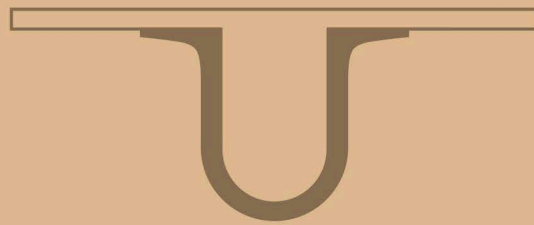




UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



Ana Filipa Almeida Fernandes

INSTRUMENTAÇÃO PARA TESTES  
DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO DA MALÁRIA

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica,  
orientada pelo Professor Doutor Carlos Manuel Bolota Alexandre Correia  
e Professor Doutor João Manuel Rendeiro Cardoso,  
coorientada pelo Professor Doutor Pedro Guilherme da Cunha Leitão Dias Vaz  
e apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia  
da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2018





UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA

FACULDADE  
DE CIÊNCIAS  
E TECNOLOGIA

Ana Filipa Almeida Fernandes

# Instrumentação para Testes de Diagnóstico Rápido da Malária

Tese submetida à  
Universidade de Coimbra para o grau de  
Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores:  
Dr. JOÃO CARDOSO (LIBPhys, UC)  
Dr. PEDRO VAZ (LIBPhys, UC)

Dr. CARLOS CORREIA<sup>1</sup>

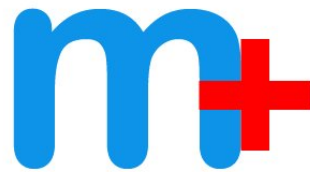
**Coimbra, 2018**



Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com:



**LIBPhys-UC**



**EXATRONIC**  
innovation insight



Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.





*Aos meus pais...*



*"The board is set, the pieces are moving. We come to it at last, the great battle of our time. (...) Courage will now be your best defence against the storm that is at hand - that and such hope as I bring."*

***Gandalf, The Lord of the Rings: The Return of the King***



# Agradecimentos

Começo por fazer um agradecimento especial ao Prof. Dr. Carlos Correia, por toda a paciência que teve para comigo, pelo apoio e pela disponibilidade para qualquer eventualidade. Agradeço ao Prof. Dr. João Cardoso e ao Prof. Dr. Pedro Vaz, pelo apoio na continuação da realização deste projeto; ao Tiago Marçal, pela ajuda na resolução de qualquer problema que surgisse; ao Prof. Dr. Requicha Ferreira, pela disponibilidade e prontidão que sempre demonstrou; à Sara Anjo, pela ajuda na integração deste projeto; à Ana Luísa e ao Emanuel, pela linha de montagem e companheirismo; a todo o restante pessoal do LIBPhys, pelos momentos partilhados ao longo deste ano, no café ou num jantar. Não poderia deixar de agradecer à Andreia, a minha auto-intitulada "escrava", por todo o apoio desde o estágio de verão até à reta final deste projeto - não seria a mesma coisa sem essa personalidade a alegrar-me os dias.

Aos meus afilhados: Francisco, pelas ações que se sobrepõem a palavras, pelas melhores surpresas, pelas viagens medievais e pelas diretas (num aniversário ou num comboio até à Figueira); Tiago, pela lamechice, pelos melhores concertos, pelo milagre do dedo e pelas viagens até Oaz. A ambos, um gigante obrigada por me ensinarem que a faculdade não é só estudar - grande parte das memórias que levo comigo foram passadas com cada um de vós. Não poderia estar mais feliz por me terem escolhido e espero ter-vos dado tanto como me deram a mim. Não imaginam o orgulho que tenho em vocês e nesta família de praxe.

Ao Gonçalo, por ser o meu *buddy* desde o primeiro dia de aulas, por fechar sempre o recinto comigo e por manter a tradição da capa e batina. Ao Margarido, por ser o meu conselheiro de tecnologia e parceiro nos *mobilizatus*. Ao Roque, por ser o meu *Homem de praxe* e ter as intervenções mais aleatórias e divertidas. A vocês os três, por terem estado lá praticamente desde início e que, por trás desse constante sarcasmo, conseguem encontrar as palavras certas e ser dos melhores amigos que uma pessoa pode ter. Juntamente com a Ana, a quem agradeço pelo balanço nada equilibrado entre exercício físico e doces, bem como pelas conversas tardias, não

poderia escolher melhor companhia nas minhas viagens (fico a aguardar a próxima).

Ao Pedro Campos, por ser a prova de que as amizades duram (ainda que a quilómetros de distância), por ter sido um amigo para todas as horas durante estes cinco anos, pelas chamadas, pela paciência e por ser o melhor taxista de sempre! Ao João, por ser a eterna companhia numa saída improvisada, pelas noitadas no df e por arranjar sempre tempo para uma palavra amiga nos momentos mais complicados. À Inês, por me fazer valorizar o que realmente importa e por termos partilhado "mêmo gandas cenas". À Mafalda, pelo eterno "é impossível dizer que não" e por ser *twin* a ter as mesmas ideias e ao mesmo tempo. À Mariana e ao Nelson, por serem os melhores figueirinhas-anfitriões em jantares. À Alexandra, por ter sido uma grande amiga e conselheira. À Maria, pelo companheirismo em aventuras culturais e nas praxes. Ao Pedro Amado, por ser, possivelmente, a pessoa mais genuína que conheci e que me recebeu sempre com um abraço. Ao Bruno, por todos os dramas, saídas, *photoshoots* e pestanas nos olhos.

Finalmente, quero agradecer aos meus pais. Ainda que não existam palavras suficientes, deixo aqui um ENORME obrigada por tudo! Por todos os sacrifícios que fizeram durante estes cinco anos para me poderem proporcionar a melhor experiência universitária, por me ampararem todas as quedas, por estarem sempre lá para festejar as minhas conquistas (por mais insignificantes que fossem), por me incentivarem a ser melhor a cada dia que passa e por serem o meu maior exemplo. Agradeço pela paciência para com o meu mau humor nos meus momentos de desespero e pela compreensão em todos aqueles fins de semana que praticamente só me dedicava à faculdade. Ainda que nem sempre o demonstre, espero que saibam que não poderia desejar melhor: com todos os defeitos e qualidades, foram vocês que definiram as bases da minha personalidade e serão sempre os meus alicerces e os meus melhores amigos. Obrigada, do fundo do coração.

Agradeço a todos que, de uma forma ou outra, me acompanharam ao longo destes cinco anos e contribuíram para aquilo que sou hoje.

Obrigada Coimbra!







# Resumo

A malária é uma doença infecciosa que incide essencialmente nos países subdesenvolvidos, tendo sido a causa de morte de 445 mil pessoas em 2016. A primeira abordagem clínica consiste em verificar se existem parasitas nos eritrócitos, permitindo desta forma o seu diagnóstico inicial. Contudo, nem todos os testes são adequados ao diagnóstico, podendo levar a falsos positivos, o que acarreta custos e tratamentos desnecessários, bem como efeitos secundários. Por outro lado, diagnosticar um falso negativo leva ao aumento da taxa de mortalidade e morbidade, bem como a futuras transmissões.

Torna-se, portanto, crucial o desenvolvimento de um Teste de Diagnóstico Rápido (TDR) capaz de a detetar, num estado precoce, e com vista a minimizar os seus efeitos na população mundial, nomeadamente o impacto na sobrevivência. Como tal, procura-se desenvolver instrumentação médica eficaz para detetar o parasita *Plasmodium falciparum* no sangue infetado.

Este projeto tem como objetivo o desenvolvimento de um sistema passível de ser produzido em massa, sensível e minimamente invasivo que permita a identificação da patologia através de uma pequena gota de sangue. É essencial o seu fácil uso e portabilidade para que possa ser utilizado em qualquer lugar do mundo. Os métodos utilizados para tal são a Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIE) e a Análise de Transmissão Magneto-Ótica (ATMO).

O protótipo destaca-se por ser de baixo custo e não precisar de um especialista para a realização de um teste. Tanto a EIE como a ATMO possibilitam a distinção dos componentes em estudo, através da impedância ou da luminosidade, respetivamente, tendo sempre em mente a influência do campo magnético.

Os resultados obtidos são conclusivos, tendo sido clara a distinção entre uma amostra saudável e infetada, bem como de diferentes níveis de parasitemia.

**Palavras-Chave:** Análise de Transmissão Magneto-Ótica, Espectroscopia de Impedância Elétrica, Hemoglobina, Hemozoína, Malária



# Abstract

Malaria is an infectious disease that mainly affects the underdeveloped countries. It was the death cause of 445 thousand people in 2016. The first clinical approach is to verify if there are any parasites within erythrocytes that allows the diagnosis. However, not all the tests are suitable for diagnosis and may lead to false positives. This is associated with unnecessary costs and treatments, as well as side effects. On the other hand, a false negative diagnosis leads to an increase of the mortality and morbidity, as well as future transmissions.

The use of a more robust Rapid Diagnostic Test (RDT) is essential to detect this disease, in an early stage, and decrease the number of deaths. It is necessary to build up an efficient medical instrumentation able to detect the *Plasmodium falciparum* parasite in the blood.

This project aims to achieve a massive, sensible and less-invasive system that is capable of detecting if the patient has the malaria disease with just a tiny drop of blood from the subject. Its easy-to-use and portability are imperative so that it can be used anywhere. The approach is done with Electrical Impedance Spectroscopy (EIS) and Magneto-Optic Transmission Analysis (ATMO) methods.

This prototype stands out because of its low cost and by not needing an expert to perform the tests. Both EIS and ATMO enable to differentiate the necessary components with impedance and luminosity, always considering the prevalence of a magnetic field.

The results are conclusive with a clear distinction between the healthy and the infected sample, as well as different levels of infection.

