



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA



ISEL
INSTITUTO SUPERIOR DE
ENGENHARIA DE LISBOA



**ESCOLA SUPERIOR DE
TECNOLOGIA DA SAÚDE
DE LISBOA**
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

Instituto Superior de Engenharia de Lisboa

Escola Superior de Tecnologia e Saúde de Lisboa

Estudo das propriedades protetoras de barreiras microbianas eletricamente ativas para aplicação em queimados

Catarina da Costa Marques

Licenciada em Engenharia Química e Biológica

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores:

Professor Dr. Manuel José de Matos (ISEL)

Dr.^a Ana Maria de Matos Charas (Instituto de Telecomunicações)

Júri:

Presidente: Dr.^a Cecília R. C. Calado (ISEL)

Arguente: Dr. Nelson Alberto Frade da Silva (ISEL)

Orientador: Dr.^a Ana Maria Matos Charas (Instituto Telecomunicações)

Novembro de 2019

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor Manuel Matos, devo o maior dos agradecimentos por toda a partilha de conhecimentos, pelo nível de exigência, pela motivação em fazer sempre mais e melhor e pelo excelente ambiente vivido no laboratório, sempre com positivismo em todas as situações e decisões. Toda a disponibilidade e apoio incondicional foi sem dúvida essencial para possibilitar que este projeto ficasse concluído.

À minha co-orientadora Doutora Ana Charas, também agradeço por todo o apoio e conhecimentos transmitidos no instituto de telecomunicações. Todo o tempo disponibilizado e por toda a ajuda e encorajamento para conclusão deste projeto.

Ao professor Nelson Silva, agradeço todo o apoio no Laboratório de Genética e todo o conhecimento transmitido.

A todos os colegas que se cruzaram comigo nos laboratórios, agradeço todo o tipo de ajuda e disponibilidade.

Ao Diogo Marques, meu marido, agradeço por toda a compreensão e companheirismo diário, por acreditar sempre em mim e me motivar todos os dias a fazer melhor sem nunca desistir.

À Matilde Marques, minha filha, que me acompanhou durante todo este projeto, desde que estava ainda na barriga, só tenho a agradecer por ser uma bebé muito tranquila e uma força diária possibilitando a conclusão deste projeto.

Ao Martim Bento, meu sobrinho, agradeço por toda a paciência e maturidade de tão pequeno perceber que não lhe podia dar atenção diariamente durante as suas férias, por ter de concluir este desafio.

À minha irmã, Patricia Bento e ao meu cunhado, Celestino Bento, agradeço por toda a ajuda ao longo deste percurso.

Por fim, mas mais importante, aos meus pais, Rui Marques e Maria Luísa Damião agradeço por todo o apoio incondicional, não só agora, mas ao longo de toda a minha vida académica, que incansavelmente estiveram sempre presentes para dar uma palavra de encorajamento nos momentos mais difíceis e críticos, apoiando em todas as decisões.

Resumo

Este projeto baseia-se no estudo das propriedades protetoras de barreiras microbianas eletricamente ativas para aplicação em queimados. As queimaduras representam um problema de particular relevância, pois muitos pacientes enfrentam grandes dificuldades relacionadas com alterações físicas, em termos de aparência e funcionalidade, o que tem grande impacto a nível psicológico.

Com este trabalho, pretendeu-se avaliar a conceção e construção de barreiras à entrada de microrganismos e outros agentes patogénicos através de feridas, na forma de pensos eletroativos. A intervenção destes pensos tem como finalidade o tratamento do doente queimado, a prevenção de sequelas e redução do tempo de internamento, visando a restauração e funcionalidade da área queimada.

Inicialmente, procedeu-se à impressão de pensos na forma de circuitos elétricos sobre vários tipos de substratos, utilizando um polímero orgânico condutor conhecido como PEDOT:PSS, como tinta, e uma impressora de jato de tinta de elevada resolução - Dimatix Fujifilm. Posteriormente foi medida a resistência elétrica dos mesmos para avaliar a efetividade da impressão nos diferentes substratos utilizados, nomeadamente em papel de filtro e em papel de impressão.

Avaliou-se a combinação das características "cobertura de tinta" obtida na impressão e a intensidade de corrente medida para planear um circuito de desenho otimizado, com dimensões adequadas à sua colocação em caixa de petri, para futura inoculação de microrganismos. Com este novo circuito, foram realizadas impressões com tinta de prata.

Incubaram-se os circuitos em vários tipos de substratos – papel de impressão e papel de filtro – utilizando quer a tinta PEDOT:PSS quer a tinta de prata, e os mesmos foram inoculados com água residual tratada, num meio de *Luria Bertani* e com imposição de corrente. Observou-se a evolução do desenvolvimento dos microrganismos presentes na água, a uma temperatura de incubação de 37°C, sobre os circuitos impressos, sob a aplicação de um campo elétrico aos mesmos e na sua ausência.

Palavras-chave: Queimaduras, circuitos, pensos eletroativos, impressão por jato de tinta, meio *Luria Bertani*

Abstract

This project is based on the study of the protective properties of electrically active microbial barriers for application in patients with burns. Burns are undoubtedly a very sensitive issue, many patients face major difficulties related to physical changes in terms of appearance and functionality, which has great psychological impact.

With this work, we intend to evaluate the design and construction of barriers to act against the entry of micro-organisms and other pathogens through wounds, in the form of electroactive dressings. The intervention of these dressings aims to treat the burn patient, prevent sequels and reduce the length of stay in hospital, aiming at the restoration and functionality of the burned area.

Initially, PEDOT:PSS ink circuits were printed to optimise and understand the operation of the Dimatix Fujifilm printer used for printing these circuits. Subsequently current measurements were made to the printed circuits to assess how they behaved in the different substrates used, namely filter paper and printing paper.

The cover obtained in the printout and the amount of current obtained were studied to then create a new circuit design that would allow it to be placed in a Petri box to allow inoculation of microorganisms. With this new circuit, silver ink prints were made, and this in itself has already presented antimicrobial properties.

The printed circuits were incubated on the different substrates and with the different inks, inoculated with wastewater treated in a Luria Bertani medium and having a current passed through them. The behaviour of the microorganisms present in the water was observed when incubated at 37°C in printed circuits to assess which circuit is most advantageous for the design of the electroactive dressings.

Keywords: Burns, circuits, electroactive dressings, inkjet printing, *Luria Bertani* medium

Lista de Abreviaturas e Siglas

NASA	National Aeronautics and Space Administration
PEDOT:PSS	poli(3,4-etilenodioxo-tiofeno)-poli(estireno-sulfonato)
ART	Água Residual Tratada

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Lista de Abreviaturas e Siglas	iv
1. Introdução	12
1.1. Anatomia e Fisiologia da Pele.....	12
1.2. Queimadura	13
1.2.1. Classificação da queimadura	13
1.2.2. Infecções de queimaduras.....	14
1.3. Microrganismos de Infecção no Meio Hospitalar	14
1.4. Tratamento de Queimaduras	15
1.4.1. Curativos com pensos	16
1.4.1.2. Pensos electroativos	16
1.4.2. Enxerto de pele	17
1.5. Estimulação elétrica	17
1.5.1. Fenzian	18
1.6. Introdução ao método de fabricação de pensos electroativos	18
1.7. Impressão a jato de tinta	19
1.8. Impressora Dimatix Fujifilm DMP-2831	19
1.8.1. Preparação do Cartucho	20
1.8.2. Substrato	21
1.8.3. Parâmetros de impressão	21
1.8.4. Criação de padrões	22
1.8.5. <i>Drop Watcher</i>	23
1.8.6. <i>Fiducial Camera</i>	23
1.9. Objetivos e visão geral da investigação.....	23

1.10. Estrutura da tese	24
2. Parte Experimental	26
2.1. Fabrico de pensos electroativos por impressão de jato de tinta. Ensaio de impressão com PEDOT:PSS.....	26
2.2. Medição da resistência elétrica dos circuitos impressos	29
2.3. Impressão de circuitos para ensaios de precisão.....	29
2.4. Medição de corrente elétrica nos circuitos impressos para estudos de precisão	30
2.5. Otimização do desenho do circuito. Impressão com tinta de prata.	34
2.6. Visualização dos circuitos com perfilómetro	36
2.7. Inoculação dos meios com microrganismos presentes em água residual tratada. Ensaio da inoculação dos circuitos nos meios com imposição de corrente	37
2.7.1. Preparação do meio <i>Luria Bertani</i> para inoculação.	37
2.7.2. Ensaio com meios inoculados	38
2.7.3. Inoculação dos meios com os circuitos.....	39
3. Resultados e Discussão	42
3.1. Primeiros circuitos impressos com PEDOT:PSS para otimização da impressão	42
3.2. Circuitos impressos para estudos de precisão.	45
3.3. Determinação da resistência nos circuitos impressos para estudos de precisão.....	46
3.4. Impressão dos circuitos para caixa de petri. Impressão com tinta de prata.	53
3.5. Resultados obtidos com perfilómetro	59
3.6. Circuitos inoculados nos meios de <i>Luria Bertani</i> com imposição de corrente.....	59
4. Conclusões e Perspetivas Futuras	66
5. Bibliografia	70
6. Anexos	73
Circuitos impressos e respetivas características de impressão e observação microscópica ...	73

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura da pele evidenciado as três camadas principais [3].....	13
Figura 2 - Representação dos três graus de queimadura de acordo com a profundidade da alteração [5].....	13
Figura 3 – Enxerto autólogo de pele: (A) enxerto de pele de espessura parcial retirado do local saudável. (B) Enxerto de pele é mesclado para aumentar a área de superfície. (C) Aplicação do enxerto de pele na queimadura [8].	17
Figura 4 – Dispositivo utilizado no sistema de tratamento fenziانو [11].	18
Figura 5 – Impressora Dimatix Fujifilm DMP-2831.	19
Figura 6 – Primeiro circuito testado para otimização de impressão.....	26
Figura 7 – Estrutura química do PEDOT:PSS [14].	27
Figura 8 - Fotografias dos primeiros circuitos impressos em diferentes tipos de substrato. (B#01) Papel Navigator, (B#02) biocelulose, (B#05) Papel de filtro, visualizados com um microscópio ótico.	28
Figura 9 - Fotografia da visualização com microscópio ótico do circuito impresso em papel fotográfico (B#07).....	28
Figura 10 - Primeiro método de medição de corrente com dois pontos.....	29
Figura 11 – Esquema de medida de resistência de um material pelo método de quatro pontos.	31
Figura 12 - Segundo método de medição de corrente com quatro pontos.....	31
Figura 13 – Método de medição de corrente com dois pontos.	32
Figura 14 - Método de medição de corrente com quatro pontos utilizado.	32
Figura 15 - Método de medição de corrente com quatro pontos utilizado.	33
Figura 16 – Dispositivo em pormenor utilizado na medição com quatro pontos.	33
Figura 17 - Desenho inicial do circuito para impressão em papel de impressão.	34
Figura 18 - Desenhos do circuito para impressão em papel de impressão (esquerda) e em papel de filtro (direita).....	34
Figura 19 - Amostra de água residual tratada (ART) e amostras diluídas.	38
Figura 20 - Representação esquemática da inoculação efetuada por fases.....	39
Figura 21 - Ligação entre todos os circuitos na estufa de incubação.....	40

Figura 22 - Ilustração do esquema de imposição de uma diferença de potencial nos circuitos.	40
Figura 23 - Fotografias da visualização com microscópio do circuito B#01.....	43
Figura 24 - Fotografias da visualização com microscópio do circuito B#02.....	43
Figura 25 - Fotografias da visualização com microscópio do circuito B#05.....	44
Figura 26 - Fotografias da visualização com microscópio do circuito B#06.....	44
Figura 27 - Fotografias da visualização com microscópio do circuito B#07.....	45
Figura 28 – Ilustração da forma de medição da resistência.	47
Figura 29 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear. Para o circuito B#08_a.....	48
Figura 30 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear. Para o circuito B#08_b.....	48
Figura 31 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear. Para o circuito B#08_c.....	49
Figura 32 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear. Para o circuito B#08_d.....	49
Figura 33 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear. Para o circuito B#09.	50
Figura 34 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear. Para o circuito B#10.	50
Figura 35 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear. Para o circuito B#11.	51
Figura 36 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear. Para o circuito B#12.	51
Figura 37 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear. Para o circuito B#13.	51
Figura 38 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear. Para o circuito B#14.	52
Figura 39 - Primeiro circuito criado para impressão em caixa de petri (B#15).....	53

Figura 40 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear. Para o circuito B#16.	54
Figura 41 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear. Para o circuito B#17.	54
Figura 42 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear. Para o circuito B#19.	55
Figura 43 - Fotografia do circuito impresso em papel de filtro, P#07, e impresso em papel de impressão, P#10.	55
Figura 44 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear. Para o circuito P#01.....	56
Figura 45 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear. Para o circuito P#02.....	56
Figura 46 - Medição de corrente para um circuito de prata com o método de medição de quatro pontos.....	57
Figura 47 - Fotografias do circuito P#02 visualizado a microscópio ótico.	58
Figura 48 - Fotografias do circuito P#08 visualizado a microscópio ótico.	59
Figura 49 - Representação gráfica obtida para o perfil de uma linha impressa no circuito B#14.	59
Figura 50 - Meio inoculado apenas com ART após dois dias de incubação.	60
Figura 51 - Meio inoculado com diluição 1:10 de ART após dois dias de incubação.....	60
Figura 52 - Meio inoculado com diluição 1:50 de ART após dois dias de incubação.....	60
Figura 53 - Meio inoculado com ART após incubação, branco.....	61
Figura 54 - Circuito impresso com tinta de prata em papel de filtro, P#07.....	61
Figura 55 - Circuito impresso com tinta de prata em papel de impressão, P#11.....	62
Figura 56 - Circuito impresso com tinta de prata em papel de filtro, P#06.....	62
Figura 57 - Circuito impresso com tinta de prata em papel de impressão, P#01.....	62
Figura 58 - Circuito impresso com tinta PEDOT:PSS em papel de filtro, B#18.	63
Figura 59 - Circuito impresso com tinta PEDOT:PSS em papel de impressão, B#16.	63
Figura 60 - Circuito impresso com tinta PEDOT:PSS em papel de filtro, B#20.	64

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Microrganismos mais comuns causadores de infecções em queimaduras [8], [9].	15
Tabela 2 – Método correto de preparação do cartucho [13].	21
Tabela 3 – Parâmetros testados na impressão de circuitos com tinta PEDOT:PSS.	30
Tabela 4 - Diferentes circuitos impressos nos diferentes substratos com tinta de PEDOT:PSS.	35
Tabela 5 - Diferentes circuitos impressos com tinta de prata nos diferentes substratos.	36
Tabela 6 – Características dos circuitos inoculados.	39
Tabela 7 – Circuitos e respectivas características de impressão.	42
Tabela 8 – Características de impressão e observações dos circuitos de estudo de precisão.	46
Tabela 9 – Resistências elétricas obtidas para os circuitos descritos impressos com tinta PEDOT:PSS.	52
Tabela 10 – Características de impressão e observações dos circuitos de estudo de precisão.	58
Tabela 11 – Valores obtidos da medição de corrente após incubação dos circuitos nos meios.	64
Tabela 12 - Circuitos e respectivas características de impressão e observação microscópica.	73
Tabela 12 - Circuitos e respectivas características de impressão e observação microscópica (cont.).	74

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

1.1. Anatomia e Fisiologia da Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo responsável pelo revestimento e delimitação do mesmo. A pele é um órgão metabolicamente ativo com uma variedade de funções vitais e essenciais para a manutenção da homeostase e a proteção do corpo. De entre estas funções, a de barreira contra agentes químicos e físicos, nomeadamente queimaduras, ajuda na regulação da temperatura corporal e evita a perda de fluidos corporais. A pele apresenta também uma grande sensibilidade devido à presença de terminações sensitivas que contêm recetores detetores de estímulos, sendo também responsável pela produção de vitamina D e pela produção de peptídeos antimicrobianos [1].

A pele é composta por três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme, sendo estes tecidos bastante distintos entre si, mas muito interligados e complementares [1]. A epiderme é a camada externa da pele, formada por uma camada epitelial escamosa estratificada e composta principalmente por queratinócitos e melanócitos. Este é um tecido constantemente em regeneração, tendo na sua composição células em constante diferenciação e morte celular [1], [2].

A derme é uma camada espessa de tecido fibroso e elástico que fornece suporte estrutural e nutricional à epiderme. É nesta camada que se encontram as terminações nervosas, vasos sanguíneos e as estruturas anexas, nomeadamente, glândulas sudoríparas, folículos capilares e glândulas sebáceas. A derme está dividida em duas regiões: a derme papilar fina e superficial, e a derme reticular, mais espessa e profunda. As fibras de colagénio, as fibras elásticas e a matriz extracelular são os principais componentes da matriz dérmica e todos eles são produzidos por fibroblastos dérmicos. No entanto, 70% da derme é composta por fibras de colagénio [1], [2]. A derme é responsável por conferir flexibilidade e resistência estrutural à pele, remover produtos de excreção e também regular a temperatura corporal [1].

A hipoderme é composta principalmente por adipócitos e situa-se abaixo da derme e acima dos músculos, apresentando uma grande variedade de funções no corpo. A hipoderme facilita a mobilidade da pele e funciona como reserva de energia [1], [2].

