., Berberovic E. and Tropea, C., 2009, *Phys. Fluids*, 21(5), pp. 052103.
- [32] Verheijen, H.J.J. and Prins, M.W.J., 1999, *Langmuir*, 15, pp. 6616.
- [34] Quinn, A., Sdev, R. And Ralston, J., 2003, *J. Phys. Chem. B.*, 107, pp. 1163.