**Key-Words:** Electrical Impedance Spectroscopy, Hemoglobin, Hemozoin, Magneto-Optic Transmission Analysis, Malaria



# Siglas e Acrónimos

ABS	Acrilonitrila Butadieno Estireno
ATMO	Análise de Transmissão Magneto-Ótica
CPE	Elemento de Fase Constante
EIE	Espetroscopia de Impedância Elétrica
GUI	Interface Gráfica do Utilizador
Hb	Hemoglobina Ferrosa
HzS	Hemozoína Sintética
I	Corrente Elétrica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCB	Placa de Circuito Impressa
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PLA	Poliácido Láctico
PS	Poliestireno
R	Resistência Elétrica
TDR	Teste de Diagnóstico Rápido
V	Tensão Elétrica
Z	Impedância Elétrica



# Lista de Figuras

1.1	Diagrama de <i>Gantt</i> relativamente ao planeamento do projeto . . . . .	6
2.1	Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i> (Adaptado de [19]). . . . .	11
2.2	Representação esquemática do circuito inversor simplificado para a) o modo de corrente e para b) o modo de tensão. . . . .	13
2.3	Diagrama de Cole representativo (extraído de [26]) . . . . .	14
2.4	Representação dos possíveis erros no diagrama de Cole (extraído de [26]) . . . . .	15
2.5	Circuito equivalente de Randles (adaptado de [28]) . . . . .	16
2.6	Circuito equivalente de Randles (adaptado de [27]) . . . . .	16
2.7	Representação esquemática do Halbach com 12 magnetes de 60 graus de rotação entre eles. . . . .	18
2.8	Imagens de microscopia de luz com coloração <i>Giemsa</i> de a) <i>Plasmodium falciparum</i> no estado de anel, b) <i>Plasmodium falciparum</i> no estado gametócito, c) <i>Plasmodium vivax</i> no estado de anel e d) artefacto [39] . . . . .	20
2.9	Modelo do potencióstato <i>Reference 3000</i> . . . . .	23
2.10	Esquema da transmissão magneto-ótica com cristais de hemozoína a) desalinhados e b) alinhados . . . . .	24
2.11	Orientação magnética dos cristais de hemozoína paramagnéticos (Extraída de [21]). . . . .	25
3.1	Protótipo do sistema utilizado para aquisição de dados . . . . .	27
3.2	Diagrama do processo . . . . .	28
3.3	Placa do circuito impresso com as principais áreas delineadas . . . . .	29

3.4	Circuito da <i>PT 1000</i> . . . . .	32
3.5	Representação da a) caixa do <i>Analog Discovery 2</i> e b) <i>Digilent</i> <sup>®</sup> propriamente dito [46] . . . . .	32
3.6	Circuito do método de impedância . . . . .	33
3.7	Circuito do método de impedância para cada um dos modos . . . . .	34
3.8	Circuito do método de análise de transmissão magneto-ótica . . . . .	35
3.9	Versões das cuvetes utilizadas ao longo do projeto . . . . .	37
3.10	Hemozoína Sintética (HzS) no estado sólido [49] . . . . .	38
3.11	Hemoglobina $A_0$ ferrosa (Hb) estabilizada sob a forma de pó liofilizado [50] . . . . .	39
3.12	Interface utilizada aquando da aquisição de dados no método de Impedância . . . . .	40
3.13	Interface utilizada aquando da aquisição de dados no método de ATMO . . . . .	41
4.1	Diagrama de Cole de amostras de groselha em cada um dos modos . . . . .	44
4.2	Módulo de impedância de amostras de a) groselha e b) leite Grosso para diferentes resistências . . . . .	45
4.3	Diagrama de Cole de amostras de a) groselha e b) leite para diferentes resistências . . . . .	45
4.4	Impedância do protótipo 1 (a magenta) e do protótipo 2 (a azul) usando PBS . . . . .	46
4.5	Impedância do Sistema 1 (a magenta) e do Sistema 2 (a azul) usando groselha . . . . .	47
4.6	Comparação entre as diferentes concentrações de groselha, onde a) normalizado e b) amplificado . . . . .	49
4.7	Diagrama de Cole do circuito RC em paralelo . . . . .	50
4.8	Comparação entre o laser vermelho (a azul) e o laser infravermelho (a laranja) para uma concentração de $0.2\mu\text{L}$ HzS . . . . .	52
4.9	Comparação entre o laser vermelho (a azul) e o laser infravermelho (a laranja) para uma concentração de $0.5\mu\text{L}$ HzS . . . . .	52



4.10	Aquisição no método ótico a) num sistema sem influência do campo magnético e b) num sistema sob a influência do mesmo . . . . .	54
4.11	Aquisição no método ótico com uma amostra de água destilada num sistema sob a influência do mesmo . . . . .	54
4.12	Módulo de Impedância das diferentes concentrações de hemoglobina diluídas em água destilada (azul claro - 25%; rosa - 50%; verde - 63%; laranja - 85%; azul escuro - 92%) . . . . .	56
4.13	Diagrama de Cole de a) visão global e b) zoom na zona de maior interesse das diferentes concentrações de hemoglobina diluídas em água destilada (azul claro - 25%; rosa - 50%; verde - 63%; laranja - 85%; azul escuro - 92%) . . . . .	57
4.14	Diagrama de Cole das diferentes concentrações de hemozoína em amostras de hemoglobina (rosa - 0.2 $\mu$ L; azul - 0.5 $\mu$ L; verde - 5 $\mu$ L; laranja - 10 $\mu$ L de HzS em 1mL de Hb) . . . . .	58
4.15	Intensidade da luz do laser que atravessa as amostras com diferentes concentrações de hemozoína em amostras de hemoglobina . . . . .	59
4.16	Módulo de impedância de duas amostras distintas: uma amostra que possui apenas Hb (indivíduo saudável, representado a magenta) e de uma infetada com HzS (indivíduo infetado, representado a azul). . . .	60
4.17	Intensidade da luz do laser para uma amostra de PBS . . . . .	61
4.18	Intensidade da luz do laser para dois tipos de amostras: a) saudável e b) infetada . . . . .	62



# Lista de Tabelas

3.1	Valores das constantes presentes nas equações 3.2 e 3.4 . . . . .	30
3.2	Valores das constantes presentes nas equações 3.3 e 3.5 . . . . .	31
3.3	Valores das possíveis resistências internas para a impedância . . . . .	34
3.4	Comprimento de onda, <i>threshold</i> da corrente e potência ótica do laser vermelho [47] e do laser infravermelho [48] . . . . .	36
4.1	Tipos de líquidos utilizados, o seu pH e qual o valor máximo médio do respetivo módulo de impedância . . . . .	48
4.2	Resistência $R_1$ constante para as diferentes resistências $R_2$ . . . . .	51



# Conteúdo

<b>Siglas e Acrónimos</b>	<b>xix</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>xxi</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xxv</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>3</b>
1.1 Motivação . . . . .	3
1.2 Contextualização do projeto . . . . .	3
1.3 A doença da malária . . . . .	4
1.4 Enquadramento . . . . .	5
1.4.1 A doença . . . . .	5
1.4.2 Abordagem . . . . .	5
1.5 Calendarização . . . . .	6
1.6 Equipa e Parceiros . . . . .	7
1.6.1 LIBPhys . . . . .	7
1.6.2 Exatronic . . . . .	7
1.6.3 Pedro Gomes Design . . . . .	7
1.6.4 Matibabu . . . . .	8
1.7 Organização da Tese . . . . .	8

<b>2</b>	<b>Estado da Arte</b>	<b>9</b>
2.1	Introdução teórica . . . . .	9
2.1.1	Hemozoína . . . . .	9
2.1.1.1	Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i> . . . . .	9
2.1.1.2	Características do sangue e formação da hemozoína . . . . .	10
2.1.2	Conceitos teóricos das técnicas utilizadas . . . . .	12
2.1.2.1	Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIE) . . . . .	12
2.1.2.2	Análise de Transmissão Magneto-Ótica (ATMO) . . . . .	17
2.1.3	<i>Halbach</i> . . . . .	18
2.2	Revisão da Literatura . . . . .	19
2.2.1	Técnicas de detecção convencional da malária . . . . .	19
2.2.1.1	Microscopia . . . . .	19
2.2.1.2	Técnicas de Diagnóstico Rápido (TDR) . . . . .	20
2.2.1.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) . . . . .	21
2.2.2	Contextualização das técnicas utilizadas . . . . .	22
2.2.2.1	Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIE) . . . . .	22
2.2.2.2	Análise de Transmissão Magneto-Ótica (ATMO) . . . . .	23
<b>3</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>27</b>
3.1	Materiais . . . . .	27
3.1.1	Protótipo . . . . .	29
3.1.2	Amostras . . . . .	36
3.2	Métodos . . . . .	39
3.2.1	Espectroscopia de Impedância Elétrica . . . . .	39
3.2.2	Análise de Transmissão Magneto-Ótica . . . . .	41

<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>43</b>
4.1	Ajuste de parâmetros . . . . .	43
4.1.1	Seleção do modo . . . . .	43
4.1.2	Seleção da resistência interna . . . . .	44
4.1.3	Comparação de protótipos . . . . .	45
4.2	Resultados preliminares . . . . .	47
4.2.1	Diferentes tipos de amostras . . . . .	47
4.2.2	Circuito RC . . . . .	49
4.2.3	Elemento de Fase Constante (CPE) . . . . .	50
4.2.4	Laser vermelho e laser infravermelho . . . . .	51
4.2.5	Independência da temperatura . . . . .	52
4.2.6	Influência do campo magnético (CM) . . . . .	53
4.3	Resultados finais . . . . .	55
4.3.1	Amostras saudáveis . . . . .	55
4.3.2	Amostras infetadas . . . . .	57
4.3.3	Distinção entre amostra saudável e infetada . . . . .	60
<b>5</b>	<b>Conclusões</b>	<b>63</b>
5.1	Trabalho Futuro . . . . .	63
	<b>Bibliografia</b>	<b>67</b>
	<b>Apêndices</b>	<b>75</b>





# Introdução

## 1.1 Motivação

A incessante procura por tecnologias que garantam resultados que economizem tempo e dinheiro leva a uma permanente evolução tecnológica. Como tal, procura-se explorar técnicas conhecidas de forma a colmatar as falhas existentes.

Os testes de diagnóstico rápido (TDR) apresentam-se como um forte aliado para a deteção precoce da malária, tornando possível o acesso a qualquer comunidade, nomeadamente nas localidades mais remotas e onde o teste de microscopia não é exequível. Deste modo, e tendo por base o campo magnético, pretende-se obter um sistema capaz de avaliar amostras com pequenas variações eletroquímicas através da sensibilidade da impedância nos métodos de Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIE) e de Análise de Transmissão Magneto-Ótica (ATMO). O protótipo em desenvolvimento procura minimizar os problemas associados a custos excessivos e portabilidade, bem como obter uma *interface* facilmente perceptível para o utilizador.

## 1.2 Contextualização do projeto

No âmbito da disciplina *Projeto* do último ano do Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra, surge esta dissertação por forma a obter o grau de Mestre. Este documento pretende descrever a abordagem efetuada para o desenvolvimento de instrumentação com vista à deteção precoce da doença da malária.

O projeto deriva de um acordo entre o Professor Doutor Carlos Correia<sup>1</sup> e a *Pedro Gomes Design*, onde se pretende responder às necessidades do projeto da *Matibabu*. Todo o desenvolvimento ao nível da investigação foi efetuado no *LIBPhys* ao longo

---

<sup>1</sup>Apesar de não estar indicado, formalmente, enquanto orientador, o projeto é do Professor Dr. Carlos Correia, tendo sido o principal motor para a elaboração do mesmo.

do último ano letivo.

### 1.3 A doença da malária

A malária consiste numa doença infecciosa que coloca milhões de pessoas em risco todos os anos, tendo sido a causa de morte de 445 mil pessoas em 2016 apesar do esforço internacional que reduziu em 30% o número de mortes entre 2010 e 2015 [1, 2]. De entre os 91 países que manifestaram a presença da patologia, 15 deles acarretam 80% dos casos mundiais, pertencendo à região da África Subsariana (excepto a Índia) [1, 3, 4].

A maior incidência em determinadas zonas do globo está fortemente associada às condições ineficientes de tratamentos de saúde, bem como ao tipo de ambiente que o mosquito transmissor precisa para a sua sobrevivência e reprodução [3, 5]. Neste caso, o mosquito prolifera em regiões tropicais e subtropicais, quentes e húmidas [4]. Contudo, continuam a surgir casos de malária em regiões não edémicas, sendo que esta prevalência está associada ao movimento de pessoas para países onde esta doença predomina, servindo como meio de importação da mesma [6].