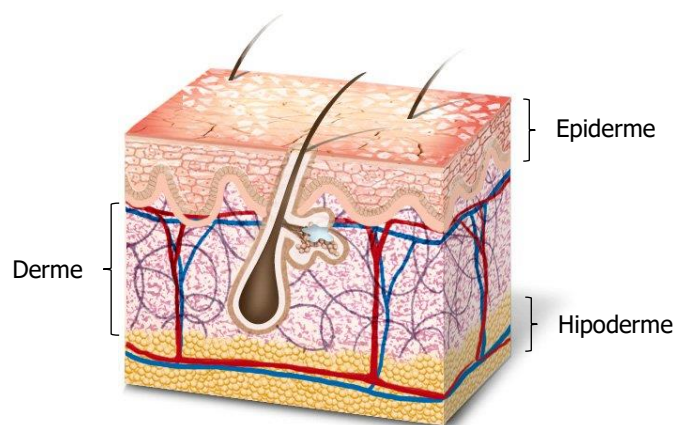


Figura 1 – Estrutura da pele evidenciado as três camadas principais [3].

1.2. Queimadura

A queimadura é uma alteração provocada por um agente químico ou físico que ocorre a nível da pele ou de outros tecidos. Estas classificam-se pela sua profundidade e pela percentagem de área de superfície total danificada. A gravidade da queimadura depende da sua extensão, localização e profundidade da mesma [4], [5].

Como anteriormente referido, a pele desempenha várias funções vitais para o organismo e, aquando de uma lesão por queimadura, algumas destas funções vitais podem ser alteradas ou mesmo perdidas.

1.2.1. Classificação da queimadura

De acordo com a sua profundidade, as queimaduras são classificadas em três graus, que se ilustram na figura 2.

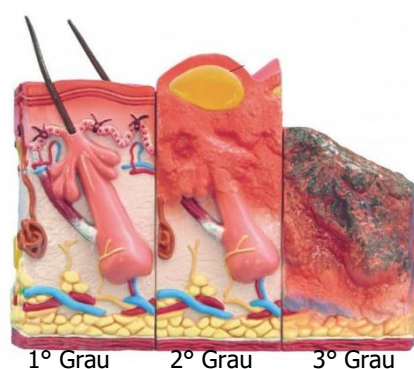


Figura 2 - Representação dos três graus de queimadura de acordo com a profundidade da alteração [5].

As queimaduras de primeiro grau afetam apenas a epiderme. Esta é uma queimadura superficial, uma vez que afeta apenas as camadas superficiais da epiderme. Provoca uma ligeira reação inflamatória e a cicatrização ocorre em 3 a 6 dias após cessar a reação inflamatória [4], [5].

As queimaduras de segundo grau, ou queimaduras superficiais de espessura parcial, ocorrem na epiderme e na camada papilar. A camada epidérmica é completamente destruída, mas a derme sofre apenas uma pequena lesão. Observa-se a presença de flitenas que protegem contra infecções, e são mais dolorosas que as queimaduras de primeiro grau. A cicatrização ocorre em 1 a 2 semanas [4], [5].

Nas queimaduras de terceiro grau, ou queimaduras de espessura total, as camadas epidérmicas e dérmicas encontram-se totalmente destruídas e a camada adiposa subcutânea também pode ser lesada. Destruídas todas as terminações nervosas, estas queimaduras são praticamente indolores, sendo o principal problema o dano causado no sistema vascular periférico. A cicatrização espontânea ocorre somente na região periférica, sendo na maioria dos casos necessário recorrer a excisão e enxerto de pele [4], [5].

1.2.2. Infecções de queimaduras

As infecções são um problema significativo, uma vez que comprometem a barreira criada pela pele contra microrganismos [6]. As queimaduras são habitualmente colonizadas por microrganismos infecciosos presentes no ambiente (bactérias) ou até mesmo no intestino do paciente. Estes microrganismos infecciosos têm uma maior capacidade para se multiplicarem mais rapidamente que quaisquer células humanas, pelo que, durante um só dia uma bactéria se pode transformar em 10 milhões [6].

A maioria das bactérias provêm da unidade hospitalar, dos profissionais de saúde, dos visitantes ou dos equipamentos. Para prevenir as infecções em pacientes com queimaduras, estes devem ser instalados em quartos individuais, a pressão das salas deve ser positiva e é necessário ter o máximo cuidado com tudo o que contacta com o paciente para evitar fontes de contaminação [6].

1.3. Microrganismos de Infecção no Meio Hospitalar

As tendências arquitetónicas modernas para alcançar uma maior eficiência energética têm afetado negativamente a qualidade do ar no interior de todos os edifícios em geral e

edifícios hospitalares em particular [7]. As infecções hospitalares sempre foram bastante comuns; no passado a sua ocorrência foi atribuída essencialmente a fracas condições de higiene e inadequada esterilização de objetos. No presente, apesar de notórias as melhorias nas condições hospitalares, as infecções hospitalares ainda são muito frequentes, sendo a causa mais comum de mortalidade após lesão por queimadura [7], [8].

Existem outros fatores que promovem a infecção microbiana relacionados com a idade do paciente, a presença de doenças, a extensão e profundidade da queimadura ou mesmo a utilização de cateteres, urinários ou venosos [9].

Os principais microrganismos que causam infecções podem ser classificados em dois grupos: bactérias gram-positivas e gram-negativas. As gram-negativas são as que causam a maioria das infecções em queimaduras. Existem espécies nestes dois grupos que são mais comuns na causa de infecção em queimaduras, como se mostra na tabela 1 [7], [8], [9].

Tabela 1 – Microrganismos mais comuns causadores de infecções em queimaduras [8], [9].

Grupo	Espécie
Gram-negativa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Actinetobacter baumannii</i>
	<i>Enterobacteriaceae</i>
Gram-positiva	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Streptococcus</i>
	<i>Enterococcus</i>

Alguns destes microrganismos tornaram-se resistentes aos antibióticos representando um enorme desafio para o tratamento das queimaduras. Os principais são o *Staphylococcus aureus*, que é resistente à metilina, principal agente infeccioso, e os *Enterococcus* resistentes à vancomicina, que é um agente menos comum [8].

1.4. Tratamento de Queimaduras

Os métodos de tratamento de queimaduras são muito variados, sendo um tema em constante desenvolvimento visando aprimorar o tratamento das queimaduras, com foco na infecção, controlo da dor, tratamento para cicatrizes e menor tempo de recuperação [8]. Para este efeito, a ciência conta com um avanço e novas estratégias desenvolvidas para melhorar estes aspetos.

1.4.1. Curativos com pensos

Existem quatro grupos para a classificação dos pensos para feridas: pensos biológicos; pensos bio sintéticos; pensos convencionais e pensos antimicrobianos. Estes pensos são desenvolvidos para cobertura da ferida, a fim de ajudar na reepitelização, prevenir a infecção da ferida e a dessecação da pele [8]. Porém, estes pensos não são completamente viáveis, uma vez que todos eles apresentam algum inconveniente aquando da sua utilização em queimaduras.

No caso dos pensos biológicos, estes não podem ser utilizados como substitutos permanentes da pele devido a disparidade imunológica. Estes pensos têm uma oferta limitada e apresentam risco de transferência de microrganismos infecciosos [8].

Os pensos convencionais que não contêm qualquer antibiótico ou medicamento, tendem a aderir à superfície da ferida sendo necessário a sua substituição mais rapidamente, o que pode traumatizar a superfície recém-epitelizada e retardar a cicatrização. No entanto, os pensos antimicrobianos são utilizados para prevenir a infecção das queimaduras, minimizando a colonização de bactérias. A maioria destes tem na sua composição prata, tendo-se demonstrado que esta pode reduzir significativamente a incidência de morte por infeções nas queimaduras [8].

1.4.1.2. Pensos electroativos

Recentemente, em 2013, a NASA anunciou o desenvolvimento de um dispositivo na forma de penso protetor da pele e com função curativa que utiliza um material (polímero) electroativo [10]. O polímero é estimulado pelo calor do corpo e pela pressão resultante do crescimento celular, o que o torna muito vantajoso, pois não é necessária uma fonte exterior de energia para a sua atuação. Apesar de não serem bem conhecidos os detalhes desta tecnologia, os autores referem que o polímero utilizado é um termoplástico piezoelétrico, que é preparado com estrutura fibrilar por uma técnica de "electro-spin" modificada. A pressão/força mecânica gerada no local da queimadura provoca a geração de um sinal elétrico na matriz polimérica que é benéfica à cura da queimadura, provavelmente devido à estimulação de crescimento celular. Os autores defendem que os pensos apresentam uma durabilidade muito elevada e é de baixo custo. Apesar das aparentes vantagens desta tecnologia, não são conhecidos até ao momento outros pensos para queimaduras que incorporem materiais electroativos [10].

1.4.2. Enxerto de pele

As queimaduras de espessura parcial profunda, ou seja, queimaduras de segundo grau, não podem ser fechadas pelo processo primário de cicatrização ou por sutura, são necessários procedimentos cirúrgicos adicionais. O tratamento mais utilizado nestes casos é a excisão precoce do tecido necrótico, seguida de enxerto de pele autólogo. O enxerto de pele envolve o transplante de pele saudável de um local do paciente não danificado para o local da ferida, como se mostra na figura 3 [8].



Figura 3 – Enxerto autólogo de pele: (A) enxerto de pele de espessura parcial retirado do local saudável. (B) Enxerto de pele é mesclado para aumentar a área de superfície. (C) Aplicação do enxerto de pele na queimadura [8].

A utilização de enxertos de pele mesclada para aumentar a área de superfície compromete a qualidade do enxerto original e a área queimada cura com um padrão de malha irregular, de onde podem resultar em cicatrizes graves [8].

1.5. Estimulação elétrica

As cicatrizes deixadas na pele, quer devido a queimaduras ou quaisquer outras razões, e dependendo da área do corpo onde se encontram, podem afetar a qualidade de vida dos pacientes [11]. Procedimentos invasivos e que possam causar dor são muitas vezes inaceitáveis pelos pacientes e por isso, a procura de uma solução não invasiva representa um avanço significativo.

A pele humana saudável possui um potencial elétrico endógeno e um potencial de corrente transcutânea, gerado na epiderme. Quando uma lesão afeta a integridade epidérmica, a lesão gera um campo elétrico lateral, tanto na epiderme como abaixo da epiderme, fenómeno conhecido como “efeito da corrente de lesão”, durante a cicatrização a

corrente retorna ao seu nível inicial [11]. Deste modo, a aplicação de níveis de corrente semelhantes aos produzidos pelo organismo durante a recuperação normal do tecido pode promover a cicatrização de lesões e o tratamento de feridas.

1.5.1. Fenzian

O sistema de electroestimulação de biofeedback fenziano é uma terapia que fornece uma corrente de electroestimulação transcutânea de baixa intensidade. Esta terapia assenta na teoria de que o potencial elétrico da pele forma uma rede elétrica global e que qualquer alteração na impedância da pele altera a atividade neurológica [11].

O sistema fenziano é um tratamento não invasivo que deteta a impedância elétrica da pele usando um gerador de microcorrente. O sinal do transformador de saída é medido através de um eletrodo concêntrico e é aplicado um impulso de biofeedback. O fenzian é um dispositivo portátil, aplicado na pele do paciente e a estimulação elétrica utiliza correntes da ordem dos microamperes. O dispositivo (figura 4) possui um eletrodo que é mantido em contato com a pele durante o tratamento, e os impulsos são de curta duração e de amplitude relativamente alta (80 V) [11].



Figura 4 – Dispositivo utilizado no sistema de tratamento fenziano [11].

1.6. Introdução ao método de fabricação de pensos electroativos

Neste trabalho, foram fabricados pensos electroativos através da impressão de circuitos elétricos, criteriosamente desenhados em substratos à base de celulose, utilizando tintas condutoras e uma impressora a jato de tinta de alta resolução (Dimatix FujiFilm DMP-2831). Nas seguintes secções, são descritos os principais aspetos que caracterizam a técnica de impressão utilizada, assim como requerimentos e procedimentos necessários á sua correta utilização.

1.7. Impressão a jato de tinta

As primeiras técnicas de impressão a jato de tinta desenvolvidas utilizavam um jato contínuo, no qual as gotas são carregadas eletricamente e direcionadas para o substrato sob ação de um campo elétrico. Posteriormente surgiram as impressoras com controlo *drop-on-demand*, em que as gotas são produzidas apenas quando necessárias e na posição correta sobre o substrato, não havendo necessidade de campo elétrico. A estrutura básica das impressoras a jato de tinta por *drop-on-demand* consiste de uma pequena câmara onde a tinta é ejetada por orifícios por ação de uma força exercida pela movimentação controlada de outro material. Esse controle pode ser feito termicamente, com uso de acústica, eletrostática ou por materiais piezoelétricos. [12].

As impressoras que utilizam piezoelétricos podem-se diferenciar pelo formato e posicionamento do piezoelétrico em relação ao orifício ejetor, o método pelo qual a tinta é ejetada pode ser: por aperto, dobra, empurro ou cisalhamento.

1.8. Impressora Dimatix Fujifilm DMP-2831

A impressora Dimatix Fujifilm (figura 5) é uma impressora a jato de tinta piezoelétrica de elevada resolução, isto é, permite «escrever» motivos separados de poucas dezenas de micrómetros. Para tal, são utilizados cartuchos de jato de tinta piezoelétricos, preenchíveis pelos usuários, o que possibilita a modificação da tinta pelos mesmos.

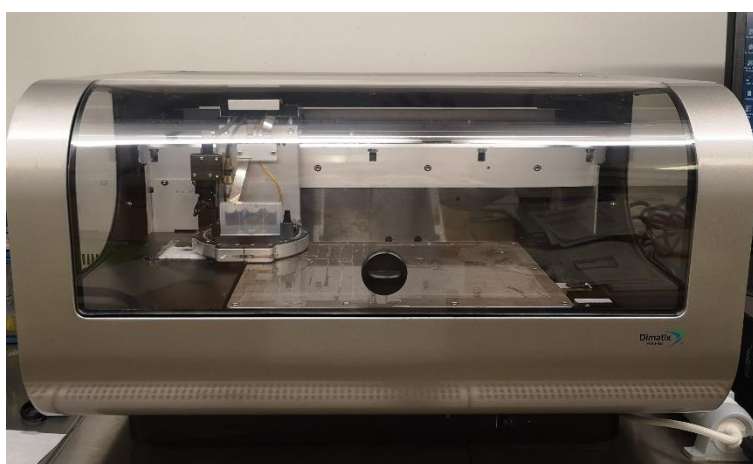


Figura 5 – Impressora Dimatix Fujifilm DMP-2831.

É importante entender o funcionamento da impressora para posteriormente realizar o ajuste dos vários parâmetros que afetam a qualidade da impressão. Estes parâmetros, dos quais os principais são detalhados de seguida, são numerosos e por vezes de difícil controlo.


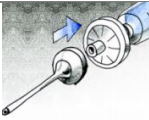


1.8.1. Preparação do Cartucho

Existem dois modelos diferentes de cartuchos, que se diferenciam pelo volume de gota, que podem ser utilizados na impressora Dimatix: o de 1 pL e o de 10 pL. A principal diferença entre os modelos é que o de 1 pL tem um orifício para saída de gotas de 9 μm , enquanto o cartucho de 10 pL em um orifício de 21 μm [13].

Ambos os modelos possuem 16 canais aos quais podem ser aplicadas, individualmente amplitudes variadas de tensão entre 0 e 40V, cavidade para formação de gotas de 254 μm , compartimento para tinta até 1,5 mL e uma secção envolvente da tinta nos canais que pode ser aquecida até 70°C [13].

Para evitar entupimentos durante a ejeção, a tinta deve ser previamente filtrada e os cartuchos devem ser preparados como ilustrado no esquema da tabela 2.

Tabela 2 – Método correto de preparação do cartucho [13].

Ilustração	Descrição
	<p>Encher a seringa com a tinta de impressão.</p>
	<p>Colocar o filtro na seringa para filtrar eventuais aglomerados presentes na tinta.</p>
	<p>Colocar a agulha apropriada para o cartucho no filtro.</p>
	<p>Inserir a agulha no cartucho, tendo cuidado para não danificar o interior do mesmo, e encher o cartucho.</p>
	<p>Retirar a seringa com cuidado.</p>
	<p>Colocar a «cabeça» contendo os <i>nozzles</i> e pressionar até ouvir o som do encaixe correto (“click”).</p>

1.8.2. Substrato

O substrato deve conter uma superfície plana, isto é, sem relevo assinalável de modo a que a distância entre a sua superfície e o orifício das gotas possa ser regulada e mantida constante durante a impressão. Deve também ser mecanicamente «robusto», pois o substrato é seguro ao prato por sucção, através de pequenos orifícios, e não deverá sofrer deformações. Para a escolha do substrato é necessário ter em consideração as características da impressão desejadas e a partir daí, realizar testes para verificar a adaptação do substrato à deposição da tinta.

1.8.3. Parâmetros de impressão

Os parâmetros a controlar durante a impressão podem ser divididos nos que controlam a tinta, o substrato e os que controlam o desenho/padrão a ser impresso. Em relação aos que

controlam a tinta, é necessário ajustar a tensão que aplicada ao piezoelétrico para formação das gotas. Alguns dos parâmetros que podem ser modificados encontram-se a seguir:

Select Waveform: define qual será a forma de onda a ser utilizada com esse cartucho.

Jetting Voltage: tensão que será aplicada nos orifícios de impressão. É possível ajustar essa tensão individualmente para cada um dos 16 orifícios. A variação da tensão influencia a velocidade de queda das gotas.

Cartridge Temperature: varia a temperatura da tinta no cartucho. O aumento da temperatura resulta numa diminuição da viscosidade da tinta, permitindo o ajuste do desempenho desejado para a impressão (espalhamento da gota e tempo de secagem).

Jets to Use: Permite selecionar o número de orifícios para impressão que se deseja utilizar. Na impressora utilizada, os *nozzles*/orifícios têm de ser adjacentes.

Cleaning Cycles tab: controla a limpeza dos orifícios antes, durante ou depois da impressão através de purgas, assim como a limpeza quando a impressora está ligada e com cartucho instalado, porém sem imprimir. A limpeza constante pode ser necessária para alguns fluídos para manter os *nozzles* sem entupimentos e a funcionar corretamente. Durante a impressão é possível indicar o intervalo entre limpezas.

Há três diferentes tipos de limpeza que podem ser realizados: *spit*, *purge* e *blot*. *Spit* ativa os *nozzles* a uma certa frequência por um intervalo de tempo definido. *Purge* faz com que o cartucho empurre tinta pelos orifícios apenas por pressão e normalmente é utilizado para retirar o ar do cartucho. *Blot* simplesmente faz o cartucho encostar na *pad* de limpeza por um tempo designado.

A temperatura do substrato pode também ser variada, desde a temperatura ambiente (sem aquecimento) até 60°C.

1.8.4. Criação de padrões

A impressora possui dois métodos diferentes para criação de padrões a serem impressos. Estes podem ser criados diretamente no software da própria impressora, ou podem ser importados de imagens no formato *bitmap*.

No caso da importação de imagens no formato *bitmap*, os padrões são criados em editores de imagens simples e antes da importação deverá ser ajustado o *drop spacing* – parâmetro que permite adaptar as dimensões do padrão original às dimensões impressas desejadas.

No caso de se criar o padrão diretamente no software da impressora, o princípio básico deste método consiste em criar um padrão formado por retângulos informando a posição no sistema de coordenadas, assim como a largura e altura.

1.8.5. Drop Watcher

O *Drop Watcher* é uma funcionalidade presente na impressora que permite observar e gravar vídeos das gotas enquanto são ejetadas dos orifícios dos cartuchos. Isto permite analisar com maior precisão as gotas formadas e a direccionalidade da sua ejeção. Com o *Drop Watcher* pode-se, entre outras coisas, relacionar eventuais defeitos na impressão com um formato distorcido, tamanho desproporcionado das gotas, ou ainda com a sua ejeção não vertical ou com velocidade não ideal (demasiado rápida ou lenta).

1.8.6. Fiducial Camera

Esta câmara fica posicionada no braço que contém e comanda o cartucho e permite observar, com grande proximidade, a área do prato de impressão. É possível então observar o resultado da impressão com detalhe e a homogeneidade da camada impressa. Além disso, é com o auxílio desta câmara que se definem as coordenadas do ponto de origem para impressão, o que permite o posicionamento desejado do padrão impresso em relação ao substrato.

1.9. Objetivos e visão geral da investigação

O objetivo último deste trabalho consistiu em desenvolver um penso para aplicação em queimaduras com funcionalidade de barreira microbiana e eletricamente ativo, para impedir a entrada de microrganismos e outros agentes patogénicos e, em simultâneo, favorecer a regeneração celular e/ou inibir a infeção através da aplicação de campos elétricos. Para tal, foram desenhados vários circuitos elétricos e em vários tipos de substratos diferentes – biocelulose, papel para impressão e papel de filtro - utilizando duas tintas condutoras diferentes (à base do polímero condutor PEDOT:PSS e de prata), de modo a selecionar, de entre as combinações desenvolvidas, as mais favoráveis para testes de simulação de infeções, com culturas de micro-organismos.

1.10. Estrutura da tese

Esta tese está dividida em três capítulos principais. No capítulo 1 são apresentados, de forma sucinta, os conceitos básicos no âmbito do tópico das queimaduras de pele e os desenvolvimentos biomédicos conhecidos para o seu tratamento e complicações. Neste capítulo é ainda apresentada a técnica utilizada neste trabalho para o desenvolvimento de pensos - impressora de jato de tinta - e particularizado o seu funcionamento e modo de operação.

No capítulo 2 descrevem-se os métodos e materiais utilizados para produzir os pensos eletricamente ativos, os métodos de medição de corrente elétrica e os materiais e métodos utilizados para preparar os meios de microrganismos (*Luria Bertani*) para testar a eficiência dos pensos na presença dos mesmos (mimetizando o ambiente de infeção).

O capítulo 3 apresenta as características dos pensos impressos com duas tintas condutoras diferentes, PEDOT:PSS e tinta de prata, quer ao nível de características de impressão quer de propriedades elétricas, isto é; sua resistência elétrica. Os resultados obtidos após a incubação dos circuitos no meio com microrganismos são apresentados e discutidos também neste capítulo.

No capítulo 4 sumarizam-se as principais conclusões retiradas do trabalho e são comentadas as perspetivas futuras possíveis para prosseguir com a investigação. Por fim, inclui-se um anexo que contém todos os circuitos impressos, bem como as suas características de impressão e comentários às observações realizadas microscopicamente.

Capítulo 2
Parte Experimental

2. Parte Experimental

2.1. Fabrico de pensos electroativos por impressão de jato de tinta. Ensaio de impressão com PEDOT:PSS

De modo a criar um circuito de dimensões bem definidas e com elevada resolução, utilizou-se uma impressora de jato de tinta Dimatix Fujifilm 2831.

Inicialmente procedeu-se à impressão de um circuito simples, que se apresenta na figura 6, criado apenas para averiguar quais os melhores parâmetros para obter a impressão com as características desejadas. Esta otimização de impressão baseou-se em determinar o tempo de impressão de cada camada, a dependência da qualidade da impressão do número de *nozzles* em funcionamento, bem como em determinar o número de camadas necessárias para uma boa impressão, isto é, uma cobertura homogénea e compacta das zonas impressas. Com esta otimização foi possível também determinar as temperaturas ótimas a aplicar ao substrato/prato da impressora e à tinta e verificar a qualidade da impressão em diferentes tipos de substrato (papéis diferentes).

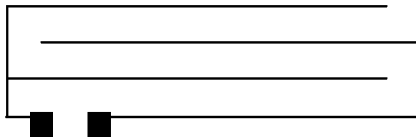


Figura 6 – Primeiro circuito testado para otimização de impressão.

A tinta primeiramente utilizada constou de uma dispersão aquosa do polímero condutor poli(3,4-etilenodioxo-tiofeno)-poli(estireno-sulfonato), conhecido como PEDOT:PSS. Este foi adquirido à Orgacon (PEDOT:PSS Inkjet Ink, Lote:5587424/17). A estrutura química do PEDOT:PSS apresenta-se na figura 7.

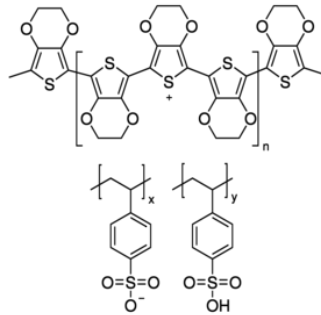


Figura 7 – Estrutura química do PEDOT:PSS [14].

A tinta, de cor escura e azulada, devido a ser uma dispersão com tendência para a formação de agregados, foi filtrada com filtros de acetato de celulose (AC) de 0.20 μ m de diâmetro de poro, anteriormente a cada utilização, de forma a evitar o entupimento dos *nozzles* durante a impressão.

Esta tinta foi escolhida para otimizar as impressões, devido ao seu menor preço, em relação à outra tinta disponível - tinta de prata. Esta foi testada posteriormente.

Idealmente, todos os testes seriam feitos com biocelulose, como substrato, uma vez que esta é uma celulose de elevada pureza, na sua composição química, e por isso potencialmente mais compatível com a pele. Contudo, a biocelulose é difícil de obter (não é comercial) e a quantidade disponível para este trabalho foi muito limitada.

Desta forma, foram utilizados maioritariamente os seguintes substratos:

- Papel de impressão, Navigator;
- Papel de filtro, PALL Nylflon, Nylon Membrane Filter 0.45 μ m.

Foi ainda realizado um teste com biocelulose e outro com papel fotográfico Epson. A razão pela qual não foram realizados mais testes com papel fotográfico prendeu-se com o facto de a sua composição não ser específica, uma vez que contém uma camada de produtos químicos responsáveis por absorver a tinta. Este não seria o mais indicado para aplicações em queimaduras, pois poderia reagir com a pele do paciente.

A figura 8 mostra os circuitos impressos nos diferentes substratos primeiramente testados, observados com um microscópio ótico. Os circuitos B#01 e B#02 foram impressos com cinco camadas e o circuito B#05 com dez camadas. No circuito é evidenciado com uma circunferência a azul, o local visualizado com o microscópio ótico.

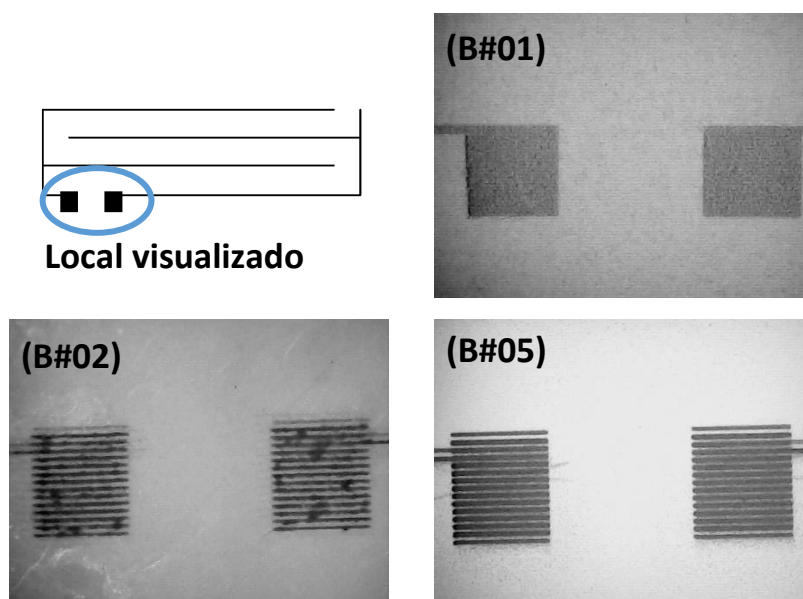


Figura 8 - Fotografias dos primeiros circuitos impressos em diferentes tipos de substrato. (B#01) Papel Navigator, (B#02) biocelulose, (B#05) Papel de filtro, visualizados com um microscópio ótico.

A figura 9 mostra a visualização a microscópio ótico dos circuitos impressos em papel fotográfico, com dez camadas.

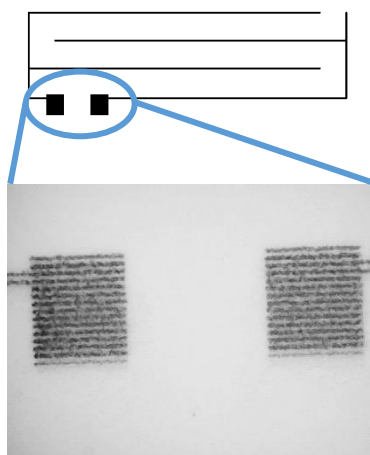


Figura 9 - Fotografia da visualização com microscópio ótico do circuito impresso em papel fotográfico (B#07).

É de evidenciar que em todas as impressões realizadas, independentemente do substrato, a tinta PEDOT:PSS foi mantida a 36°C e o substrato a 40°C para favorecer a secagem da impressão entre camadas e evitar o alargamento das «riscas» escritas. Após cada impressão, os circuitos foram sempre deixados durante a noite sob vácuo dinâmico, a 60°C, durante cerca de 12 horas, para secagem.

2.2. Medição da resistência elétrica dos circuitos impressos

A resistência elétrica dos circuitos elétricos foi medida implementando diversos métodos. O método testado nos primeiros circuitos impressos, escolhido pela sua maior simplicidade, foi o método de dois pontos ou dois terminais. A figura 10 mostra a montagem utilizada no método de dois pontos. Foi também utilizado um multímetro (Keithley, 2400 SourceMeter).

Neste método, foram soldados a fios de cobre de 1 mm de diâmetro, fios também de cobre mas com apenas 40 μm de diâmetro. Os fios contactavam com o circuito a medir através da colagem do fio ao circuito com tinta/cola de prata coloidal.

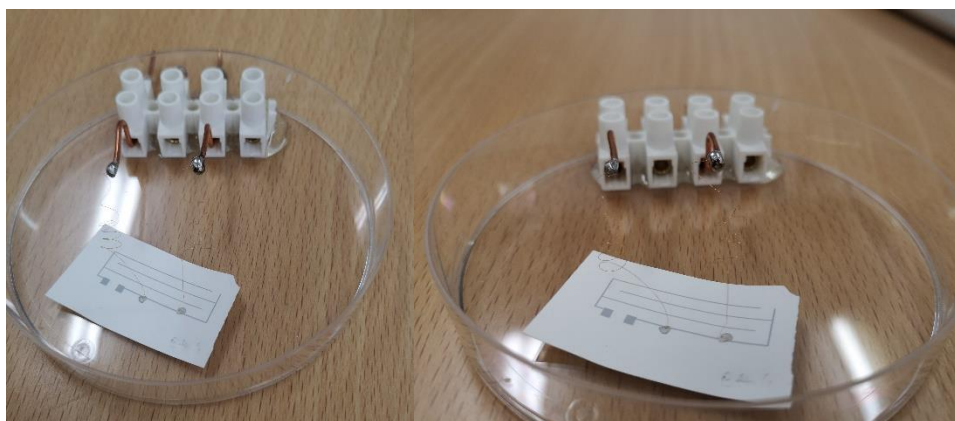


Figura 10 - Primeiro método de medição de corrente com dois pontos.

Contudo, este método de medição não se mostrou eficaz, devido à dificuldade encontrada em conectar pontos do circuito impresso aos contactos de medida. Verificou-se que a cola de prata destruía os circuitos, impossibilitando a repetição das medidas nos circuitos e impossibilitando também que os circuitos fossem utilizados para outros fins. Ainda assim, verificou-se que havia passagem de corrente em todos os circuitos impressos, mesmo que pouco condutores em alguns casos, o que possibilitou avançar para a impressão de novos circuitos.

2.3. Impressão de circuitos para ensaios de precisão

A compreensão dos diferentes parâmetros que influenciam as características de impressão dos circuitos foi importante não apenas para otimizar as impressões (em termos de cobertura de tinta e definição), como também para identificar as condições que permitem obter circuitos suficientemente condutores. Assim, foram realizados testes de precisão para vários substratos, em que para cada substrato, foi variado número de *nozzles* e de camadas

impressas, para cada substrato, de acordo com a tabela 3. Foram realizadas sete impressões diferentes em que os substratos foram papel de filtro e papel de impressão. Estes circuitos foram impressos com tinta PEDOT:PSS mantida a 36°C e os substratos a 40°C durante a impressão. Após cada impressão, foram deixados a secar a vácuo a 60°C. Posteriormente todos os circuitos foram observados e fotografados ao microscópio ótico.

Tabela 3 – Parâmetros testados na impressão de circuitos com tinta PEDOT:PSS.

Circuito	Substrato	Nozzles	Nº de camadas
B#08	Papel de filtro	2	20
B#09	Papel de filtro	2	30
B#10	Papel de impressão	3	10
B#11	Papel de impressão	5	10
B#12	Papel de impressão	5	20
B#13	Papel de impressão	6	30
B#14	Papel de impressão	1	40

2.4. Medição de corrente elétrica nos circuitos impressos para estudos de precisão

Uma vez que o método de dois terminais se mostrou inadequado pelas dificuldades já descritas, optou-se pelo método de quatro pontos ou quatro terminais, segundo o qual dois terminais são utilizados para medir a corrente e os outros dois para aplicar uma diferença de potencial ou vice-versa. A resistência do material é dada pela lei de ohm [15].

$$R = \frac{V}{I} \quad (1)$$

Onde,

R – Resistência elétrica, em Ohm (Ω)

V – Diferença de potencial elétrico, em Volt (V)

I – Intensidade da corrente elétrica, em Ampere (A)

Para determinar a resistência de determinado material, impõe-se a corrente (I) e mede-se a diferença de potencial (V). A figura 11 mostra o esquema da medida de resistência pelo método de quatro pontos.

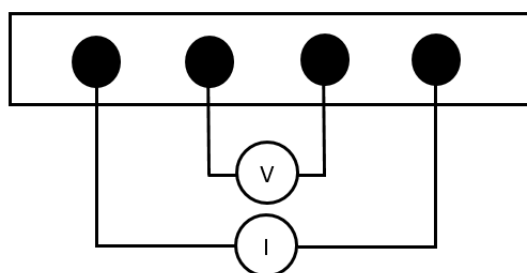


Figura 11 – Esquema de medida de resistência de um material pelo método de quatro pontos.

Neste método, utilizaram-se cabos finos (em forma de agulhas) para três dos terminais e o quarto foi acedido com um contacto crocodilo, devido à limitação do sistema disponível. A figura 12 mostra o sistema utilizado e os multímetros (Agilent, 34401A) e (Keithley, 2400 SourceMeter) onde é possível observar apenas os três cabos finos.

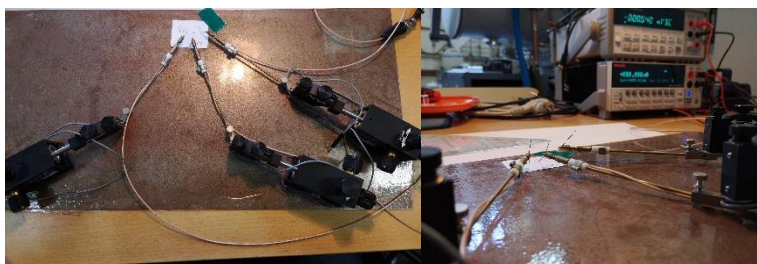


Figura 12 - Segundo método de medição de corrente com quatro pontos.