A causa da doença é o parasita unicelular *Plasmodium* que tem a capacidade de infetar os eritrócitos. No entanto, a infeção é causada pelas suas diferentes espécies de parasitas, existindo cinco distintas que são capazes de infetar humanos: *falciparum*, *knowlesi*, *malariae*, *ovale* e *vivax*. O *Plasmodium falciparum* apresenta-se como o mais perigoso e virulento [1, 7, 8].

A infeção com este parasita (*Plasmodium falciparum*) altera não só a permeabilidade membranar dos eritrócitos do hospedeiro para absorção de nutrientes e eliminação de resíduos, como também consome hemoglobina com conseqüente formação de cristais de hemozoína [9]. Esta pode levar ao coma ou até mesmo à morte [10], havendo maior risco para mulheres grávidas e crianças até cinco anos, uma vez que possuem um sistema imunitário fragilizado [2, 8, 11]. O período de incubação é de 7 ou mais dias, sendo transmitida através das picadas de um mosquito da espécie *Anopheles* [1, 5].

A sua manifestação varia em diferentes populações de pacientes e contextos epidemiológicos, o que dificulta o seu diagnóstico [7]. Em geral, os sintomas podem ser semelhantes aos da gripe, nomeadamente dores de cabeça e musculares, bem como ataques febris periódicos, suores e anemia. Apesar do paroxismo febril ser um grande indicador da presença de malária, este não exhibe um padrão regular em estágios precoces, devendo para tal existir um histórico de viagens do paciente

associado ao diagnóstico do mesmo [12].

A tolerância ao parasita aumenta com a quantidade de vezes a que uma pessoa esteve sujeita a infecções, conseguindo desenvolver uma espécie de semi-imunidade, o que faz com que as manifestações sejam menos severas e frequentes aquando da comparação com uma pessoa que nunca esteve contacto com a doença [7].

O diagnóstico da malária consiste na deteção e contagem do número de hemácias infetadas. Este é feito, primeiramente, através da verificação da presença de parasitas nos eritrócitos. Contudo, nem todos os testes são adequados ao diagnóstico, podendo levar a falsos positivos, o que acarreta custos e tratamentos desnecessários, bem como efeitos secundários. Por outro lado, diagnosticar um falso negativo leva ao aumento da taxa de mortalidade e morbidade, bem como a possíveis futuras transmissões [3, 7, 9].

## 1.4 Enquadramento

### 1.4.1 A doença

Os doentes infetados com malária possuem características distintas ao nível sanguíneo, nomeadamente a presença de hemozoína. Esta confere propriedades paramagnéticas ao sangue, permitindo que o foco passe por desenvolver instrumentação capaz de detetar as células infetadas mediante o uso de um campo magnético.

De notar que, aquando da invasão das hemácias pelo parasita da malária, existem mudanças morfológicas no citoplasma e na membrana celular que provocam variações bioquímicas. Consequentemente, as propriedades magnéticas, mecânicas, óticas e elétricas são modificadas. Desta forma, o método de Espectroscopia de Impedância Elétrica permite medir as propriedades elétricas e avaliar as mudanças magnéticas que ocorrem na amostra sanguínea, nomeadamente aquando da presença de hemozoína. Por outro lado, a técnica de Análise de Transmissão Magneto-Ótica permite analisar a quantidade de luz que atravessa a amostra, variando com a orientação dos cristais de hemozoína.

### 1.4.2 Abordagem

Este projeto visa dar continuidade a um projeto anterior que passou pelo desenvolvimento de um sistema passível de ser produzido em massa, sensível e minimamente invasivo [13]. Este deve permitir a identificação da patologia apenas através da aquisição de uma pequena gota de sangue. É essencial o seu fácil uso e porta-

bilidade para que possa ser utilizado em qualquer lugar do mundo. Para tal, o sistema possibilita a caracterização das amostras de sangue infetado com o parasita da malária através de dois métodos: Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIE) e Análise de Transmissão Magneto-Ótica (ATMO).

### 1.5 Calendarização

Este projeto foi desenvolvido ao longo dos últimos 10 meses, com vista ao desenvolvimento de instrumentação minimamente invasiva para o diagnóstico rápido e precoce da doença da malária. Este pode ser sequenciado, a nível de tempo e tarefa, nas etapas representadas no diagrama de *Gantt* da *figura 1.1* e descritas, sucintamente, em seguida.

**Contextualização Teórica** - Familiarização com o projeto e com os conceitos teóricos das técnicas a serem utilizadas.

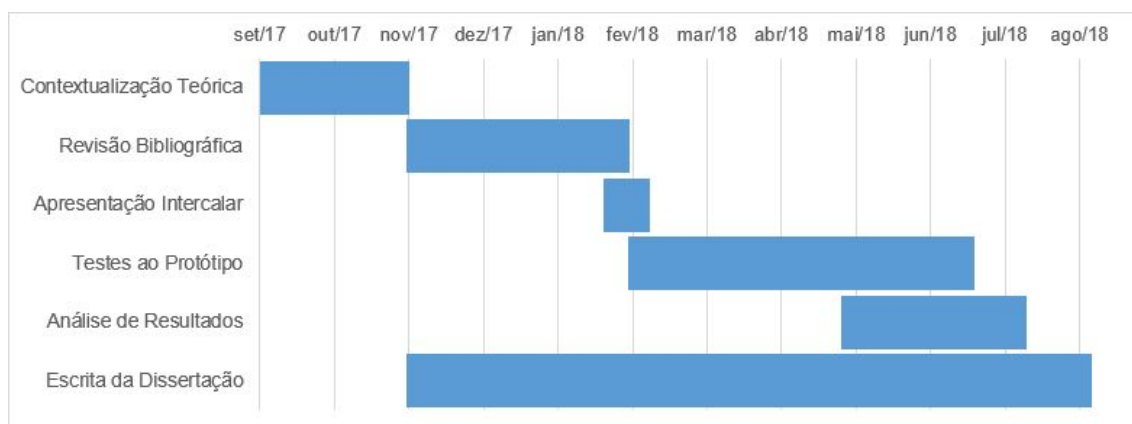
**Revisão Bibliográfica** - Exploração dos projetos desenvolvidos em que se utilizam as mesmas técnicas, bem como métodos distintos mas com a mesma finalidade.

**Apresentação Intercalar** - Preparação do poster.

**Testes ao Protótipo** - Testes de validação do protótipo com diferentes tipos de amostras.

**Análise de Resultados** - Averiguação de resultados quanto aos testes efetuados para definir que rumo tomar.

**Escrita da Dissertação** - Redação das tarefas desenvolvidas e dos resultados obtidos ao longo de todo o projeto.



**Figura 1.1:** Diagrama de *Gantt* relativamente ao planeamento do projeto

## 1.6 Equipa e Parceiros

Esta dissertação contou com várias parcerias essenciais para o seu desenvolvimento: *LIBPhys*, *Exatronic*, *Pedro Gomes Design* e *Matibabu*.

### 1.6.1 LIBPhys

O *LIBPhys* consiste numa unidade de investigação inserida no Departamento de Física da Universidade de Coimbra. Este laboratório é dedicado às áreas de Instrumentação, Engenharia Biomédica e Física da Radiação, encontrando-se inserido em três subgrupos: Grupo de Instrumentação Atómica e Nuclear (GIAN), Grupo de Automação e Instrumentação Industrial (GAII) e Grupo de Eletrónica e Instrumentação (GEI) - no qual se insere este projeto. O propósito do centro de investigação passa por estudar os processos físicos e tecnológicos que levam a métodos e técnicas inovadores na área da instrumentação [14].

### 1.6.2 Exatronic

A *Exatronic* consiste numa empresa especializada em Inovação e Investigação, bem como na Engenharia e Produção Eletrónica nas mais variadas áreas. Sediada em Aveiro, esta parte de um conceito inicial para desenvolver todo o projeto a partir daí. A ideia pode ser apresentada na fase de *Design*, Desenvolvimento, Prototipagem ou Industrialização, sendo garantida a sua Produção, uma vez que a *Exatronic* possui recursos próprios nas várias fases do processo de engenharia e produção eletrónica [15].

Esta empresa possui uma parceria com a Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (FCTUC) em projetos de investigação, tendo a capacidade de fabricar as placas através da captura esquemática integrada e do *design* de PCB (*Printed Circuit Board*).

### 1.6.3 Pedro Gomes Design

A *Pedro Gomes Design* (*PGD*) é uma empresa sediada em Aveiro que procura descobrir, visionar, desenvolver, implementar e criar aquilo que o cliente pretende. Desta forma, a empresa consegue interligar as áreas de negócio, *design* e tecnologia. O processo é dinâmico e adaptado ao cliente em questão, de modo a servir de ferramenta para uma inovação disruptiva [16].

### 1.6.4 Matibabu

A *Matibabu* foi pensada por um grupo do Uganda com o intuito de facilitar a detecção de Malária. Este consórcio utiliza soluções de tecnologia ótica e eletrônica, com vista a combater um dos problemas mais graves na região, através da detecção da patologia na sua fase precoce. Os próximos passos do projeto passam por aprofundar a pesquisa e desenvolvimento, por forma a fazer uso de *smartphones* para o diagnóstico [17].

## 1.7 Organização da Tese

Esta tese encontra-se subdividida em cinco capítulos distintos:

1. No capítulo 1 são descritos sucintamente os princípios da doença da Malária e os métodos que vão ser utilizados para o seu diagnóstico;
2. No capítulo 2 são expostos os conceitos teóricos detalhados acerca do ciclo de formação da hemozoína, bem como uma revisão pormenorizada das bases teóricas dos métodos EIE e ATMO com foco nesta aplicação. É também sumariada a evolução das técnicas e o trabalho que tem vindo a ser desenvolvido por outros autores;
3. No capítulo 3 são mostrados os métodos e diferentes componentes utilizados que podem afetar as medições em cada um dos métodos;
4. No capítulo 4 são apresentados os resultados dos testes de impedância e óticos efetuados, bem como a discussão dos mesmos;
5. No capítulo 5 são explicadas as principais conclusões e notas sobre os testes realizados, assim como as principais contribuições deste trabalho.

# Estado da Arte

No presente capítulo pretende-se abordar os conceitos teóricos subjacentes às alterações provocadas pelo parasita da malária. Por outro lado, e por forma a garantir a correta utilização do protótipo, é essencial compreender cada uma das técnicas utilizadas (Espectroscopia de Impedância Elétrica e Análise de Transmissão Magneto-Ótica), bem como os princípios de medição das mesmas. Finalmente, procura-se explorar quais as abordagens feitas por diferentes autores, quer pelo uso de técnicas tradicionais com aplicação na doença da malária, quer pela contextualização da EIE e da ATMO.

## 2.1 Introdução teórica

### 2.1.1 Hemozoína

Para um melhor entendimento sobre as alterações que ocorrem no sangue aquando da presença do parasita, é necessário perceber primeiramente como ocorre a infeção que leva à presença de cristais de hemozoína nos humanos.