Este método de medição também se apresentou dificultoso, pois as agulhas utilizadas, por serem muito finas, facilmente danificam a impressão quando são colocadas em contacto com o circuito.

Ainda assim, nos circuitos impressos em papel de impressão, B#10, B#11, B#12, B#13 e B#14 foi possível fazer medições. Apenas não foi possível no caso do papel de filtro, por este ser mecanicamente mais frágil.

No entanto, desenvolveu-se outros dispositivos em que não era necessário colocar cola de prata para não danificar o circuito.

Começou por se desenvolver um pequeno suporte com dois contactos de cobre separados por 9,0 mm. Estes contactos estão acoplados a uma mola e parafuso de contacto como se mostra na figura 13. O circuito foi colocado debaixo dos contactos; ao rodar os parafusos estabeleceu-se o contacto com o circuito por pressão das molas e realizava-se a medida.

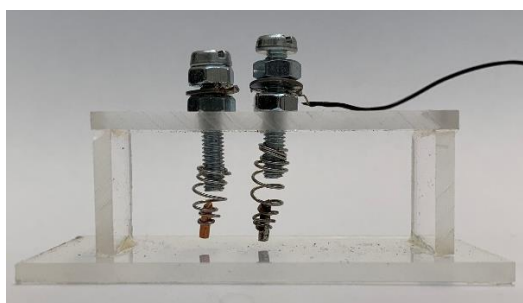


Figura 13 – Método de medição de corrente com dois pontos.

No entanto, este processo também demonstrou danificar os circuitos devido à rotação dos contactos, impossibilitando a utilização dos mesmos para outros fins.

Num outro dispositivo, agora de quatro pontos, desacoplaram-se os pinos de contactos em cobre das molas para que estes não rodem sobre a pista do circuito. O dispositivo é mostrado na figura 14.



Figura 14 - Método de medição de corrente com quatro pontos utilizado.

Neste dispositivo, a separação dos contactos centrais é de 9,58 mm e de 22,03 mm entre os contactos externos. Verificou-se contudo, que embora a mola empurre o pino de contacto apenas por pressão, e sem acoplamento físico, os pinos também giram e acabam por danificar o circuito. Ainda assim, este dispositivo poderá revelar-se promissor impedindo os pinos de rodar através de um perfil não cilíndrico dos mesmos.

Por fim, desenvolveu-se um instrumento em que os quatro pontos não danificam o circuito e também não é necessário colocar cola de prata.

Este instrumento consistiu em quatro contactos colados a uma placa de plástico; aos contactos foram soldados fios que ligam à fonte de alimentação e ao multímetro, como se mostra na figura 15.

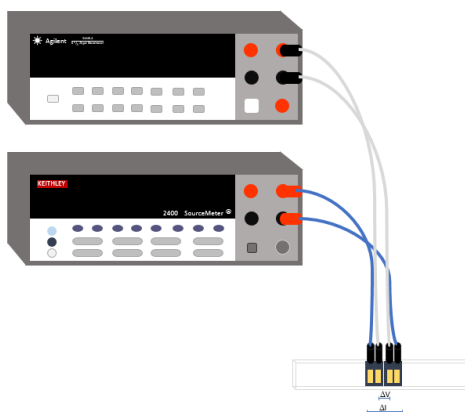


Figura 15 - Método de medição de corrente com quatro pontos utilizado.

Este foi o melhor método desenvolvido para as medições elétricas nos circuitos impressos em papel de filtro sem danificar o mesmo. Neste caso, os circuitos foram colocados em cima de uma placa de acrílico, com a outra placa que contem os quatro contatos por cima de uma das linhas do circuito, o que possibilitou fazer as leituras sem exercer muita pressão no circuito e sem o danificar.

Na figura 16 mostra-se o dispositivo em pormenor. A distância entre os contactos centrais é de 4,86 mm e entre os contactos exteriores é de 10,08 mm.



Figura 16 – Dispositivo em pormenor utilizado na medição com quatro pontos.

O suporte com os contactos foi colocado sobre a pista do circuito a medir, também sobre um suporte de acrílico. Os dois suportes foram mantidos com auxílio de molas.

2.5. Otimização do desenho do circuito. Impressão com tinta de prata.

Para testar os circuitos com estes colocados em placas de petri foi necessário otimizar o desenho. As placas de petri foram também escolhidas tendo em conta o tamanho do papel de filtro utilizado.

Desenhou-se então um circuito para o papel de filtro, em que os contactos se encontram no interior da placa, e um circuito para o papel de impressão, em que os contactos se encontram no exterior da placa de petri uma vez que no papel de impressão não existe a condicionante do tamanho do papel (este pode ser cortado em variadas dimensões). A figura 17 apresenta o desenho inicial para papel de impressão.

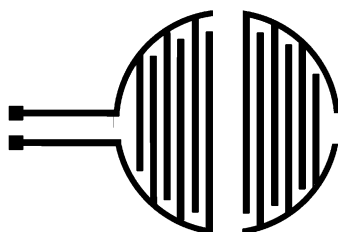


Figura 17 - Desenho inicial do circuito para impressão em papel de impressão.

O desenho inicial apresentado na figura 17 foi alterado pois após uma impressão teste com PEDOT:PSS (B#15) verificou-se que as linhas interiores ficavam muito preenchidas em relação à linha mais exterior do circuito. Como consequência, a tensão imposta nos contactos poderia não ser uniformemente distribuída pelas linhas no interior do circuito.

Na figura 18 estão representados os desenhos finais para os diferentes substratos. Estes desenhos compõem-se de duas partes: uma parte (à esquerda) que contém contactos (para atuarem como terminais); e a parte passiva (à direita), em que não será feita passar corrente.

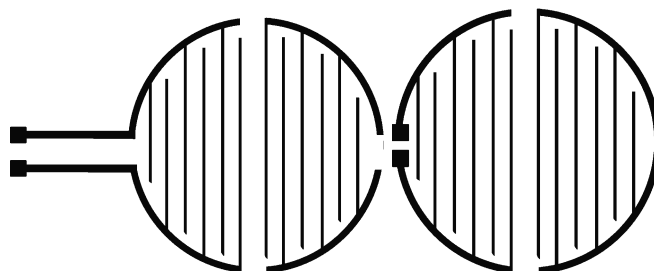


Figura 18 - Desenhos do circuito para impressão em papel de impressão (esquerda) e em papel de filtro (direita).

Antes de iniciar as impressões com tinta de prata, foram também impressos circuitos com PEDOT:PSS para testar o comportamento desta tinta quando imposta uma corrente elétrica e em contacto com os microrganismos.

Estes dois circuitos foram impressos apenas com a parte dos contactos, ou seja, foi impressa apenas a metade ativa. Ao lado direito, que não apresenta contactos (lado passivo), não foi aplicada corrente.

A tabela 4 apresenta as impressões realizadas com a tinta PEDOT:PSS, nos diferentes substratos e com diferentes parâmetros de deposição.

Tabela 4 - Diferentes circuitos impressos nos diferentes substratos com tinta de PEDOT:PSS.

Tipo de circuito	Circuito	Substrato	Nozzles	Nº de camadas
Circuito completo	B#16	Papel de impressão	3	10
Circuito completo	B#17	Papel de filtro	3	20
Circuito completo	B#18	Papel de filtro	3	30
Circuito ativo	B#19	Papel de filtro	3	30
Circuito ativo	B#20	Papel de filtro	3	20

Após a impressão dos circuitos, estes foram secos sob vácuo dinâmico durante a noite a 60°C. No dia seguinte, foi medida a corrente elétrica em alguns deles, para avaliar a eficácia da impressão. Uma vez que se verificou que todos eram condutores avançou-se para as impressões com tinta de prata (Novacentrix Metalon JS-B25HV Silver Inkjet Ink, Lote:050913-25-001). Esta tinta também foi previamente filtrada (com filtro de 0.45µm, de polietileno-tereftalato,TF). Nestas impressões, o substrato foi mantido a 40°C e a tinta de prata a 36°C.

A tabela 5 apresenta as impressões realizadas nos diferentes substratos com tinta de prata e com parâmetros de impressão diferentes.

Tabela 5 - Diferentes circuitos impressos com tinta de prata nos diferentes substratos.

Tipo de circuito	Circuito	Substrato	Nozzles	Nº de camadas
Circuito ativo	P#01	Papel de impressão	4	5
Circuito ativo	P#02	Papel de impressão	4	10
Circuito completo	P#03	Papel de impressão	4	5
Circuito completo	P#04	Papel de impressão	4	10
Circuito ativo	P#05A	Papel de filtro	4	20
Circuito ativo	P#05B	Papel de filtro	4	20
Circuito ativo	P#06	Papel de filtro	4	10
Circuito completo	P#07	Papel de filtro	4	10
Circuito completo	P#08	Papel de impressão	4	1
Circuito completo	P#09	Papel de impressão	4	1
Circuito completo	P#10	Papel de impressão	4	10
Circuito completo	P#11	Papel de impressão	4	10

Estes circuitos foram secos sob vácuo dinâmico, a 60°C, durante cerca de 12 horas, após impressão.

O desenho dos circuitos P#03 e P#04, foi o desenhado para papel de filtro, apesar de impressos em papel de impressão, de modo a ficar com uma referência para a impressão sem gasto desnecessário de papel de filtro.

Os circuitos P#08 e P#09 foram impressos apenas com uma camada, para avaliar qual o comportamento da tinta de prata em uma só camada. A razão pela qual os circuitos impressos com tinta de prata foram impressos com um menor número de camadas que os impressos com tinta de PEDOT:PSS, é o facto da tinta de prata apresentar maior «cobertura» de impressão.

Tal como para os casos anteriores, foi medida a corrente em alguns circuitos para avaliar a quantidade de corrente que poderia ser imposta aquando nos estudos posteriores.

2.6. Visualização dos circuitos com perfilómetro

Os circuitos impressos foram também analisados com um perfilómetro (Veeco, DEKTAK 6M, Stylus profiler). Verificou-se que os substratos utilizados são bastante rugosos e que esta rugosidade permite que a tinta seja absorvida sem que fique qualquer relevo adicional nos locais impressos. Não se conseguiu por isso definir os perfis definidos pelas camadas

impressas. Assim, apenas se avaliou o perfil do circuito B#14, que foi impresso em papel de impressão com 40 camadas de PEDOT:PSS. Esta avaliação indicaria a quantidade de tinta depositada no substrato se este não fosse tão rugoso e se a tinta não fosse completamente absorvida pelo substrato, impedindo a formação de um perfil que possa ser evidenciado no perfilômetro.

2.7. Inoculação dos meios com microrganismos presentes em água residual tratada. Ensaio da inoculação dos circuitos nos meios com imposição de corrente

2.7.1. Preparação do meio *Luria Bertani* para inoculação.

Reagentes: Triptona (Biolife, Ref.4018912, HD2601)

Extrato de Levedura (Himedia, Ref.RM027, 0000130805)

Cloreto de Sódio (Panreac, Ref.131659.1211, 0000377057)

AGAR (Oxoid, 22544679)

Ácido Clorídrico

Hidróxido de Sódio

Equipamento: Balança Analítica (Kern ALS120-4, Max:120g)

Medidor de pH (pH526, WTW)

Autoclave

Estufa de Inoculação (Mettler, Model 1600, D06062)

Para 300 mL de meio Luria Bertani, juntou-se 3 g de triptona, 1,5 g de extrato de levedura, 3 g de Cloreto de sódio e 2% (m/v) AGAR. Depois de tudo misturado, ajustou-se o pH a 7,2 com soluções aquosas de ácido clorídrico e de hidróxido de sódio.

Todo o material utilizado foi previamente esterilizado em autoclave a 120°C durante 15 minutos.

Depois de todo o material esterilizado e do meio pronto, plaqueou-se, ou seja, verteu-se o meio para as placas de petri, a quente, até cobrir aproximadamente 2/3 do volume de cada placa. Aguardou-se para que o meio solidificasse e colocou-se a tampa da placa de petri selando de seguida com parafilme para prevenir contaminações.

Os meios foram sempre conservados em câmara escura enquanto não estiveram a ser utilizados e de preferência voltados para baixo, para evitar condensação, que pode surgir durante o seu armazenamento. Em alternativa à camara escura, as placas poderiam ter sido conservadas em frigorífico, a 4°C.

2.7.2. Ensaio com meios inoculados

Para inocular os meios, utilizou-se uma amostra de água residual tratada que na sua composição contém inúmeros microrganismos diferentes e desconhecidos.

Realizaram-se duas diluições da amostra da água – de 1:10 e de 1:50 - para averiguar qual a concentração necessária para inocular os meios com os circuitos (figura 19).

Inicialmente, procedeu-se à inoculação de apenas três meios com as diferentes diluições de amostra, para observar a evolução de cada um após três dias de inoculação.



Figura 19 - Amostra de água residual tratada (ART) e amostras diluídas.

Estas inoculações foram divididas pelas placas em três fases diferentes: na primeira fase colocou-se papel em $\frac{1}{4}$ do meio e inoculou-se ART sobre o papel; na segunda fase inoculou-se $\frac{3}{4}$ da placa com ART; e na terceira fase colocou-se papel de impressão em $\frac{1}{4}$ da inoculação efetuada na segunda fase (figura 20).

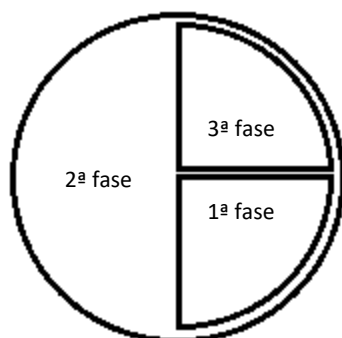


Figura 20 - Representação esquemática da inoculação efetuada por fases.

Estas três fases permitiram avaliar o comportamento da evolução dos microrganismos aquando da presença do papel de impressão e quando inoculados sobre o papel ou apenas sobre o meio com o papel por cima. Os meios foram colocados na estufa de incubação a 37°C.

2.7.3. Inoculação dos meios com os circuitos

Após a observação dos meios deixados a inocular apenas com ART e suas diluições nas três fases da placa de petri, os meios foram inoculados na presença dos circuitos impressos, fazendo a inoculação sobre os mesmos e com a ART.

Foram inoculados sete circuitos, cujas características estão listadas na tabela 6, com imposição de uma diferença de potencial.

Tabela 6 – Características dos circuitos inoculados.

Circuito	Substrato	Tinta/nº camadas	Tipo de circuito
B#16	Papel de impressão	PEDOT:PSS/10	Completo
B#18	Papel de filtro	PEDOT:PSS/30	Completo
B#20	Papel de filtro	PEDOT:PSS/20	Ativo
P#01	Papel de impressão	Prata/5	Ativo
P#06	Papel de filtro	Prata/10	Ativo
P#07	Papel de filtro	Prata/10	Completo
P#11	Papel de filtro	Prata/10	Completo

Para além dos circuitos inoculados, também foi inoculado um meio apenas com ART, como sistema de referência ou «branco». As inoculações foram realizadas com 20 µL em cada

metade do meio e, à semelhança dos meios inicialmente testados, também estes ficaram inoculados durante dois dias completos.

Para impor uma diferença de potencial nos circuitos, foi necessário fazer uma ligação aos contactos dos circuitos com tinta de prata, e ligar todos os cabos entre si para impor uma tensão (V) igual em todos através de multímetros colocados no exterior da estufa de incubação. A figura 21 mostra o esquema de medidas utilizado.

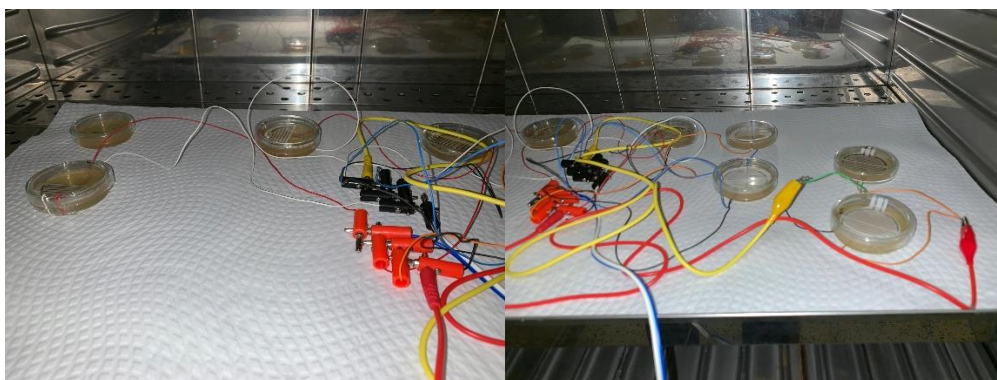


Figura 21 - Ligação entre todos os circuitos na estufa de incubação.

Inicialmente foi imposta uma tensão de 5 V, e o multímetro apresentava uma corrente de 0,022 A. Após 45 minutos (sob 5 V), a corrente medida tinha baixado para 0,001 A e por isso aumentou-se a tensão para 12 V, tendo-se verificado que a corrente de manteve em 0,001 A.

A ligação feita entre os circuitos é mais explícita através da figura 22.