#### 2.1.1.1 Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*

A propagação da doença da malária está associada à picada de um mosquito *Anopheles* infetado com o parasita *Plasmodium*, servindo como vetor para a transmissão da mesma no indivíduo susceptível [4, 5, 10]. O *Plasmodium falciparum* tende a infetar qualquer célula, independentemente da sua idade e tamanho, resultando numa infeção muito agravada [12]. Durante o seu ciclo de vida, os eritrócitos são infetados e destruídos, consumindo cerca de 80% da hemoglobina inicial para a produção de hemozoína [5].

A infeção humana baseia-se em dois hospedeiros distintos (*figura 2.1*): os humanos e o mosquito vetor [8]. Esta dá-se por reprodução assexuada e é possível distinguir-se duas fases no seu ciclo de vida: fase hepática e fase eritrocítica [18].

Inicialmente, há introdução do microorganismo através da picada, onde os esporozoítos das glândulas salivares do mosquito são injetados na corrente sanguínea do seu hospedeiro (*figura 2.1 - 1*). Alguns são eliminados, mas os que sobrevivem vão movimentar-se através da mesma até chegarem ao fígado (*figura 2.1 - 2*) para iniciar o estágio exoeritrocítico da infecção [4, 8, 18]. No interior dos hepatócitos, verifica-se a multiplicação e diferenciação destes esporozoítos por reprodução assexuada, através de um processo de múltiplas divisões em que se formam esquizontes hepáticos (contendo centenas de merozoítos) [4, 10, 18]. Passado 6 a 8 dias, os esquizontes estão suficientemente desenvolvidos para romper os hepatócitos hospedeiros e libertar os merozoítos no sangue (*figura 2.1 - 3*) [8].

Dá-se então início à fase eritrocítica, onde os merozoítos invadem os glóbulos vermelhos [4, 8, 10, 18]. Aquando do interior dos mesmos, estes passam por desenvolvimento assexuado denominado por ciclo eritrocítico (*figura 2.1 - 4*): começam na forma de anel (onde começa a degradação da hemoglobina), desenvolvem para trofozoíto e, finalmente, replicam-se para merozoítos dentro de um esquizonte sanguíneo [4, 8, 11]. Assim, o parasita altera drasticamente os eritrócitos hospedeiros, dando origem a uma célula rígida e de baixa deformabilidade [8, 10].

Depois da rotura celular das hemácias hospedeiras, os merozoítos vão ser libertados para a corrente sanguínea e invadir novos eritrócitos, resultando em patologias severas [5, 8, 11]. Estas mudanças providenciam complicações, nomeadamente ataques febris periódicos, anemia e, em alguns casos, coma ou até mesmo morte [4, 10].

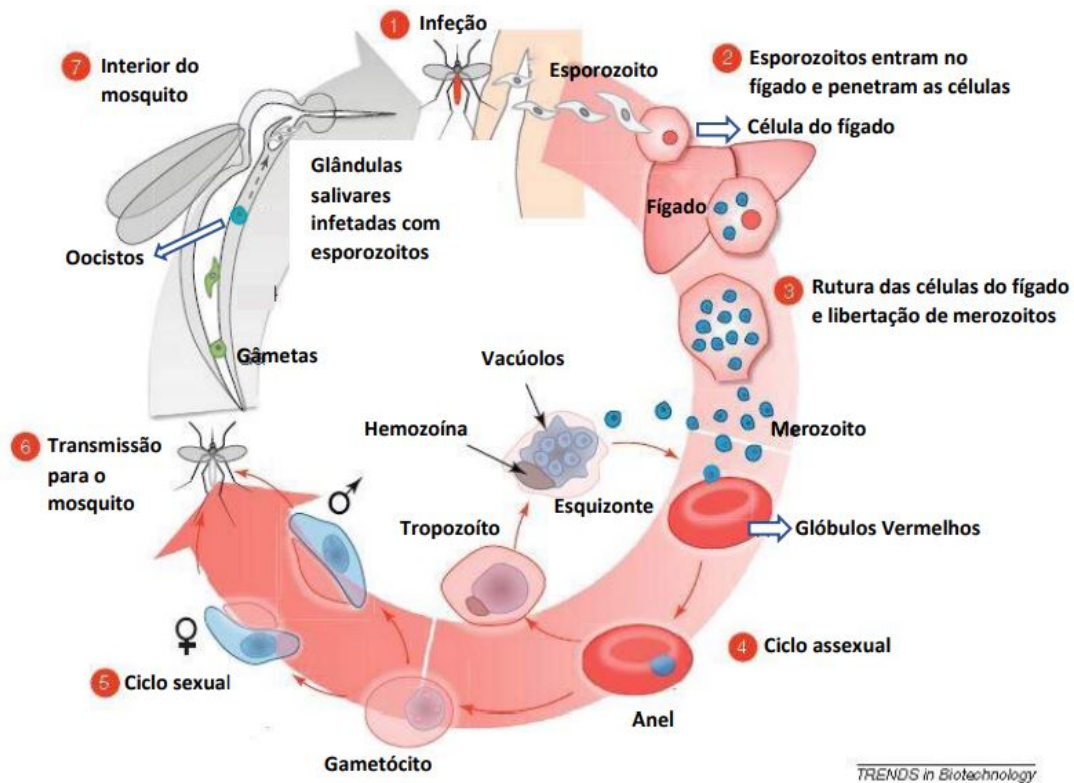
Para além disso, existe reprodução sexuada onde alguns merozoítos vão desenvolver gametócitos (masculino e feminino) a partir da diferenciação dos parasitas sanguíneos (*figura 2.1 - 5*) [8, 18]. Estes vão ficar em circulação no sangue e podem ser transmitidos para o mosquito vetor aquando da picada num indivíduo infetado (*figura 2.1 - 6*) [8]. Desta forma, os gametócitos fundem e desenvolvem-se no intestino do mosquito, diferenciando-se (*figura 2.1 - 7*). Isto resulta na formação de esporozoítos que, aquando do contacto com a saliva, permite o recomeço do ciclo [19].

### **2.1.1.2 Características do sangue e formação da hemozoína**

Para se poder estudar a malária, torna-se crucial perceber a constituição do sangue e, desta forma, ser capaz de diferenciar o sangue infetado do saudável para posterior diagnóstico.

O sangue é constituído por plasma, hemácias, leucócitos e plaquetas. As hemácias, também denominadas por eritrócitos ou glóbulos vermelhos, correspondem a cerca





**Figura 2.1:** Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum* (Adaptado de [19]).

de 45% do volume sanguíneo e são compostas, maioritariamente, por hemoglobina. Têm como principal função transportar o oxigénio para os tecidos em todo o corpo [20].

A digestão da hemoglobina pelos parasitas da malária através dos glóbulos vermelhos resulta na acumulação de grupos heme dentro dos vacúolos digestivos dos parasitas [8, 21]. Estes grupos são altamente tóxicos para os parasitas, sendo transformados numa forma de cristal insolúvel, o que envolve a transformação de iões  $\text{Fe}^{2+}$  com *spin* diamagnético baixo para iões  $\text{Fe}^{3+}$  com *spin* paramagnético elevado [21]. Assim, forma-se um composto de heme microcristalino à medida que desintoxicam o heme livre, denominado hemozoína [22].

A hemozoína possui cristalitos com anisotropia magnética e ótica distinta de qualquer um dos componentes do sangue. Para além disso, o  $\text{Fe}^{3+}$  presente na hemozoína possui efeito paramagnético mais forte do que o  $\text{Fe}^{2+}$  da hemoglobina. Assim, as hemácias infetadas portam-se, normalmente, como partículas paramagnéticas aquando da presença de um campo magnético [21].

## 2.1.2 Conceitos teóricos das técnicas utilizadas

### 2.1.2.1 Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIE)

A impedância é a medida da oposição ao fluxo de corrente elétrica alternada num determinado circuito [13].

Esta pode ser representada por duas componentes distintas: a parte real (dada pela resistência) e a parte imaginária (dada pela reatância) [23, 24].

$$Re\{Z\} = |Z| \cos(\angle Z) \quad (2.1)$$

$$Im\{Z\} = |Z| \sin(\angle Z) \quad (2.2)$$

Analogamente à lei de Ohm, a impedância de um sistema pode ser calculada em termos de amplitude e diferença de fase [23], dadas pelas equações seguintes, respectivamente.

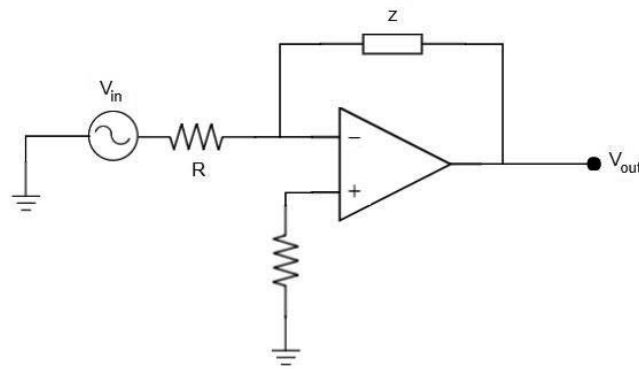
$$|Z| = \sqrt{Re\{Z\}^2 + Im\{Z\}^2} \quad (2.3)$$

$$\angle Z = \arctan\left(\frac{Im\{Z\}}{Re\{Z\}}\right) \quad (2.4)$$

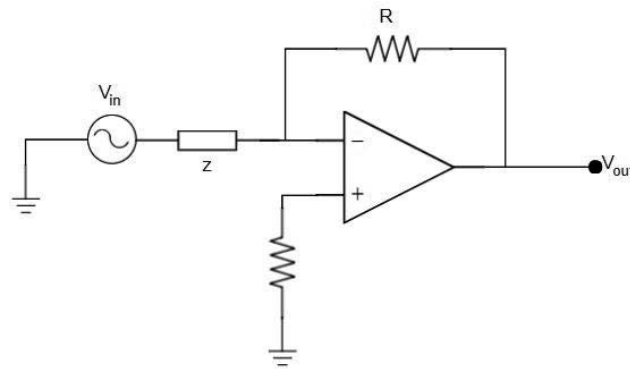
A abrangência da gama de frequências utilizada na espectroscopia de impedância possibilita a criação de uma ponte entre as baixas frequências a que a espectroscopia de impedância normalmente atua e as altas frequências onde costumam atuar técnicas de espectroscopia dielétrica, permitindo colmatar as falhas existentes [25].

### Princípios de medição

Para a aplicação deste método é utilizado um amplificador inversor. Ora, os dados podem ser adquiridos no modo I (onde existe uma corrente constante e variação da tensão) ou no modo V (onde existe uma tensão constante e há variação da corrente), representados na *figura 2.2*.



(a) Modo I



(b) Modo V

**Figura 2.2:** Representação esquemática do circuito inversor simplificado para a) o modo de corrente e para b) o modo de tensão.

No primeiro caso, espera-se que o sinal à saída seja dado por:

$$V_{out} = -V_{in} \cdot \frac{Z}{R} \quad (2.5)$$

Enquanto que no caso do modo V, espera-se que:

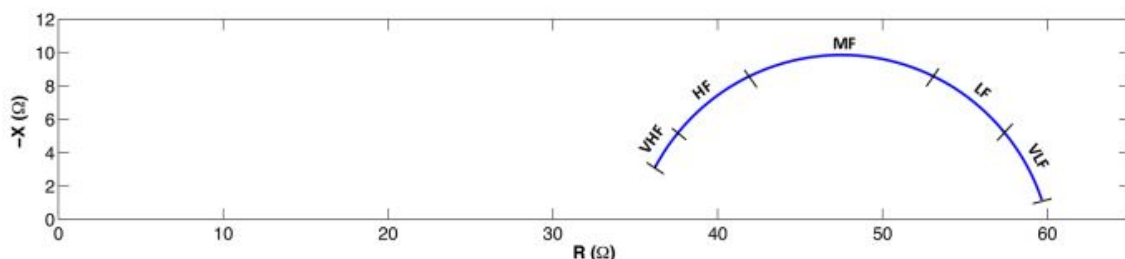
$$V_{out} = -V_{in} \cdot \frac{R}{Z} \quad (2.6)$$

Onde R e Z representam a carga conhecida e desconhecida, respetivamente. Esta última é dada pela amostra que se encontra em estudo, consistindo no meio envolvente dos elétrodos.

A resistência presente na entrada positiva do amplificador não influencia significativamente o objetivo deste trabalho, não tendo sido tida em consideração.

## Diagrama de Cole

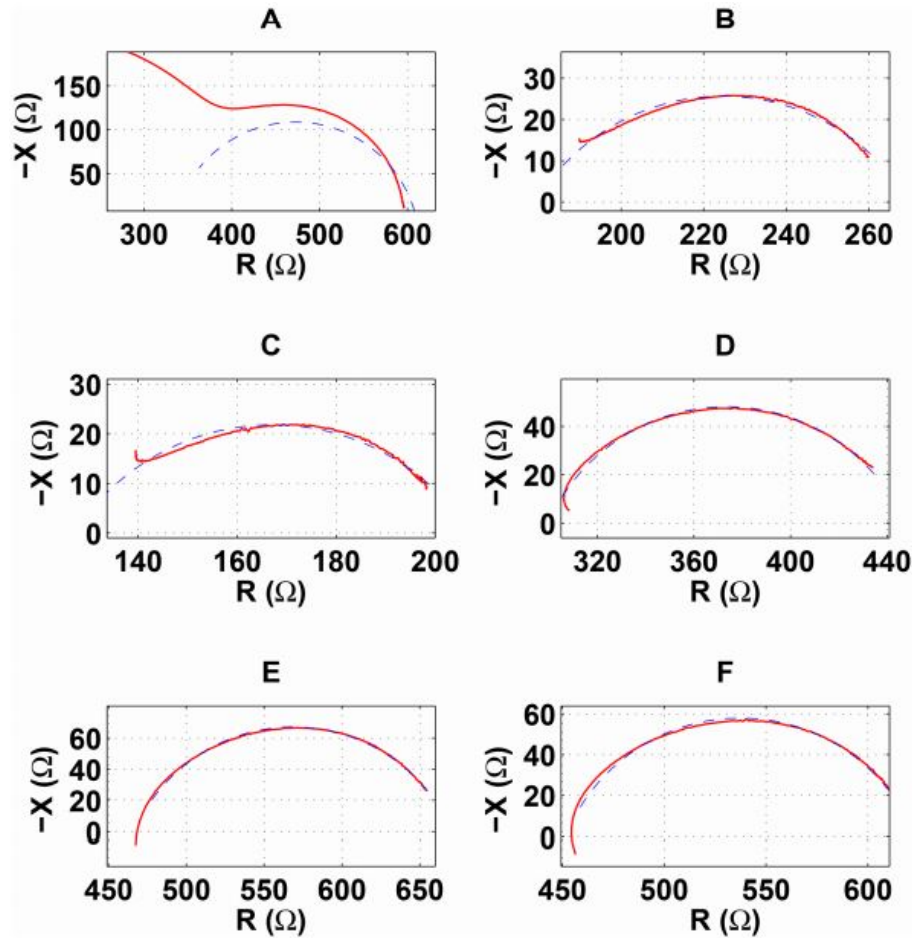
Partindo da componente real (resistência) e da componente imaginária (reatância), é possível obter-se o denominado diagrama de Cole através da representação da última em função da primeira. O valor gerado é a impedância complexa que possui uma relação não-linear com a frequência, gerando, normalmente, um semi-círculo no plano da impedância. A leitura das frequências é feita da direita para a esquerda, onde VLF (*very low frequency*) é a zona de frequências muito baixas e VHF (*very high frequency*) é a zona de frequências muito elevadas (*figura 2.3*) [26].



**Figura 2.3:** Diagrama de Cole representativo (extraído de [26])

O caso representado é o ideal, o que raramente corresponde à realidade. Na verdade, já foram explorados variados artefactos, nomeadamente: o decréscimo precoce da reatância na banda de MF - frequências médias - ou HF - frequências altas - (*figura 2.4 - A*); o decréscimo tardio da reatância (na zona das altas frequências), originando uma espécie de cauda exterior (*figura 2.4 - B e C*); a diminuição da resistência e reatância nas altas frequências, originando uma cauda interior (*figura 2.4 - D*); e o incremento anormal da reatância na banda de VHF, tomando valores positivos <sup>2</sup> (*figura 2.4 - E e F*). Estes artefactos podem ser produzidos pela capacitância do parasita, ou ainda por uso de uma cablagem não adequada ao processo de medição de impedância. Aquando da identificação do tipo de erro, há possibilidade de o corrigir, minimizar ou evitar. Contudo, este processo não é tão intuitivo quanto desejado, tornando os gráficos de difícil interpretação [26].

<sup>2</sup>De notar que os gráficos indicam o simétrico da reatância e não o valor que esta assume verdadeiramente, daí passarem a ser positivos



**Figura 2.4:** Representação dos possíveis erros no diagrama de Cole (extraído de [26])

### Amostras biológicas

Todos os componentes biológicos possuem um Elemento de Fase Constante (CPE) associado. Este componente representa, normalmente, a carga desconhecida da amostra, variando de acordo com o componente biológico que é utilizado.

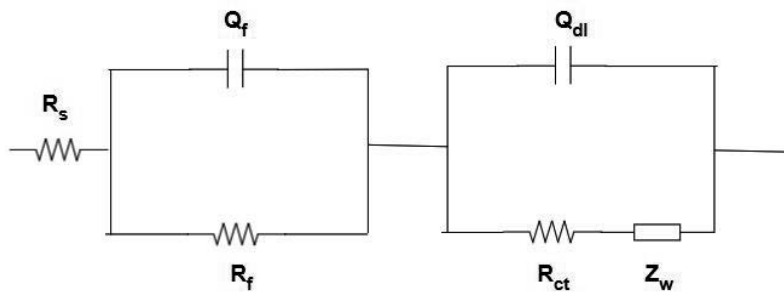
O CPE surge a partir do contacto entre um eléctrodo metálico e um eletrólito, possuindo uma densidade de carga natural devido ao excesso ou deficiência de eletrões. Este representa os efeitos interfaciais no limite entre o líquido e o eléctrodo, tal como a formação de uma dupla camada eléctrica. Esta camada é formada de modo a garantir a neutralidade eléctrica, através da acumulação de partículas carregadas no eléctrodo [25, 27].

Existem diferentes modelos que tentam justificar a presença do CPE através de circuitos eléctricos equivalentes para amostras biológicas. Estes têm, normalmente, uma resistência em série com o CPE e um condensador em paralelo com os mesmos.

Enquanto que a resistência costuma estar associada à condutividade elétrica do eletrólito, o condensador reflete a capacitância total do sensor quando se encontra imerso na amostra [25].

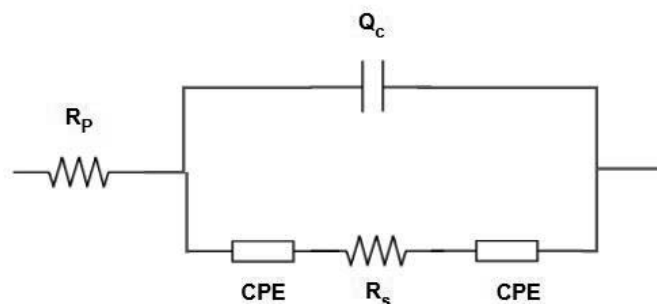
Para obter informações relativamente às propriedades elétricas dos parasitas face aos glóbulos vermelhos, considerou-se um possível modelo de circuito, denominado circuito de Randles (*figura 2.5*). Este apresenta uma resistência eletrolítica da solução ( $R_s$ ), o CPE representado pelo condensador da dupla camada ( $Q_{dl}$ ), a resistência de transferência de carga que traduz a facilidade da transferência eletrônica ( $R_{ct}$ ) e a resistência à transferência de massa ( $Z_w$ ). Quanto à presença da configuração em série com estes componentes, a  $R_f$  serve para simular a resistência do filme e a  $Q_f$  a capacidade dielétrica do filme [28].

A perturbação causada pela presença do parasita na composição iónica é uma possível explicação das mudanças na resistência do filme, tornando a camada celular menos isolante.



**Figura 2.5:** Circuito equivalente de Randles (adaptado de [28])

Outra das hipóteses é admitir o circuito equivalente esquematizado na *figura 2.6*, onde se considera uma resistência ao parasita ( $R_p$ ), a capacitância celular que é determinada a partir da constante dielétrica dos eletrólitos e da geometria dos elétrodos ( $Q_c$ ), a capacitância total da dupla camada (CPE) e a resistência da solução ( $R_s$ ) [27].



**Figura 2.6:** Circuito equivalente de Randles (adaptado de [27])

No entanto, o CPE ainda se traduz num comportamento complexo e, por isso, a informação sobre o mesmo fica aquém do necessário para ser explorado neste projeto. Assim sendo, reconhece-se apenas a presença do mesmo aquando do uso de amostras biológicas.

### **2.1.2.2 Análise de Transmissão Magneto-Ótica (ATMO)**

A hemozoína sob efeito de campo magnético dá origem a cristais com anisotropia magnética e um dicroísmo ótico induzido [29]. São estas propriedades que possibilitam a medição através da técnica ATMO, sendo que a última se encontra intimamente relacionada com a concentração de hemozoína [30]. Isto deve-se ao facto da hemozoína ser um material dicrótico, onde a absorção da luz vai estar dependente da orientação dos seus cristais na amostra, devido à variação dos eixos óticos do material [31].

#### **Princípios de medição**

Aquando de uma suspensão num fluido, como é o caso do sangue infetado com malária, o eixo longo dos cristais de hemozoína está orientado de forma aleatória nas suas três dimensões, não havendo qualquer direção de absorção ótica preferencial. Contudo, a partir do momento em que se encontra sob influência de um campo magnético, os cristais paramagnéticos sofrem um torque, tendendo a orientar-se ao longo da direção do campo aplicado [30].

Desde que o campo magnético seja diferente de zero, o total das componentes dos cristais de hemozoína encontram-se maioritariamente direcionados ao longo do campo, preferencialmente à posição ortogonal ao mesmo. Isto provoca indução de dicroísmo e, conseqüentemente, na presença de um campo magnético há dispersão dos cristais de hemozoína, comportando-se como um polarizador dicroico fraco [30].