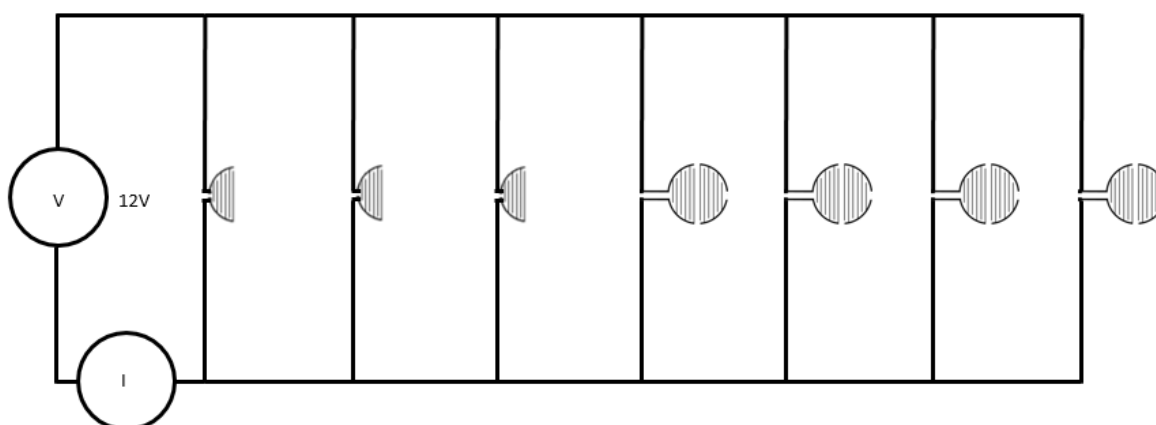


Figura 22 - Ilustração do esquema de imposição de uma diferença de potencial nos circuitos.

Capítulo 3
Resultados e Discussão

3. Resultados e Discussão

3.1. Primeiros circuitos impressos com PEDOT:PSS para otimização da impressão

Os primeiros circuitos impressos com PEDOT:PSS foram observados ao microscópio ótico para avaliar a definição do desenho, grau de preenchimento, etc. e perceber as características da impressão com PEDOT:PSS, nos diferentes substratos com as diferentes variáveis (nº camadas, nº *nozzles*). Estes parâmetros estão listados na tabela 7 e também na tabela 12 do anexo, na qual se incluem características observáveis da qualidade da impressão. As figuras 23-27 reúnem fotografias dos circuitos observados ao microscópio ótico. As observações foram realizadas focando diferentes partes: (a) observação com iluminação rasante; (b) observação topo aos contactos; (c) observação topo aos cantos; (d) observação com ampliação de 80x.

Tabela 7 – Circuitos e respectivas características de impressão.

Circuito	Substrato	Nozzles	Nº de camadas
B#01	Papel de impressão	1	5
B#02	Biocelulose	2	5
B#03	Papel de impressão	4	5
B#04	Papel de filtro	4	5
B#05	Papel de impressão	4	10
B#06	Papel de filtro	4	10
B#07	Papel fotográfico	4	10

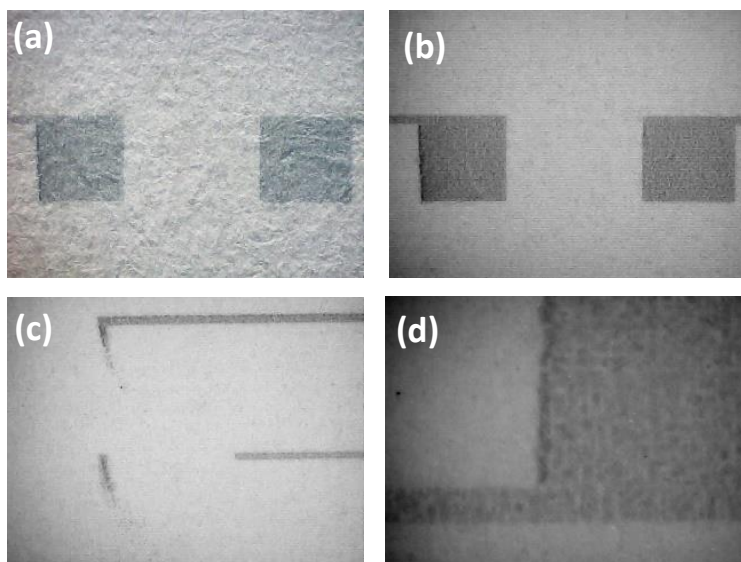


Figura 23 - Fotografias da visualização com microscópio do circuito B#01.

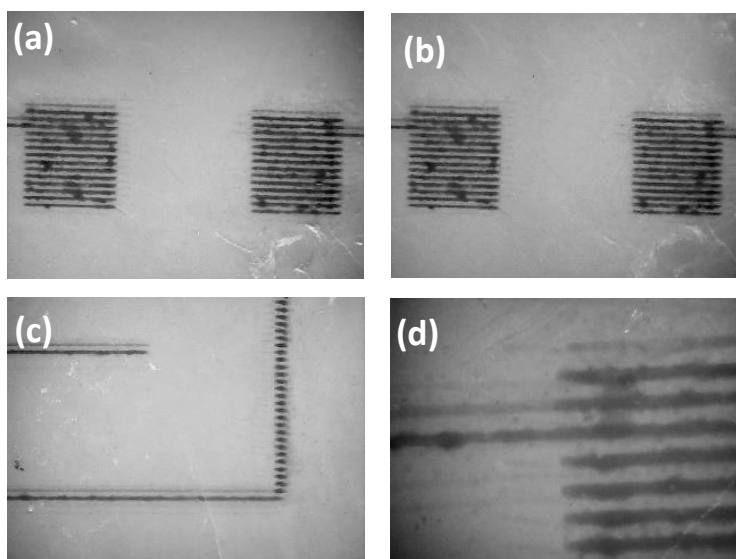


Figura 24 - Fotografias da visualização com microscópio do circuito B#02.

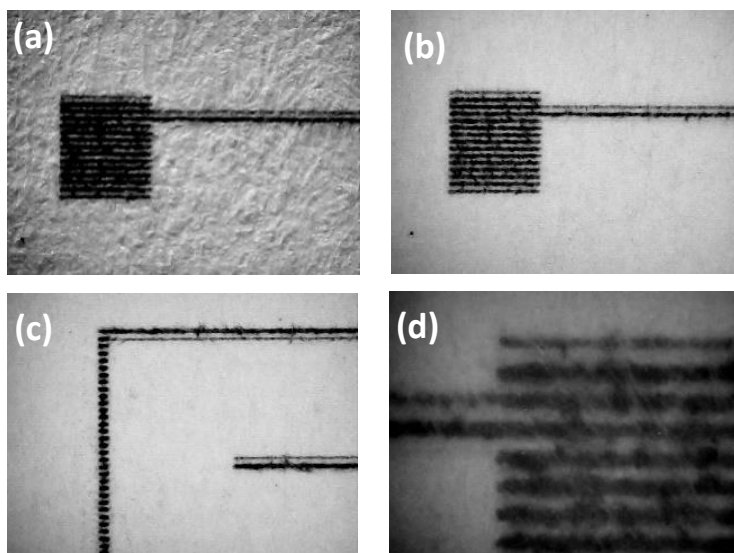


Figura 25 - Fotografias da visualização com microscópio do circuito B#05.

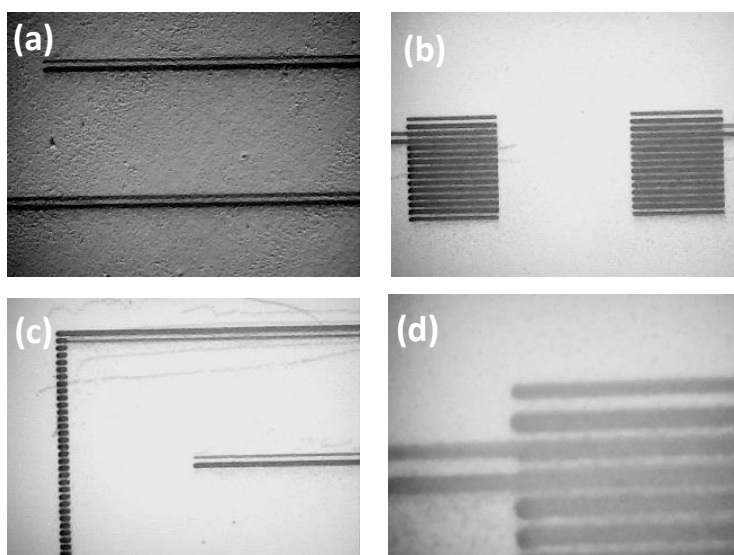


Figura 26 - Fotografias da visualização com microscópio do circuito B#06.

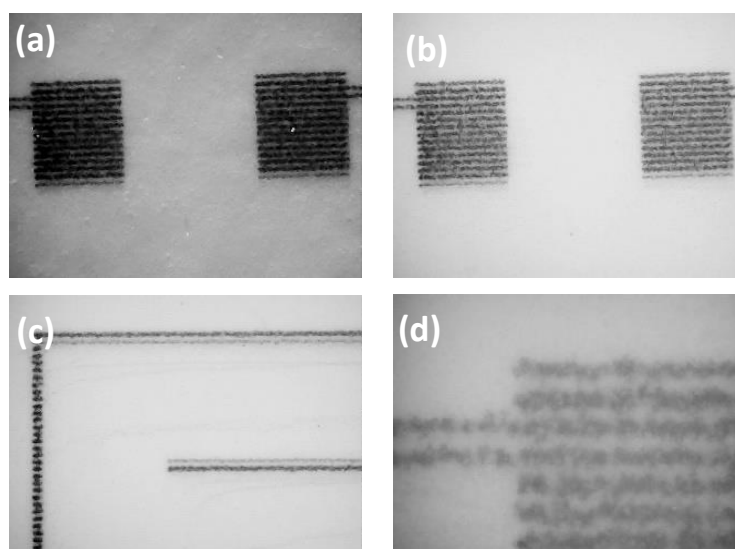


Figura 27 - Fotografias da visualização com microscópio do circuito B#07.

Em todos os circuitos, é possível verificar que a impressão não é contínua, isto é; as linhas impressas não se apresentam completamente preenchidas e é visível alguma absorção da tinta nos substratos que cria pequenos poros, apenas visíveis ao microscópio. A tabela 12 no anexo detalha as observações realizadas para cada um dos circuitos.

Desta observação, conclui-se que é necessário um maior número de camadas de modo a evitar a existência de poros. Quanto ao facto da impressão não ser contínua, isto pode dever-se ao facto de eventualmente algum dos *nozzles* falhar, por entupimento, aquando da impressão (mesmo que operacional no início da mesma). Este revelou ser um dos problemas encontrados com a tinta de PEDOT:PSS.

3.2. Circuitos impressos para estudos de precisão.

Estes circuitos foram impressos e de seguida também observados ao microscópio ótico. As características e respetivas observações estão descritas na tabela 8 e também na tabela 12 do anexo. Foi possível verificar que quanto maior o número de camadas impressas, maior a cobertura de tinta.

Tabela 8 – Características de impressão e observações dos circuitos de estudo de precisão.

Circuito	Substrato	Nozzles	Nº de camadas	Observações ao microscópio
B#08	Papel de filtro	2	20	Maior preenchimento que anteriores.
B#09	Papel de filtro	2	30	Linhas completamente preenchidas e visivelmente intensas.
B#10	Papel de impressão	3	10	Ausência de linhas completamente preenchidas, existência de falhas na impressão.
B#11	Papel de impressão	5	10	Poros visíveis a olho nu e linhas incompletamente preenchidas.
B#12	Papel de impressão	5	20	Poros visíveis e linhas incompletamente preenchidas (mas mais preenchidas que em B#11)
B#13	Papel de impressão	6	30	Poros visíveis e linhas incompletamente preenchidas.
B#14	Papel de impressão	1	40	Poros visíveis ao microscópio, mas impressão intensa. Baixa definição nos bordos.

3.3. Determinação da resistência nos circuitos impressos para estudos de precisão.

Nos métodos de medição utilizados, o cálculo da resistência elétrica foi sempre efetuado utilizando a lei de ohm, equação (1).

Sabemos que a resistência medida dependerá do volume de material entre os dois pontos de medição de V.

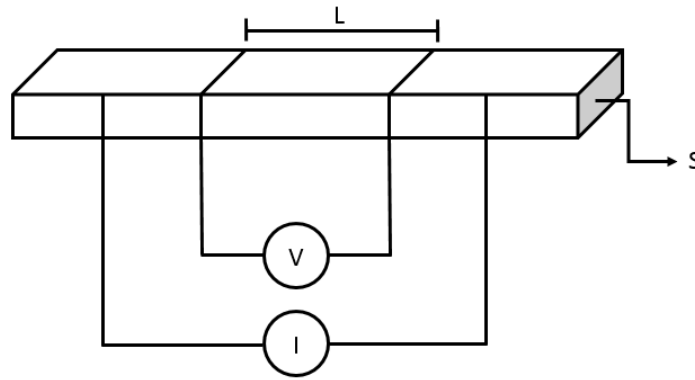


Figura 28 – Ilustração da forma de medição da resistência.

Quanto maior a distância entre contactos (L) maior será a resistência medida, e quanto maior a secção (S) menor a resistência medida.

A resistividade (ρ) de um material é dada pela segunda lei de ohm [15].

$$R = \rho \frac{L}{S} \quad (2)$$

Onde,

R – Resistência elétrica, em Ohm (Ω)

S – Área da secção transversal, em metro quadrado (m^2)

ρ – Resistividade ou resistência específica, em Ohm x metro (Ωm)

L – Comprimento, em metro (m)

Nos ensaios realizados não sabemos a área da secção. Esta depende das camadas da impregnação, do tipo de tinta, etc. Por isso, para comparação de resultados manteve-se o comprimento constante e nas medidas podemos deste modo comparar a grosso modo as várias resistências.

Assim, para todos os circuitos foi aplicada uma determinada intensidade de corrente entre dois pontos do circuito e lida a diferença de potencial gerada também entre dois pontos. Estas medições permitiram uma melhor compreensão do comportamento elétrico dos circuitos impressos, resultando nas representações gráficas apresentadas nas figuras 29-38.

Para o circuito B#08, foram efetuadas medidas nas quatro linhas do circuito, para maior exatidão dos resultados. Nas figuras representadas nos gráficos, a linha vermelha corresponde à linha onde foram efetuadas as medidas. A resistência elétrica foi obtida a partir da equação linear ajustada aos dados por regressão linear, correspondendo ao declive da reta. Em cada gráfico, representa-se a reta de ajuste e respetiva equação.

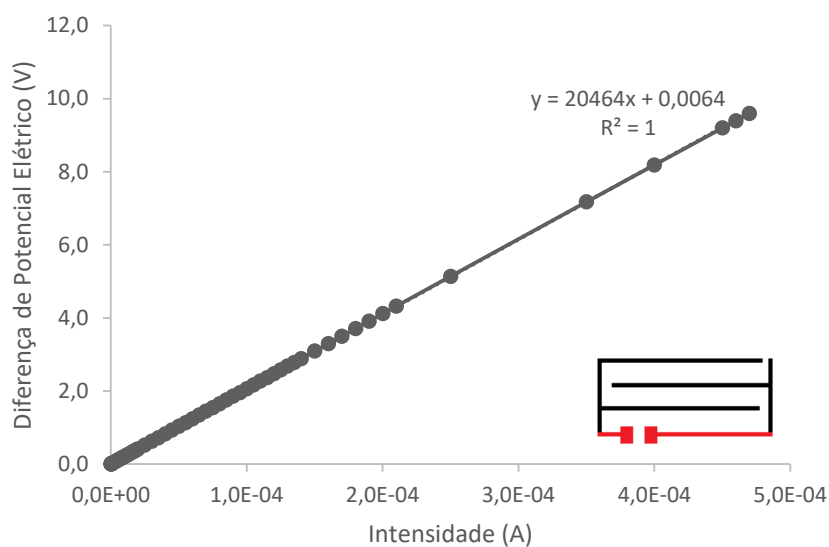


Figura 29 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear para o circuito B#08_a.

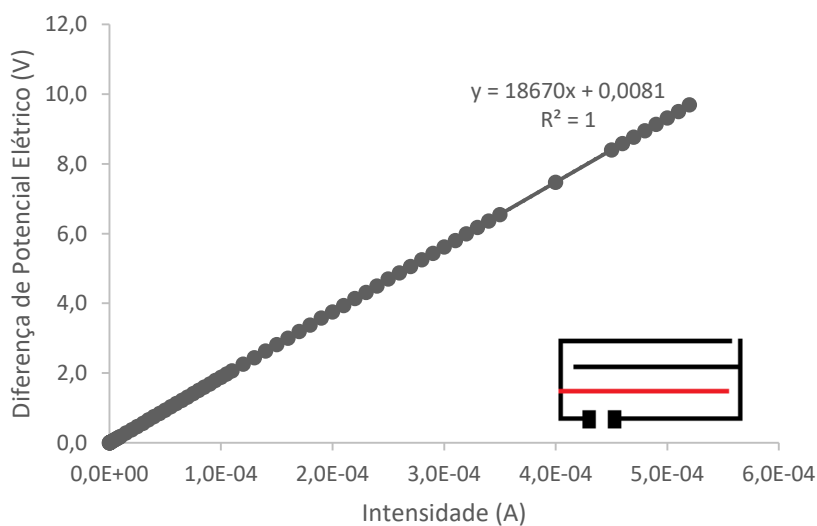


Figura 30 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear para o circuito B#08_b.

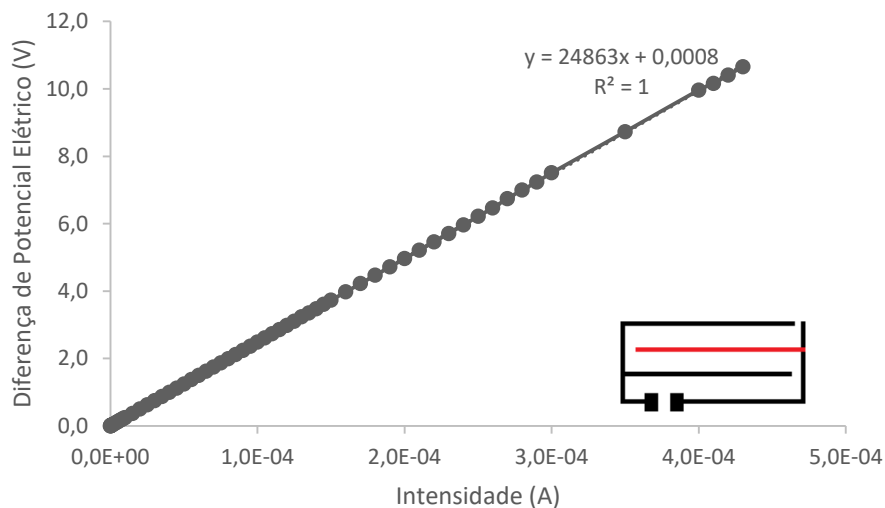


Figura 31 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear para o circuito B#08_c.

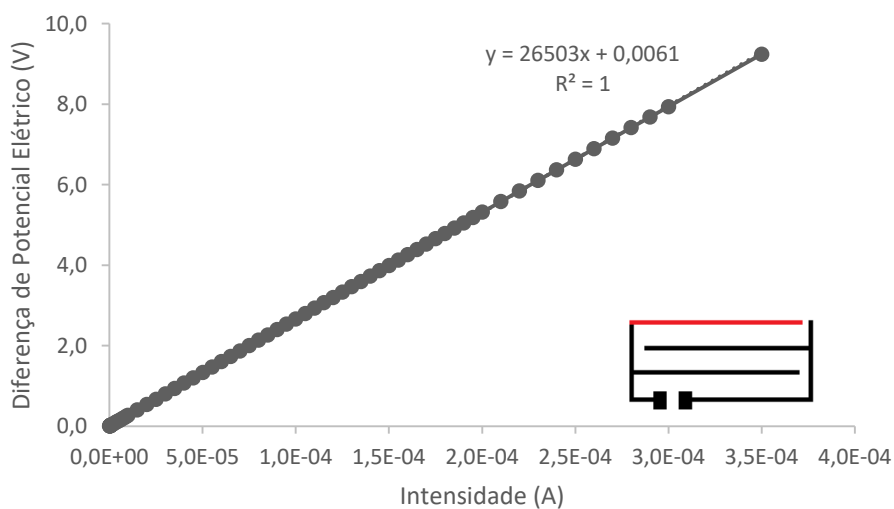


Figura 32 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear para o circuito B#08_d.

Avaliando as retas obtidas para o circuito B#08, conclui-se que em todo o circuito a resistência é da mesma ordem de grandeza e varia entre 18 670 Ω e 26 503 Ω .

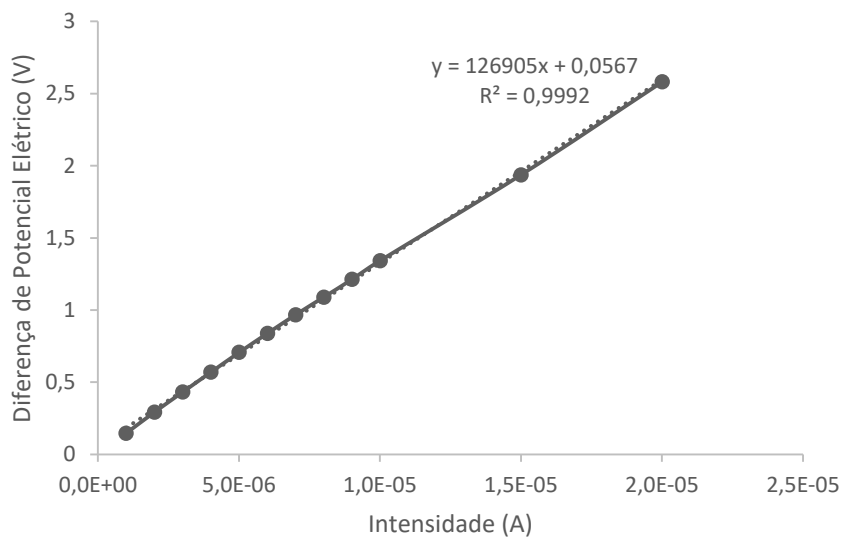


Figura 33 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear para o circuito B#09.

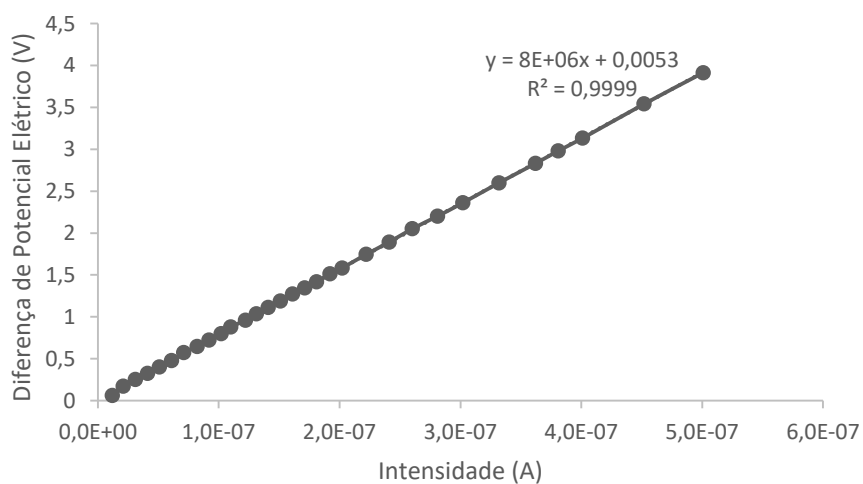


Figura 34 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear para o circuito B#10.

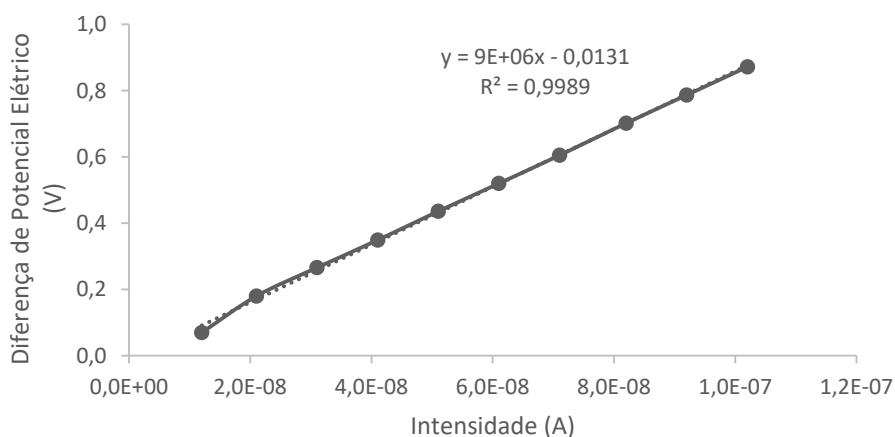


Figura 35 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear para o circuito B#11.

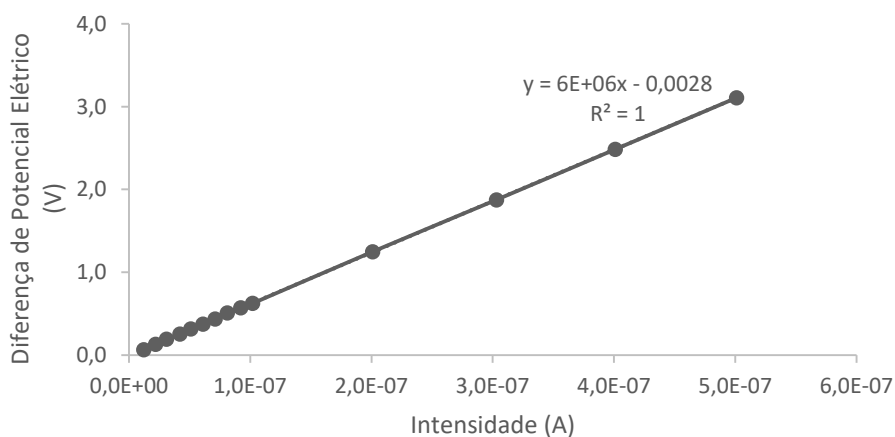


Figura 36 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear para o circuito B#12.

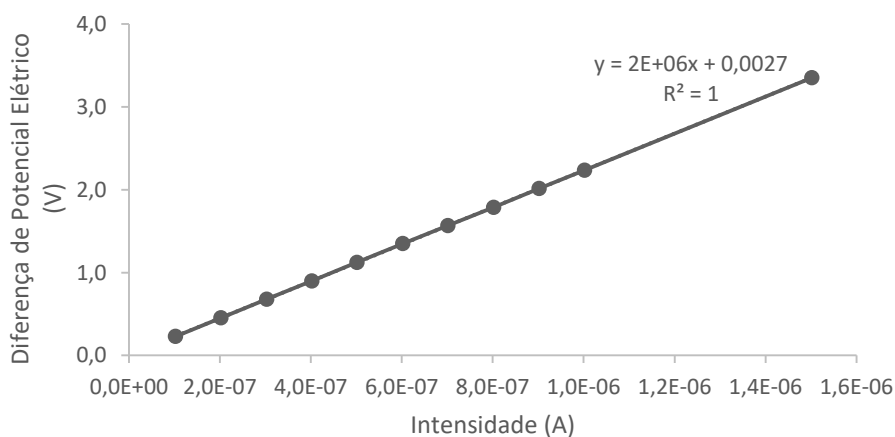


Figura 37 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear para o circuito B#13.

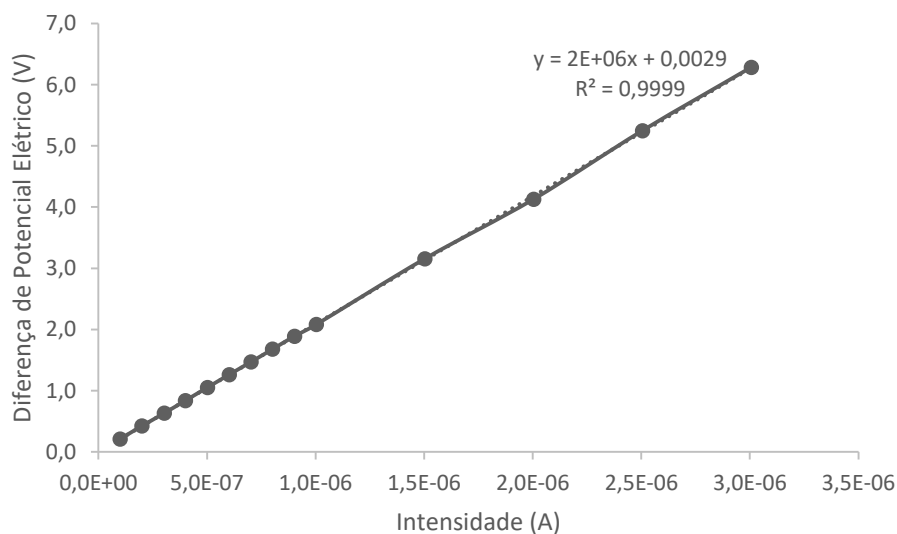


Figura 38 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear para o circuito B#14.

Assim, neste estudo de precisão é possível concluir que os circuitos apresentam as resistências elétricas apresentadas na tabela 9.

Tabela 9 – Resistências elétricas obtidas para os circuitos descritos impressos com tinta PEDOT:PSS.

Circuito	Substrato	Nº de camadas	Resistência (Ω)
B#08_a	Papel de filtro	20	20 464
B#08_b	Papel de filtro	20	18 670
B#08_c	Papel de filtro	20	24 863
B#08_d	Papel de filtro	20	26 503
B#09	Papel de filtro	30	126 905
B#10	Papel de impressão	10	8 000 000
B#11	Papel de impressão	10	9 000 000
B#12	Papel de impressão	20	6 000 000
B#13	Papel de impressão	30	2 000 000
B#14	Papel de impressão	40	2 000 000

Ao analisar os resultados das resistências, é possível afirmar que no caso dos circuitos impressos em papel de impressão quanto maior o número de camadas de tinta impressas, menor é a resistência. E

ste resultado era o espero uma vez que a resistência é tanto maior quanto menor for a sua secção transversal, isto é, quanto mais fina for a camada impressa.

No entanto, o mesmo não se verifica nos circuitos impressos em papel de filtro, uma vez que quando maior o número de camadas, maior a resistência.

3.4. Impressão dos circuitos para caixa de petri. Impressão com tinta de prata.

O circuito inicialmente impresso que apresentou as linhas interiores muito espessas em relação à linha da circunferência está apresentado a seguir, na figura 39.

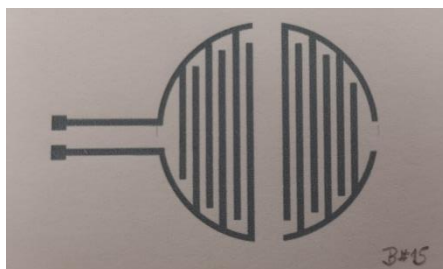


Figura 39 - Primeiro circuito criado para impressão em caixa de petri (B#15).

Após alterar o desenho do circuito, foram impressos outros circuitos ainda com tinta PEDOT:PSS para primeiramente avaliar a existência de corrente com esta nova configuração do circuito. Estas impressões foram avaliadas microscopicamente, sendo os comentários apresentados em anexo. Ao avaliar estas impressões, concluiu-se que o comportamento da tinta PEDOT:PSS é semelhante, ou seja, leva à existência de poros visíveis e linhas incompletamente preenchidas.

As medições de resistência foram efetuadas com o método de medição de quatro pontos, obtendo-se os resultados apresentados nos gráficos representados nas figuras 40-42. Nesta fase, apenas foram efetuadas medidas para os circuitos B#16, B#17 e B#19.

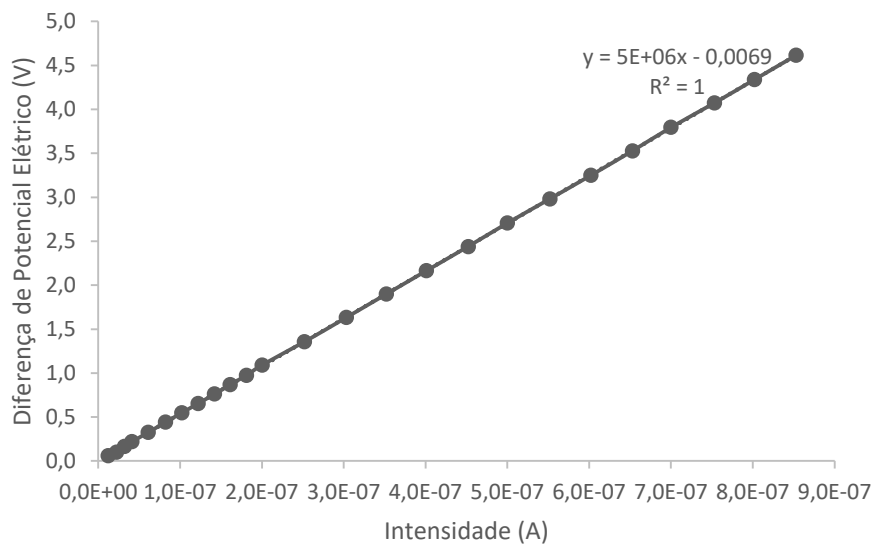


Figura 40 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear para o circuito B#16.

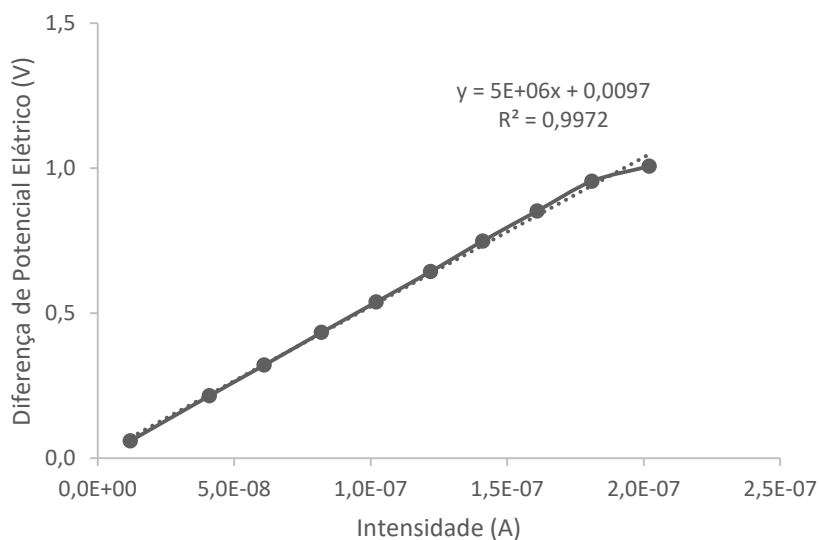


Figura 41 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear para o circuito B#17.