O diagnóstico a partir da rotação cristalina pela ATMO demonstra uma excelente sensibilidade para detetar baixas concentrações de cristais de hemozoína sintética [29]. Assim, o processo passa por medir qual é a atenuação de luz ao longo do comprimento e largura do cristal. Isto é conseguido através da diferença entre o sinal de saída e o sinal de entrada [31]. O valor resultante é diretamente proporcional à concentração do cristal, garantindo, à partida, um diagnóstico fiel do nível de parasitemia [30].

### 2.1.3 *Halbach*

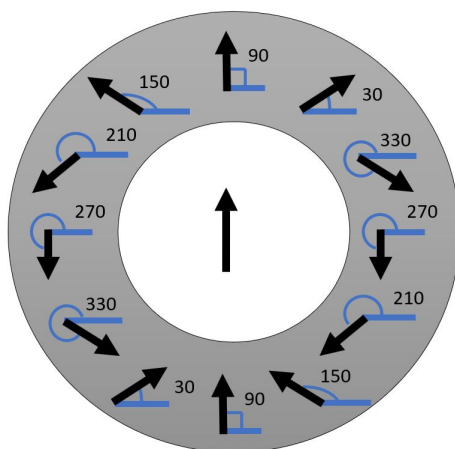
Para a detecção da malária é fulcral ter um campo magnético contínuo e orientável. Como tal, o sistema em questão possui um *Halbach* para produzir esse efeito [13].

O *Halbach* é conhecido por permitir a criação de um campo magnético forte na sua parte central [32]. Ora, os campos magnéticos são, maioritariamente, criados a partir da existência de magnetes permanentes nas proximidades, bem como pelo movimento indutivo das cargas (campo elétrico) [13].

No primeiro caso, a maior intensidade da força magnética na parte central ocorre quando o *array* do *Halbach* usa magnetes permanentes de forma retangular, uma vez que estes possuem uma distribuição específica da densidade de fluxo magnético: forte numa das superfícies do *array* e muito fraca na superfície oposta [33, 34]. A configuração circular permite aumentar a força magnética no lado do *array* onde estão colocadas as bobinas [34].

No segundo caso, as linhas de força delineiam circuitos fechados, sendo que a intensidade do campo magnético é tanto maior quanto maior for a densidade de linhas e a sua direção é dada pela regra da mão direita. Apesar destas não possuírem nenhum início nem fim definido, está convencionado que, para definir a sua direção, as linhas partem sempre do pólo Norte do magnete para o pólo Sul, não sendo representadas aquando no interior do magnete [13].

O sistema utilizado possui 12 magnetes com polarização horizontal que se encontram dispostos num cilindro com 60 graus de rotação entre eles, como se encontra esquematizado na *figura 2.7* [13, 35].



**Figura 2.7:** Representação esquemática do Halbach com 12 magnetes de 60 graus de rotação entre eles.



## 2.2 Revisão da Literatura

### 2.2.1 Técnicas de detecção convencional da malária

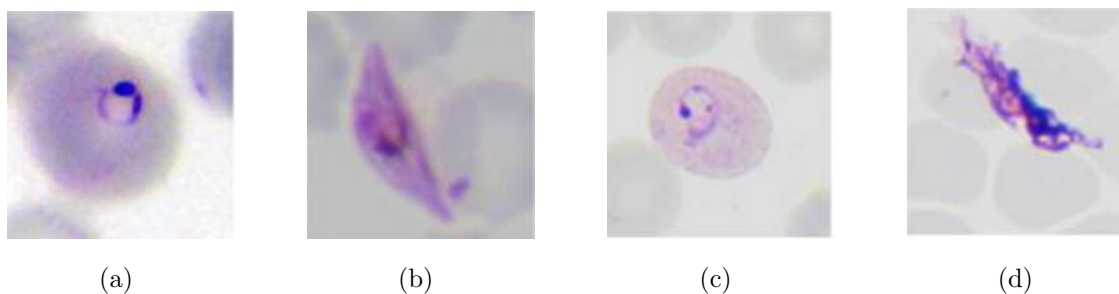
#### 2.2.1.1 Microscopia

A observação direta por via microscópica é o método mais usado para diagnóstico da malária, uma vez que é barato de realizar, permite a quantificação dos parasitas e a diferenciação entre espécies de malária (*figura 2.8*). No entanto, o facto de necessitar de pessoas altamente especializadas e de instalações equipadas, bem como o de consumir bastante tempo e apresentar variâncias significativas entre laboratórios, torna-se difícil em países subdesenvolvidos, onde há maior incidência desta patologia [5, 36].

O diagnóstico por microscopia usando esfregaço de sangue serve sempre de base para o diagnóstico da malária, sendo usada como *standard* para qualquer novo modo ou técnica de detecção [8]. Contudo, este método necessita de bastante tempo e trabalho intenso para que seja possível obter resultados [22]. Requer um microscópio de luz ou visual com 1000x de ampliação e técnicos especializados, sendo que o seu *threshold* de 10 parasitas/ $\mu\text{L}$  só funciona em condições ideais e utilizando microscópios de alta potência [8, 37]. Ora, isto está intimamente relacionado com custos elevados, existindo quase exclusivamente em ambientes de investigação [8]. No caso de usar um microscópio normal (em ambientes sem ser de investigação) este já tem um preço mais acessível e encontra-se na gama de detecção de 50-100 parasitas/ $\mu\text{L}$ , sendo ainda menos sensível no caso de carência de recursos [8, 22].

Apesar destas desvantagens, a microscopia continua a ser um *standard* por permitir rastrear, simultaneamente, outras infeções que possam existir no sangue, bem como fornecer a quantidade estimada de parasitas e informações acerca da sua morfologia e gametogénese [38].

Esta técnica é propensa a erros, uma vez que o diagnóstico é feito com base na identificação morfológica e espécies de forma ou características semelhantes, podendo dar origem a um diagnóstico incorreto mesmo quando submetido a uma avaliação especializada [8]. Um exemplo disso está representado na *figura 2.8*, onde facilmente se poderia confundir o *Plasmodium falciparum* no estado gametócito (*figura 2.8 - b*) com um artefacto (*figura 2.8 - d*).



**Figura 2.8:** Imagens de microscopia de luz com coloração *Giemsa* de a) *Plasmodium falciparum* no estado de anel, b) *Plasmodium falciparum* no estado gametócito, c) *Plasmodium vivax* no estado de anel e d) artefacto [39]

### 2.2.1.2 Técnicas de Diagnóstico Rápido (TDR)

Nos últimos anos as TDRs têm sido exaustivamente utilizadas devido à sua rapidez, uma vez que fornecem um diagnóstico em poucos minutos (entre 5 a 20 minutos) a partir de uma pequena amostra de sangue [5, 7]. A OMS recomendou o seu uso aquando da necessidade de uma confirmação rápida e precisa da infecção por *P. falciparum* em ambientes com instalações laboratoriais limitadas [36].

Este tipo de diagnóstico é de fácil uso e cada vez mais acessível, apresentando-se como uma alternativa à microscopia [7, 22]. Esta técnica, semelhante a um teste de gravidez, consiste num teste imunocromatográfico que utiliza anticorpos monoclonais coloridos e que, através da tecnologia de fluxo capilar, permitem detetar antígenos específicos de parasitas. Estes encontram-se impregnados numa tira de teste (amostra de sangue), resultando no aparecimento de uma banda colorida aquando da existência do parasita [5, 7].

Apesar da vantagem por ser uma infra-estrutura pequena e necessitar de menos especialização para o seu uso adequado em situações de recursos limitados, as TDRs não fornecem informação quantitativa acerca da parasitemia, tendo boa performance para 500 parasitas/ $\mu\text{L}$  no caso do *P. falciparum* [7].

Quanto à sua fiabilidade, pode-se distinguir os falsos positivos e os falsos negativos. Os falsos negativos provêm, essencialmente, do facto da sensibilidade ficar muito aquém daquilo que é necessário para detetar os casos de malária, tendo maior probabilidade de ocorrência quando a parasitemia diminui até valores inferiores a 100 parasitas/ $\mu\text{L}$  [7, 22]. Quanto aos falsos positivos, podem advir da demora na leitura do resultado ou pela persistência do antígeno após o tratamento, sendo aconselhado a não efetuar novo teste no espaço de um mês [7].

Comparando com outras técnicas, o custo é mais elevado do que o da microscopia e a sensibilidade é pior do que a do PCR e da microscopia, reduzindo a sua eficácia [5]. Para além disso, há variação de lote para lote e fraca reprodutibilidade a nível mundial [7].

### 2.2.1.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Nos últimos anos tem sido desenvolvido o diagnóstico molecular da malária, associado a diagnósticos mais precoces, bem como a uma identificação precisa e melhorada da espécie no caso de baixos níveis de parasitemia. Os testes de PCR em tempo real têm vindo a ser largamente utilizados como testes de confirmação em laboratórios de referência, demorando dois ou três dias para se obter os resultados [6, 37, 38].

Esta técnica consiste, essencialmente, em testes baseados na amplificação de ácidos nucleicos [7]. Surgiu para combater as limitações da microscopia, sendo um método laboratorial com sensibilidade até 0.6 parasitas/ $\mu\text{L}$ , o que garante uma redução significativa de falsos negativos [5, 36].

Estudos realizados demonstraram que duas amostras deram negativo aquando da utilização da microscopia e TDR, mas positivo para o PCR em tempo real (para *P. vivax* e *P. malariae*). Ora, ambos os pacientes tinham sido submetidos a um tratamento, o que diminuiu a quantidade de parasitas no seu sistema, tendo sido, por isso, impossível de identificar com a microscopia e TDR. Por outro lado, mais de seis pacientes que tinham sido identificados como negativos durante o curso da doença (*P. falciparum* e *P. vivax*), obtiveram resultados positivos em testes efetuados nas amostras anteriores com a utilização do PCR em tempo real. Assim, esta técnica apresenta-se como uma mais valia para identificação precoce em alguns dos casos devido à sua elevada sensibilidade [38].

O PCR apresenta melhor desempenho, mas requer equipamento e reagentes caros, bem como pessoal no laboratório altamente especializado [22, 37]. Para além disso, as amostras estão sujeitas a contaminações e a eficiência deste método é ainda afetada pela variabilidade genética da população em estudo, não possuindo as características necessárias para ser usado em condições de campo ou em diagnóstico de rotina com recursos limitados [5, 22, 36].

É também fulcral realçar que este tipo de técnica tem uma contribuição mais significativa para identificação de espécies que não as do grupo *P. falciparum* [38].

## 2.2.2 Contextualização das técnicas utilizadas

O sistema utilizado permite conciliar duas técnicas: EIE e ATMO. Desta forma, é exequível analisar a mesma amostra com métodos distintos e que colmatam possíveis falhas que, cada um por si só, possa apresentar.