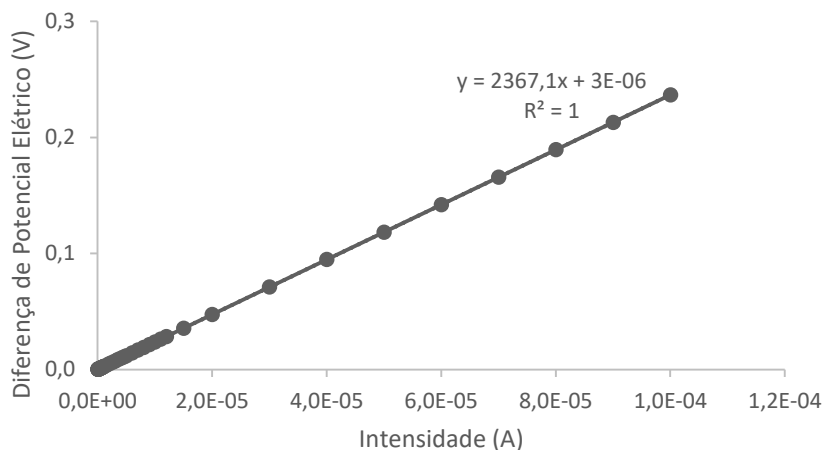


Figura 42 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear para o circuito B#19.

Os resultados obtidos foram os desejados, isto é, verificou-se que existe passagem de corrente, e que a resistência calculada apresenta valores na mesma ordem de grandeza que quando impressos em circuito retangular, permitindo concluir que a impressão da tinta PEDOT:PSS de um circuito circular é eficiente.

Tendo como base os resultados anteriores, avançou-se para as impressões com tinta de prata. Na figura 43 é apresentada a impressão do circuito adaptado para papel de filtro e para papel de impressão, respetivamente.

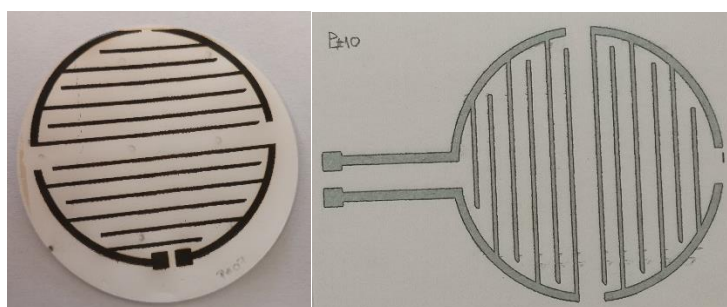


Figura 43 - Fotografia do circuito impresso em papel de filtro, P#07, e impresso em papel de impressão, P#10.

Nestas impressões, verificou-se uma maior cobertura das riscas impressas, mesmo quando impressas com poucas camadas, não apresentando poros, ao contrário do verificado com a tinta PEDOT:PSS.

Foram efetuadas medições para estes circuitos, P#01 e P#02. A representação gráfica V-I é apresentada nas figuras 44 e 45.

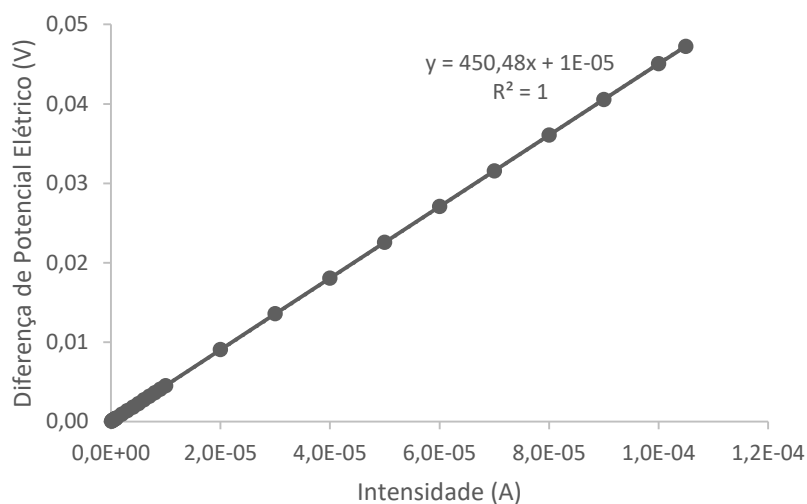


Figura 44 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear para o circuito P#01.

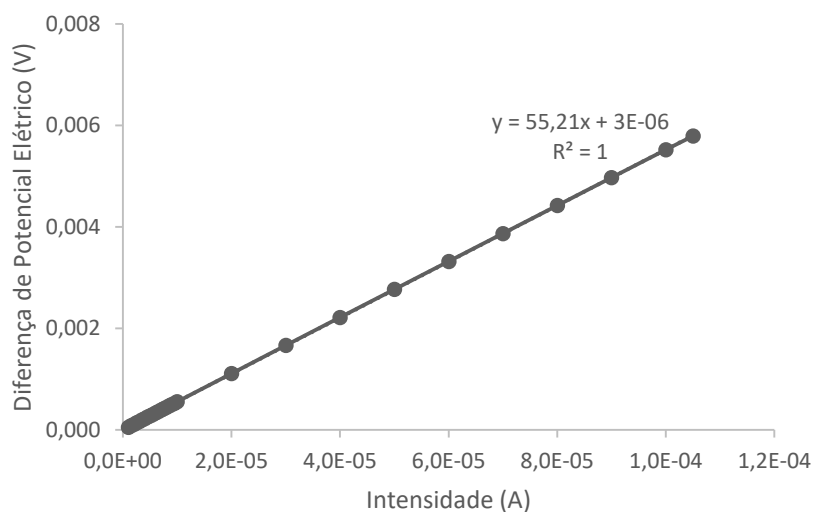


Figura 45 - Representação da diferença de potencial medida em função da corrente aplicada e ajuste linear para o circuito P#02.

Estas medições de corrente foram também efetuadas com o método de medição de quatro pontos utilizando o instrumento de medida sem agulhas (figura 46).

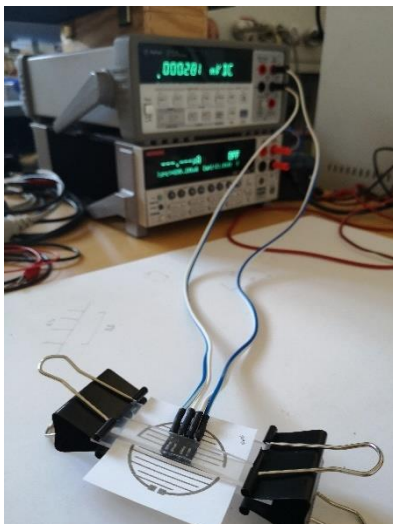


Figura 46 - Medição de corrente para um circuito de prata com o método de medição de quatro pontos.

Também os circuitos impressos com tinta de prata foram observados ao microscópio óptico. A tabela 10 reúne as principais observações realizadas. Algumas das imagens conseguidas nestas visualizações são apresentadas nas figuras seguintes, nas quais estão presentes três partes distintas dos circuitos: (a) contactos, (b) terminação da linha interior e linha exterior e (c) linhas interiores.

Tabela 10 – Características de impressão e observações dos circuitos de estudo de precisão.

Circuito	Substrato	Nozzles	Nº de camadas	Observações ao microscópio
P#01	Papel de impressão	4	5	Boa cobertura de tinta mas pouco intensa.
P#02	Papel de impressão	4	10	Impressão com boa cobertura. Contornos das linhas de tom esverdeado.
P#03	Papel de impressão	4	5	Impressão com boa cobertura mas camada pouco intensa - semelhante a P#01.
P#04	Papel de impressão	4	10	Impressão com boa cobertura. Contorno da linha é esverdeado.
P#05A	Papel de filtro	4	20	Impressão com boa cobertura. Contorno da linha amarelado e cor predominante esverdeado.
P#05B	Papel de filtro	4	20	Impressão com boa cobertura. Contorno da linha amarelado e cor predominante esverdeado.
P#06	Papel de filtro	4	10	Boa cobertura, mas camada pouco intensa. Camada de tom acastanhado.
P#07	Papel de filtro	4	10	Desenho não completamente centrado. Boa cobertura, mas bordos pouco definidos. Camada pouco intensa.
P#08	Papel de impressão	4	1	Boa cobertura e camadas intensas. Tinta bem impregnada no papel.
P#09	Papel de impressão	4	1	Boa cobertura e camadas intensas. Tinta bem impregnada no papel.
P#10	Papel de impressão	4	10	Camadas intensas com contornos acastanhados.
P#11	Papel de impressão	4	10	Camadas intensas com contornos acastanhados.



Figura 47 - Fotografias do circuito P#02 visualizado a microscópio ótico.

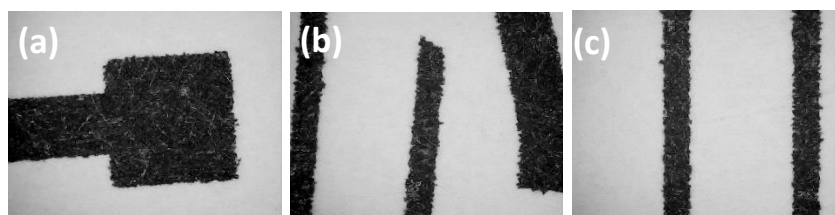


Figura 48 - Fotografias do circuito P#08 visualizado a microscópio ótico.

3.5. Resultados obtidos com perfilômetro

O resultado obtido para o perfil do circuito B#14 com um perfilômetro está representado na figura 49.

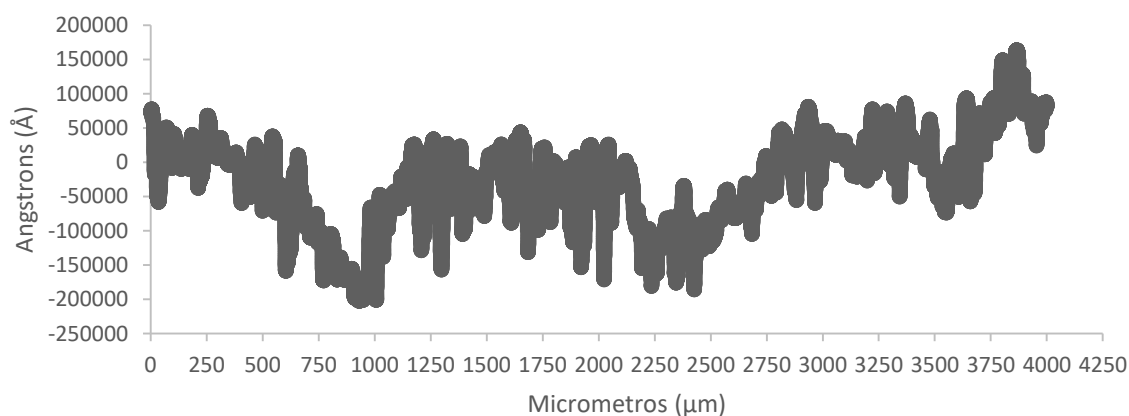


Figura 49 - Representação gráfica obtida para o perfil de uma linha impressa no circuito B#14.

Nesta representação gráfica é notório que a impressão não causa relevo perceptível no local da impressão. Tal dever-se-á à estrutura porosa do substrato que permite que toda a tinta seja absorvida. Assim, não é possível determinar a espessura da camada impressa.

3.6. Circuitos inoculados nos meios de *Luria Bertani* com imposição de corrente.

Os três meios inoculados inicialmente, com as diferentes diluições de ART, foram observados e fotografados após dois dias completos. Obtiveram-se resultados visíveis, que se mostram nas imagens seguintes.



Figura 50 - Meio inoculado apenas com ART após dois dias de incubação.

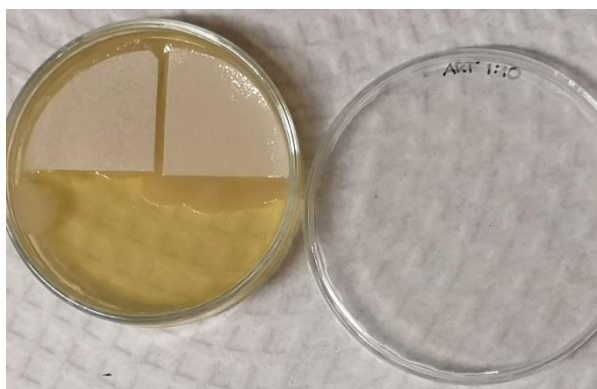


Figura 51 - Meio inoculado com diluição 1:10 de ART após dois dias de incubação.

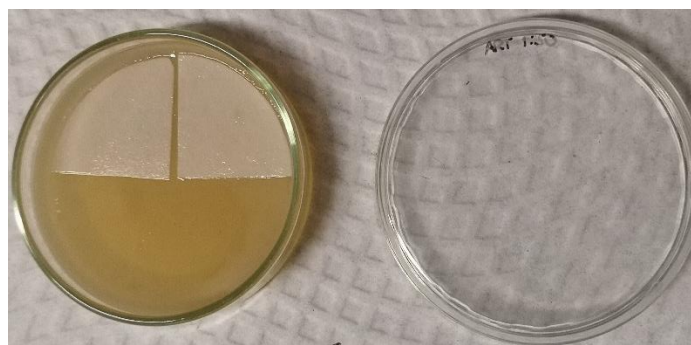


Figura 52 - Meio inoculado com diluição 1:50 de ART após dois dias de incubação.

A água residual tratada apresenta desenvolvimento de colónias de microrganismos diferentes e desconhecidos, não sendo viável uma correta contagem de colónias nos meios. A escolha da amostra a utilizar para inocular os meios com os circuitos foi realizada de acordo com o meio onde se observou maior crescimento de microrganismos, ou seja, ART.

Nos três meios foi possível verificar algum crescimento de microrganismos. Nestes ensaios manteve-se a temperatura a 37°C para melhor controlo da temperatura. No entanto a maior parte das vezes a temperatura em meio hospitalar não é controlada nem tão elevada.

Ainda assim, optou-se por utilizar a estufa de incubação de modo a manter um ambiente controlado e porque os microrganismos crescem melhor a temperaturas elevadas.

Posteriormente, todos os circuitos escolhidos para inocular com a amostra de água residual foram fotografados antes de serem colocados na estufa e depois de finalizado o tempo de incubação. Nas figuras abaixo é apresentado o circuito inoculado à esquerda e o circuito inoculado depois da incubação, à direita.

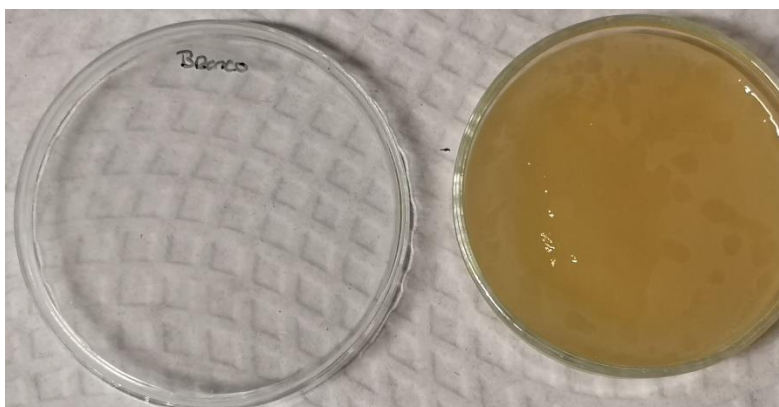


Figura 53 - Meio inoculado com ART após incubação, branco.



Figura 54 - Circuito impresso com tinta de prata em papel de filtro, P#07.

Neste ensaio (figura 54) verifica-se que não há crescimento microbiano visível em qualquer parte do circuito, tanto na zona elétrica/ativa como na zona sem corrente/passiva.



Figura 55 - Circuito impresso com tinta de prata em papel de impressão, P#11.

Também neste ensaio (figura 55) se verifica o não crescimento de microrganismos sobre os circuitos de prata.



Figura 56 - Circuito impresso com tinta de prata em papel de filtro, P#06.

Neste circuito (figura 56), em que se utilizou tinta de prata, é visível o crescimento de microrganismos no meio, contudo, no circuito não é visível o crescimento de microrganismos.

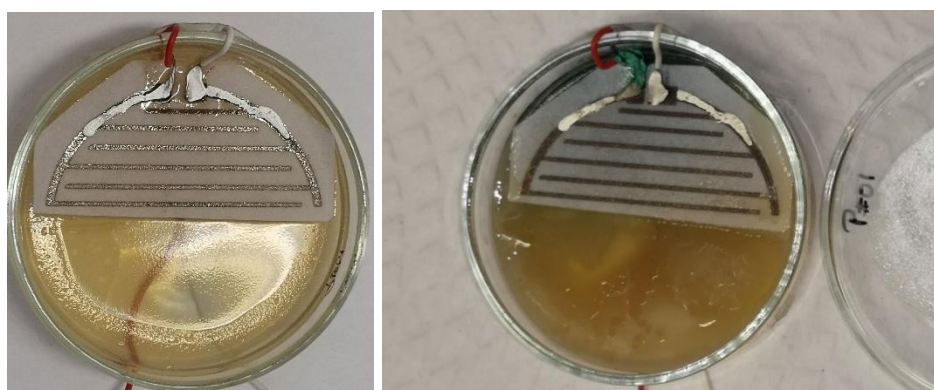


Figura 57 - Circuito impresso com tinta de prata em papel de impressão, P#01.

Neste circuito (figura 57) o contacto de alimentação descolou-se do circuito devido à condensação. Este circuito não apresentou passagem de corrente e verificou-se que no meio houve crescimento de microrganismos. No circuito não é visível crescimento de microrganismos em todo o circuito, apenas no canto inferior direito.

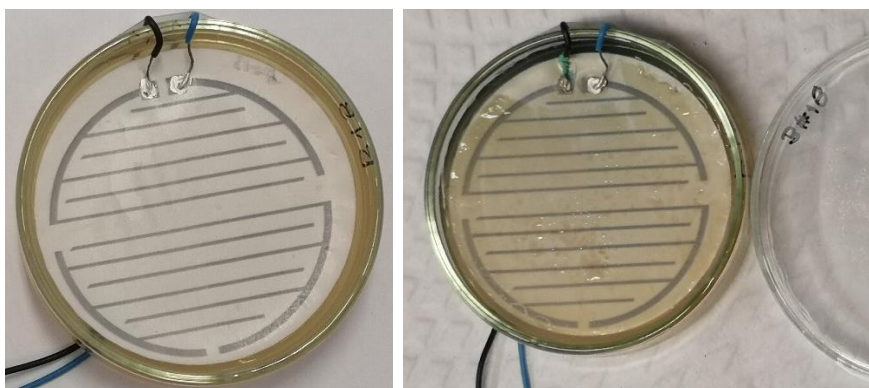


Figura 58 - Circuito impresso com tinta PEDOT:PSS em papel de filtro, B#18.

Também neste circuito (figura 58) impresso com PEDOT:PSS o contacto de alimentação descolou-se do circuito devido à condensação, não havendo passagem de corrente. Contudo, verifica-se o crescimento de microrganismos na parte passiva e na parte ativa do circuito. No entanto, na parte ativa o crescimento de microrganismos é reduzido em volta dos contactos de aplicação de tensão.

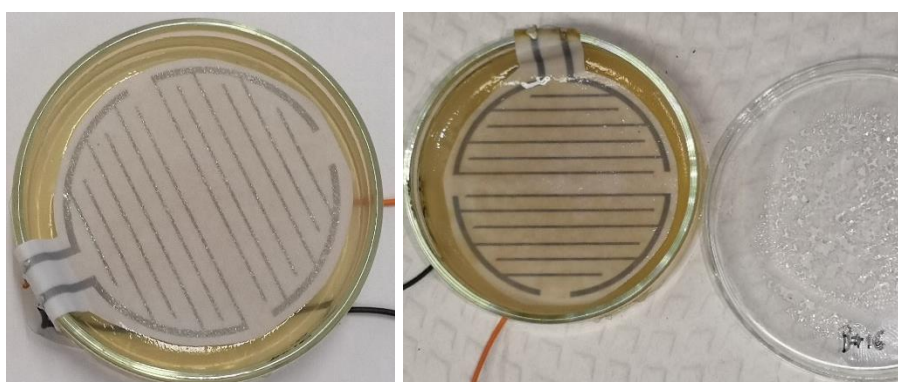


Figura 59 - Circuito impresso com tinta PEDOT:PSS em papel de impressão, B#16.

Neste circuito (figura 59), também impresso com PEDOT:PSS, verificou-se o crescimento de microrganismos em todo o circuito.



Figura 60 - Circuito impresso com tinta PEDOT:PSS em papel de filtro, B#20.

Neste caso, em que tem apenas o circuito ativo, verificou-se o crescimento de microrganismos no meio e no circuito. Mas mais uma vez, junto aos contactos de alimentação e em alguma área circundante aos mesmos, não há crescimento de microrganismo.

Observando as imagens é possível concluir que nos circuitos impressos com tinta de prata não há crescimento de microrganismos. Mesmo os que têm apenas a parte do circuito ativo, os microrganismos crescem no meio mas não em cima do circuito. No entanto, nos circuitos impressos com tinta PEDOT:PSS o mesmo não se verifica, uma vez que há crescimento de microrganismos. Porém, junto aos contactos de alimentação os microrganismos não crescem.

Foi efetuada a medição de corrente de cada circuito sendo, os resultados apresentados na tabela 11.

Tabela 11 – Valores obtidos da medição de corrente após incubação dos circuitos nos meios.

Circuito	Corrente (μA)
B#16	0.8
B#18	0.0
B#20	22.0
P#01	0.0
P#06	0.2
P#07	0.8
P#11	0.1

Os circuitos B#18 e P#01 não apresentaram corrente mensurável, pois os contactos, devido à condensação do meio *Luria Bertani*, descolaram-se dos fios de contato. Todos os outros apresentaram corrente.

Capítulo 4

Conclusões e Perspetivas Futuras

4. Conclusões e Perspetivas Futuras

Neste projeto, foi investigado um novo método de prevenção de infecção em queimaduras e através destas. Este método consistiu na conceção e construção de barreiras na forma de penso electroativo, com função de prevenir a entrada de microrganismos e outros agentes patogénicos através de feridas. Pretende-se que estes novos pensos electroativos possam reduzir o tempo de internamento dos pacientes com queimaduras através de dois fatores: a criação de uma barreira através do campo eléctrico que impeça a entrada de microrganismos nas feridas e também a electroestimulação das células da pele promovendo o seu mais rápido crescimento. As práticas atuais implicam que as queimaduras nos pacientes queimados sejam pouco expostas ao ar e, em consequência, que a sua cicatrização seja mais demorada. Mas esta prática é fundamental para evitar infeções com microrganismos presentes nos meios hospitalares.

Os pensos concebidos e fabricados consistiram em circuitos eléctricos compostos por segmentos condutores à base de um polímero condutor ou de tinta de prata, impressos em vários tipos de substratos: papel de filtro e papel de impressão comum. A tinta de polímero condutor PEDOT:PSS foi escolhida para otimizar a impressão e o funcionamento da impressora, por ser mais económica e de fácil manuseamento (tinta de base aquosa). No entanto, a impressão com esta tinta nos substratos utilizados, nomeadamente, papel fotográfico e papel de impressão, não apresentou uma cobertura ótima, apresentando bastantes poros (observados ao microscópio ótico) e linhas não era totalmente preenchidas. Apesar disso, quando medida a corrente, os circuitos impressos apresentaram valores de corrente aceitáveis e por este motivo foram avaliados também o comportamento dos circuitos impressos com esta tinta, quando inoculados com microrganismos.

Numa primeira fase, procedeu-se à otimização do método de impressão e de seguida imprimiu-se uma série de circuitos com tinta PEDOT:PSS e com diferentes números de camadas e nos diferentes substratos para avaliar o impacto destas variáveis aquando a medição da condutividade dos circuitos. As resistências dos circuitos apresentaram-se elevadas, mas capazes de assegurar a condução eléctrica e a criação de um campo eléctrico. Os resultados obtidos foram decisivos para que se prosseguisse para a fase seguinte em que se criou um novo circuito ajustado ao tamanho do papel de filtro disponível e a uma dimensão compatível com as caixas de petri onde se realizaram os ensaios de contaminação microbiológica. Circuitos idênticos foram também impressos em papel de impressão comum, com as mesmas dimensões, para que o tamanho do

circuito não fosse mais uma variável, sendo a única diferença os contactos em cada tipo de substrato.

Após avaliar o comportamento das impressões neste novo circuito e medições de corrente em cada um deles, passou-se à fase seguinte, de impressão do circuito com tinta de prata. A tinta de prata oferece melhor cobertura na impressão com menos camadas quando comparada às impressões realizadas com tinta de PEDOT:PSS. Além disso, é também uma tinta de fácil manuseamento, uma vez que não apresenta aglomerados como a tinta de PEDOT:PSS.

Contudo, as impressões realizadas não permitiram uma avaliação precisa do perfil obtido em cada uma delas uma vez que os substratos utilizados absorvem as tintas, não sendo visível um relevo nas linhas impressas de cada circuito. Neste caso, para perceber a quantidade de tinta absorvida em cada circuito, seria necessário realizar uma impressão em substrato de vidro, uma vez que este não absorveria qualquer tinta e posteriormente avaliar o seu relevo no perfilómetro.

Por último, procedeu-se à incubação a 37°C de meio *Luria Bertani* com os circuitos impressos inoculados com água residual tratada e com imposição de potencial, para avaliar o crescimento dos microrganismos nas diferentes situações presentes. Sendo desconhecidos os microrganismos presentes na água, não foi possível realizar uma contagem viável de microrganismos ou colónias presente nos meios, pelo que a avaliação foi apenas realizada visualmente.

Foi possível verificar que nos meios com circuitos impressos com tinta prata não houve crescimento de microrganismos em nenhum dos lados do circuito, ou seja, no lado ativo e no lado inativo, enquanto nos circuitos impressos com tinta PEDOT:PSS houve crescimento de microrganismos mais acentuado na parte do circuito não ativa.

No entanto, estes resultados não permitem uma conclusão concreta, uma vez que a prata só por si apresenta propriedades antissépticas, pelo que a inibição de crescimento de microrganismos nos meios que continham circuitos de prata pode dever-se à presença de prata e não à tensão elétrica imposta ao mesmo. Este é um dos fatores que necessitamos esclarecer com mais investigações.

Em resumo, este projeto contribui para o desenvolvimento dos pensos electroativos para queimaduras concluindo-se que a tinta de prata é benéfica para a inibição de crescimento de microrganismos mesmo sem a componente electroativa.

Futuramente será necessário a avaliação mais pormenorizada dos circuitos e da sua ação quando contaminados por microrganismos. Será necessário utilizar uma contaminação mais controlada, nomeadamente com a utilização de espécies únicas de

microrganismos em cada ensaio. Será interessante o ensaio de outros substratos e de outras tintas que permitam melhores condutividades. A utilização de substratos de bio-celulose deverá ser um dos próximos passos. A otimização do desenho do circuito interdigital, nomeadamente alterando a dimensão dos "dentes" e a sua distância de separação será um dos fatores a estudar.

Este foi um trabalho exploratório que pelas suas limitações temporais, de pouca disponibilidade de substratos e de tintas condutoras, tem ainda um grande potencial para desenvolvimentos futuros que possam conduzir à sua aplicação na melhoria dos processos de tratamento de doentes com queimaduras extensas.

Capítulo 5
Bibliografía

5. Bibliografia

- [1] J. H. H. IV and M. Z. Albanna, *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1st ed. Academic Press, 2016.
- [2] M. R. Hamblin, P. Avci, and T. W. Prow, *Nanoscience in Dermatology*, 1st ed. Academic Press, 2016.
- [3] "SkinCeuticals." [Online]. Available: <https://www.skinceuticals.pt/skin-explained/Anatomia-e-Fisiologia-da-Pele-SkinCeuticals/a4960.aspx>. [Accessed: 11-Nov-2019].
- [4] "Manual MSD Versão para profissionais de saúde." [Online]. Available: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/lesões-intoxicação/queimaduras/queimaduras>. [Accessed: 25-Sep-2019].
- [5] "Farmácias Portuguesas." [Online]. Available: <https://www.farmaciasportuguesas.pt/menu-principal/familia/os-tres-graus-das-queimaduras.html>. [Accessed: 25-Sep-2019].
- [6] J. Cambiaso-daniel, J. J. Gallagher, W. B. Norbury, C. Celeste, D. N. Herndon, and D. M. Culnan, *Treatment of Infection in Burn Patients*, Fifth Edit. Elsevier Inc.
- [7] A. Asif, M. Zeeshan, I. Hashmi, U. Zahid, and M. Faraz, "Microbial quality assessment of indoor air in a large hospital building during winter and spring seasons," *Build. Environ.*, vol. 135, no. February, pp. 68–73, 2018.
- [8] Y. Wang *et al.*, "Burn injury : Challenges and advances in burn wound healing , infection , pain and scarring," *Adv. Drug Deliv. Rewies*, vol. 123, pp. 3–17, 2018.
- [9] Y. Yin, I. Horng, C. Shya, and S. Mei, "Incidence and mortality of healthcare-associated infections in hospitalized patients with moderate to severe burns," *J. Crit. Care*, vol. 54, pp. 185–190, 2019.
- [10] "Material for Structural Health Monitoring," *NASA TECHNOLOGY TRANSFER PROGRAM*. [Online]. Available: <https://technology.nasa.gov/patent/LAR-TOPS-195>. [Accessed: 25-Nov-2019].
- [11] D. Perry, J. Colthurst, P. Giddings, D. A. McGrouther, J. Morris, and A. Bayat, "Treatment of symptomatic abnormal skin scars with electrical stimulation," *J. Wound Care*, vol. 19, no. 10, pp. 447–453, 2010.
- [12] J. Izdebska and S. Thomas, *Printing on Polymers Fundamentals and Applications*, 1st ed., vol. 30. William Andrew, 2015.
- [13] FUJIFILM, "Dimatix Materials Printer DMP-2831 Series," *User Man.*, vol. Revision 4, pp. 1–150, 2010.

- [14] "Merck," *Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate)*. [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/560596?lang=pt®ion=PT>. [Accessed: 11-Nov-2019].
- [15] "ELECTRONICA PT." [Online]. Available: <https://www.electronica-pt.com/lei-ohm>. [Accessed: 29-Sep-2019].

Capítulo 6
Anexos

6. Anexos

Circuitos impressos e respetivas características de impressão e observação microscópica

Tabela 12 - Circuitos e respetivas características de impressão e observação microscópica.

Circuito	Substrato	Impressão		Observações ao microscópio
		Nozzles	Nº camadas	
B#01	Papel Navigator A	1	5	Apresenta poros visíveis e linhas incompletamente preenchidas.
B#02	Biocelulose	2	5	Impressão incompletamente preenchida (efeito de «às riscas»). As riscas estão totalmente preenchidas mas com borrões e irregular.
B#03	Papel Navigator A	4	5	Impressão incompletamente preenchida (circuito «às riscas»). Linhas mais preenchidas do que em B#01, com menos poros e sem borrões.
B#04	Papel filtro PALL	4	5	Linhas definidas, mas não completamente preenchidas. Observação de microporos.
B#05	Papel Navigator A	4	10	Linhas incompletamente preenchidas.
B#06	Papel filtro PALL	4	10	Apresenta microporos e as linhas não estão completamente preenchidas
B#07	Papel fotográfico	4	10	Apresenta microporos e linhas incompletamente preenchidas
B#08	Papel filtro PALL	2	20	Maior preenchimento que anteriores.
B#09	Papel filtro PALL	2	30	Linhas completamente preenchidas e visivelmente intensas.
B#10	Papel Navigator A	3	10	Ausência de linhas completamente preenchidas, existência de falhas na impressão.
B#11	Papel Navigator A	5 (3-7)	10	Poros visíveis e linhas incompletamente preenchidas.
B#12	Papel Navigator A	5 (3-7)	20	Poros visíveis e linhas incompletamente preenchidas (mas mais preenchidas que em B#11).
B#13	Papel Navigator A	6 (2-7)	30	Poros visíveis e linhas incompletamente preenchidas.
B#14	Papel Navigator A	1 (5)	40	Microporos, mas impressão intensa. Baixa definição nos bordos.
B#15	Papel Navigator A	3 (4-6)	10	Poros visíveis e linhas incompletamente preenchidas.
B#16	Papel Navigator A	3 (14-16)	10	Microporos e linhas incompletamente preenchidas.

Tabela 12 - Circuitos e respetivas características de impressão e observação microscópica (cont.).

Circuito	Impressão		Nº camadas	Observações ao microscópio
	Substrato	Nozzles		
B#17	Papel filtro PALL	3 (14-16)	20	Circuito parcialmente destruído ao retirar da impressora. Impressão com boa cobertura mas «às riscas».
B#18	Papel de filtro PALL	3 (8-10)	30	Microporos e linhas incompletamente preenchidas.
B#19	Papel de filtro PALL	3 (8-10)	30	Microporos e linhas incompletamente preenchidas.
B#20	Papel de filtro PALL	3 (8-10)	20	Microporos e linhas incompletamente preenchidas.
B#21A	Papel Navigator A	3 (1-3)	20	Circuito pouco visível, pois falhou a tinta no cartucho. Impressão muito porosa.
B#21B	Papel Navigator A	3 (1-3)	20	Circuito pouco visível, pois falhou a tinta no cartucho. Impressão muito porosa.
P#01	Papel Navigator A	4 (9-12)	5	Boa cobertura de tinta mas pouco intensa.
P#02	Papel Navigator A	4 (9-12)	10	Impressão com boa cobertura. Contornos das linhas de tom esverdeado.
P#03	Papel Navigator A	4 (9-12)	5	Impressão com boa cobertura mas camada pouco intensa - semelhante a P#01.
P#04	Papel Navigator A	4 (9-12)	10	Impressão com boa cobertura. Contorno da linha é esverdeado.
P#05A	Papel filtro PALL	4 (9-12)	20	Impressão com boa cobertura. Contorno da linha amarelado e cor predominante esverdeado.
P#05B	Papel filtro PALL	4 (9-12)	20	Impressão com boa cobertura. Contorno da linha amarelado e cor predominante esverdeado.
P#06	Papel filtro PALL	4 (9-12)	10	Boa cobertura, mas camada pouco intensa. Camada de tom acastanhado.
P#07	Papel filtro PALL	4 (9-12)	10	Desenho não completamente centrado. Boa cobertura, mas bordos pouco definidos. Camada pouco intensa.
P#08	Papel Navigator A	4 (9-12)	1	Boa cobertura e camadas intensas. Tinta bem impregnada no papel.
P#09	Papel Navigator A	4 (9-12)	1	Boa cobertura e camadas intensas. Tinta bem impregnada no papel.
P#10	Papel Navigator A	4 (9-12)	10	Camadas intensas com contornos acastanhados.
P#11	Papel Navigator A	4 (9-12)	10	Camadas intensas com contornos acastanhados.