### 2.2.2.1 Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIE)

Esta técnica permite caracterizar propriedades elétricas dos materiais e a sua interface com os elétrodos, sendo utilizada na investigação da dinâmica da carga na região interfacial com o material aquoso. Basicamente, as medições elétricas para avaliar o comportamento eletroquímico do eletrodo e/ou materiais eletrólitos são feitas com células que possuem dois elétrodos idênticos aplicados nas faces da amostra na forma de cilindro circular. A abordagem geral consiste em aplicar um estímulo elétrico (corrente ou tensão conhecida) aos elétrodos e observar qual a sua resposta (corrente ou tensão resultante) [40].

O *standard* consiste na medição da impedância através da aplicação de uma voltagem ou uma corrente de frequência única, medindo a mudança de fase e a amplitude, ou as partes reais e imaginárias da corrente resultante naquela frequência, quer seja através de um circuito analógico ou da análise de transformada de Fourier (FFT) da resposta [40].

Os instrumentos comerciais disponíveis medem a impedância enquanto função da frequência de forma automática, na gama de 1 mHz a 1 MHz. Apresentam como principais vantagens a fácil acessibilidade e utilização destes instrumentos, bem como o facto de que o experimentalista consegue alcançar uma melhor relação sinal-ruído na gama de frequências de maior interesse [40].

Exemplo disso são os potencióstatos, também designados por *interface* eletroquímica, utilizados para a análise de propriedades das células eletroquímicas. Estes fornecem ligação entre a célula de interesse e os circuitos que permitem a aplicação de um estímulo controlado (quer seja de tensão ou de corrente). Por outro lado, garantem a conexão de um analisador de resposta de frequência à célula por forma a possibilitar a análise de impedância [40].

O uso de potencióstatos destaca-se por garantir um regime linear quanto às condições de estabilidade na célula. Ora, o *Reference 3000* tem várias aplicações, nomeadamente em espectroscopia eletroquímica de impedância, podendo realizar medições num intervalo de frequência de 10  $\mu$ Hz a 1 MHz. Este potencióstato é portátil e

possui cabos de tensão e corrente separados, em que a precisão nas medições estão garantidas (*figura 2.9*). Para além disso, alcança uma amplitude máxima de 3V para tensão AC e de 3A para corrente AC [41].



**Figura 2.9:** Modelo do potencióstato *Reference 3000*

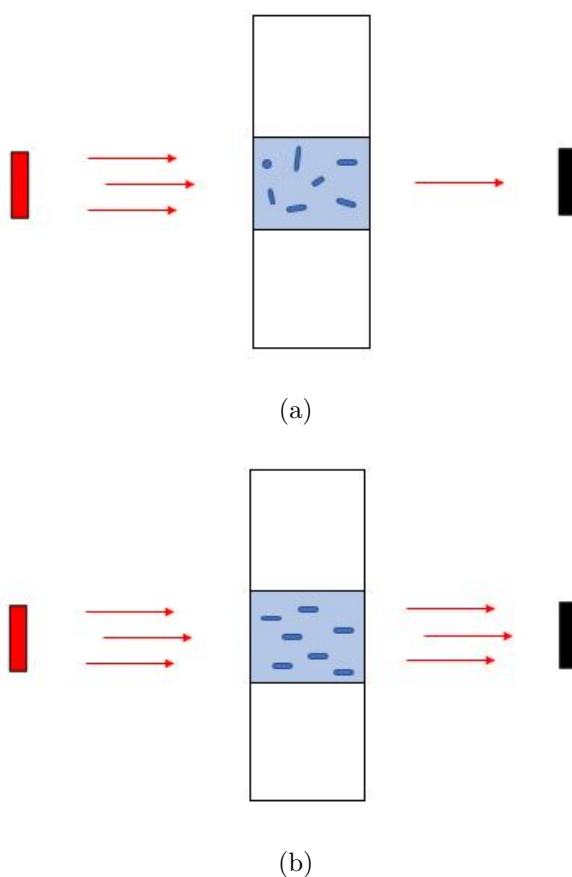
Uma das abordagens efetuadas com esta técnica foi a monitorização das alterações fisiológicas que afetam os glóbulos vermelhos após a invasão pelo parasita da malária. Para tal, usaram-se eléctrodos revestidos a ouro e utilizou-se eritrócitos parasitados no último estágio de desenvolvimento. Os resultados comprovaram que esta técnica é útil para o diagnóstico da patologia [28].

Atualmente, esta técnica é utilizada para o desenvolvimento de diversos biossensores, tendo também aplicação no diagnóstico da malária através da deteção das variações nas propriedades elétricas das hemácias infetadas, com elevada sensibilidade e seletividade para a patologia [9]. Para tal, o LDH *Plasmodium falciparum* é usado enquanto biomarcador, uma vez que esta proteína é altamente expressa tanto na fase sexuada como assexuada dos parasitas da malária, e aptameros enquanto elemento de reconhecimento. O uso de EIE para este teste prende-se ao facto de ser um método especialmente sensível para eventos de reconhecimento na interface eléctrodo-eletrólito. Para além disso, a proteína utilizada para a deteção da patologia possui propriedades eletrostáticas distintas [42].

### 2.2.2.2 Análise de Transmissão Magneto-Ótica (ATMO)

A hemozoína é um composto heme micro-cristalino presente no sangue infetado e distinto de qualquer outro componente, apresentando-se como um ponto de partida para o diagnóstico da malária. Estudos recentes usando cristais de hemozoína sintética suspensos numa amostra de sangue demonstraram que é possível detetar baixas concentrações da mesma através do método de diagnóstico magneto-ótico, ocorrendo rotação dos cristais [22].

Contudo, esta técnica apenas possibilita a detecção dos cristais de hemozoína que se encontram em suspensão e que podem alterar a sua direção magneticamente, como se encontra representado na *figura 2.10*. O processo resume-se a medir a intensidade de luz emitida pelo laser que chega ao fotodíodo após atravessar a amostra (neste caso com cristais de hemozoína). Na ausência de campo magnético, os cristais encontram-se desalinhados (*figura 2.10 - a*) e a luz que se mede é bastante inferior àquela que é medida sob a influência de um campo magnético, onde ocorre o alinhamento dos cristais (*figura 2.10 - b*). Aquando da existência de agregados de cristais ou da sua ligação a outros componentes do sangue lisado, a sensibilidade da técnica pode ser afetada [22].



**Figura 2.10:** Esquema da transmissão magneto-ótica com cristais de hemozoína a) desalinhados e b) alinhados

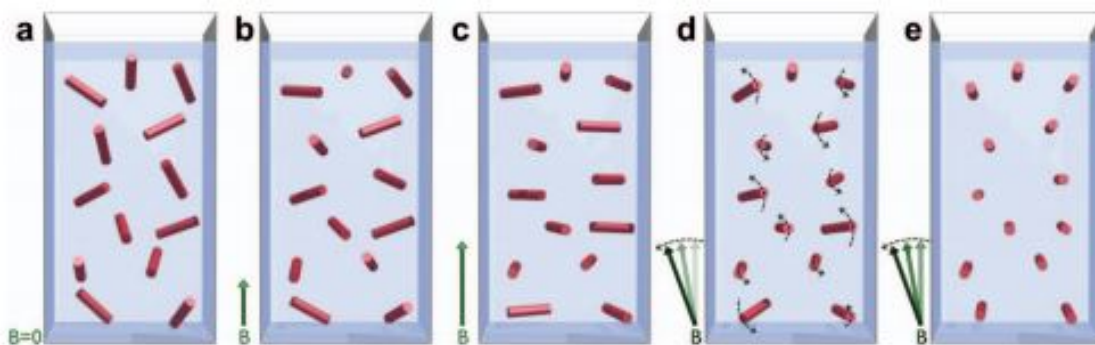
Nos estudos feitos, o sinal de ATMO varia proporcionalmente ao nível da parasitemia. Para além disso, o sinal para cada uma das amostras demonstra um decréscimo gradual com o aumento das frequências do campo magnético rotativo. Esta dependência com a frequência é proveniente da viscosidade da suspensão celular lisada, uma vez que esta dificulta as rotações rápidas dos cristais de hemozoína, o que já

foi comprovado por estudos feitos anteriormente com hemozoína sintética suspensa em amostras sanguíneas [21, 22].

Nesta técnica, inicialmente, os cristais de hemozoína presentes no sangue infetado estão orientados aleatoriamente (*figura 2.11 - a*) a menos que seja induzido um campo magnético externo (*figura 2.11 - b*). Quando o campo magnético é máximo, estes ficam perfeitamente alinhados a duas dimensões (eixos dos cristalitos passam a estar distribuídos uniformemente no plano perpendicular à direção do campo magnético por forma a ganhar energia magnética, tal como se verifica na *figura 2.11 - c*) [21].

No entanto, existe ainda uma direção que permite liberdade de orientação à medida que ocorre rotação do campo magnético. Desta forma, os cristais podem rodar tanto em torno do seu eixo magnético como na direção do campo magnético externo sem haver mudança na sua energia magnética, ocorrendo precessão sobre o seu próprio eixo (*figura 2.11 - d*) [21].

Finalmente, devido à viscosidade do sangue, aquando da presença de frequências elevadas, os eixos tendem a alinhar-se paralelamente com os eixos de rotação, deixando de haver *spinning*. Só neste momento é que está garantido o total alinhamento tridimensional dos eixos dos cristalitos (*figura 2.11 - e*) [21].



**Figura 2.11:** Orientação magnética dos cristais de hemozoína paramagnéticos (Extraída de [21]).

Foram também efetuados outros estudos em ratinhos, onde foi possível extrapolar algumas conclusões para deteção do *Plasmodium falciparum* em humanos. Detetaram a primeira geração de parasitas no estado de anel tardio e os resultados do método ATMO obtidos durante o tratamento dos ratinhos demonstraram a prevalência de quantidades substanciais de cristais de hemozoína em circulação na corrente sanguínea alguns dias após a rutura do esquizonte [29].

Estas observações indicam que o método ATMO tem potencial para detetar infeções humanas de *Plasmodium falciparum*, quer seja através de pequenas quantidades de hemozoína presentes na amostra de sangue aquando do estado de anel em fase tardia e que circulam livremente, quer pela deteção da hemozoína que é libertada dos esquizontes após a ruptura das hemácias infetadas. É também importante realçar que, durante o tratamento, deve ser considerado um período com possibilidade de resultados falsos positivos durante quatro dias, o que implica um cenário semelhante no caso de infeções humanas [29].

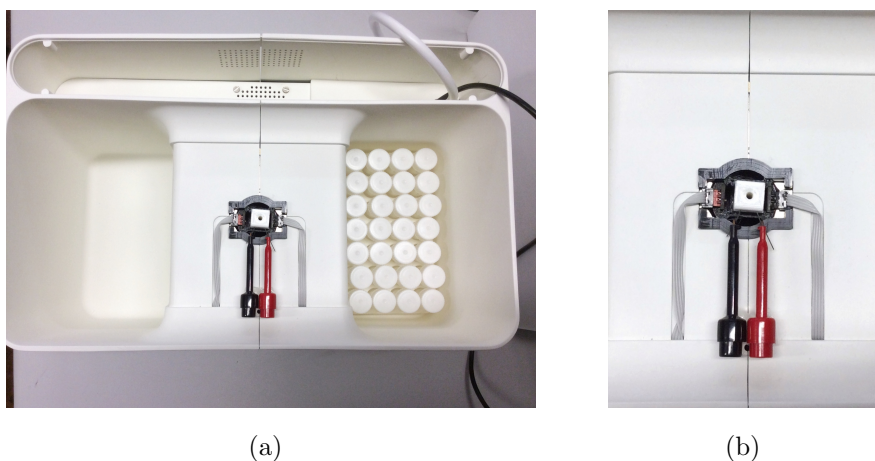


## Materiais e Métodos

Neste capítulo são sumarizados os materiais e métodos utilizados com vista a atingir o objetivo final. O trabalho desenvolvido trata-se da continuação de um projeto anterior, sendo que o protótipo utilizado foi previamente concebido, tal como os circuitos eletrónicos [13]. Os métodos subjacentes são idênticos, tendo sofrido algumas alterações por forma a otimizar os resultados.

### 3.1 Materiais

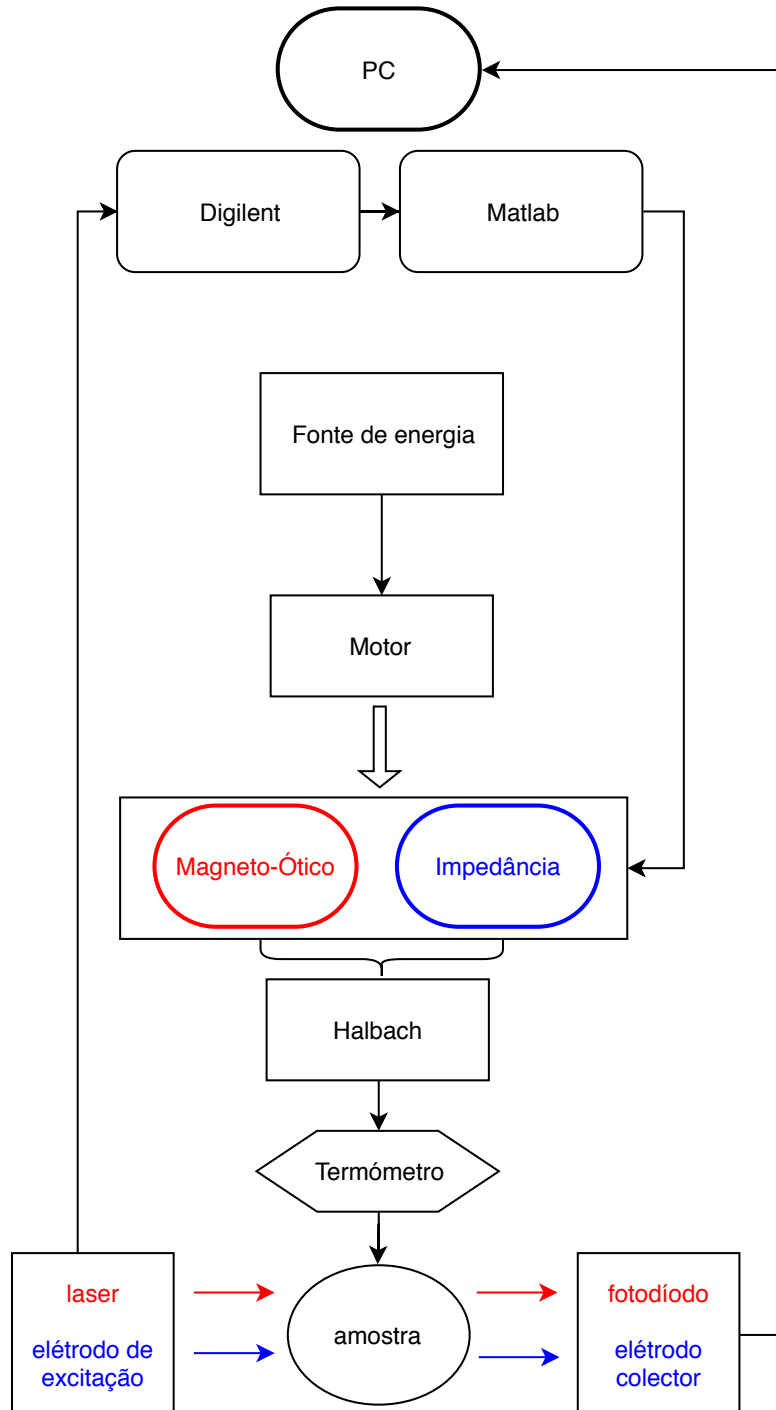
O sistema desenvolvido possui zonas laterais para colocar os porta tubos (*figura 3.1 - a*) e um suporte para colocar a amostra (*figura 3.1 - b*). O suporte encontra-se inserido numa posição central relativamente ao *Halbach*, sendo aplicado um campo magnético constante de, aproximadamente, 1 Tesla. No lado exterior do cilindro o campo magnético é praticamente nulo.



**Figura 3.1:** Protótipo do sistema utilizado para aquisição de dados

O sistema é composto por uma fonte de energia, um gerador de onda (*Digilent*<sup>®</sup>) que é controlado pelo *Matlab*<sup>®</sup>, um motor responsável pela rotação do *Halbach*, um

circuito de impedância, um circuito ótico, um medidor de temperatura (*PT 1000*) e elétrodos que estão embebidos na amostra que se quer testar. O diagrama da *figura 3.2* pretende sumarizar o processo de aquisição.

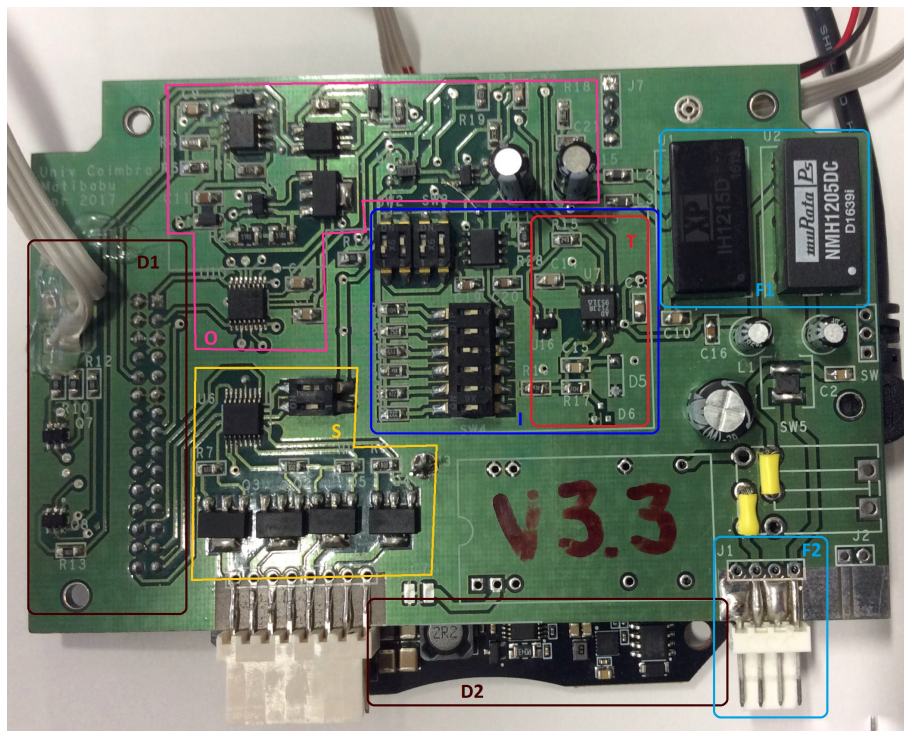


**Figura 3.2:** Diagrama do processo

O sistema possui uma fonte de energia portátil que alimenta o motor com 12V, podendo, contudo, ser substituída pela ligação à tensão da rede (230V). Estes 12V

são convertidos em  $\pm 15V$  DC para alimentar o circuito de impedância e ótico e  $\pm 5V$  DC para o termómetro. Quanto ao motor, este permite a rotação do *Halbach*, rodando a cada 1.8 graus com elevada precisão [43].

Na *figura 3.3* encontram-se delineadas as zonas correspondentes ao que foi referido anteriormente, sendo que: *D1* é onde se liga a placa do Digilent® (apresentado em *D2*) e está contornado a castanho; *S* é o controlo do motor que permite a rotação do *Halbach*, delineado a amarelo; *O* é o circuito para a análise de transmissão magneto-ótica, contornado a rosa; *I* é o circuito utilizado para aquisição no método de impedância, delineado a azul escuro; *T* corresponde à temperatura, que está contornada a vermelho; e *F1* e *F2* correspondem à fonte de alimentação, delineada a azul claro.



**Figura 3.3:** Placa do circuito impresso com as principais áreas delineadas

### 3.1.1 Protótipo

#### Sensor de temperatura

O sensor de temperatura utilizado é o RTD (*Resistor Temperature Detector*) *PT 1000*  $\Omega$  com o coeficiente de temperatura da resistência correspondente a 3850 PPM/ $^{\circ}C$ , que define a mudança da resistência enquanto função da temperatura ambiente.

A partir da folha de especificações do RTD, linearizou-se a temperatura através da equação dada para sensores com valores positivos, uma vez que o sistema nunca estará sujeito a temperaturas negativas [44]. Como tal, partindo de:

$$R(T) = R_0 \cdot (1 + A \cdot T + B \cdot T^2) \quad (3.1)$$

É possível tirar-se os valores de temperatura ao longo do tempo.

$$T = \frac{-R_0 \cdot A + \sqrt{(R_0 \cdot A)^2 - 4 \cdot B \cdot R_0 \cdot (R_0 \cdot R_T)}}{2 \cdot B \cdot R_0} \quad (3.2)$$

Sendo que os valores de  $R_T$  podem ser obtidos através do circuito associado à aquisição da temperatura, a partir do qual se deduz que:

$$R_T = \frac{\frac{-V_o}{V_i} \cdot R_{15}}{\frac{R_{17}}{R_{16}} + 1} \quad (3.3)$$

As incertezas associadas, tanto para T como para  $R_T$ , foram calculadas através da propagação de erros desenvolvida no *Apêndice A*, obtendo-se as equações 5 e 9, respetivamente. As fórmulas foram deduzidas a partir de [45].

$$\delta T = \left| \frac{dT}{dR_T} \right| \delta R_T = \frac{\delta R_T}{\sqrt{((A \cdot R_0)^2 - 4 \cdot B \cdot R_0 \cdot (R_0 - R_T))}} \quad (3.4)$$

$$\delta R_T = \left| \frac{dR_T}{dV_o} \right| \delta V_o \quad (3.5)$$

Os valores de cada uma das constantes encontram-se tabelados em seguida.

**Tabela 3.1:** Valores das constantes presentes nas equações 3.2 e 3.4

Constante	Valor
A	$3,9083 \cdot 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$
B	$-5,775 \cdot 10^{-7} \text{ } ^\circ\text{C}^{-2}$
$R_0$	1 k $\Omega$

**Tabela 3.2:** Valores das constantes presentes nas equações 3.3 e 3.5

Constante	Valor
$R_{15}$	24 k $\Omega$
$R_{16}$	4.7 k $\Omega$
$R_{17}$	100 k $\Omega$
$V_i$	2.5 V
$\delta V_o$	0.001 V

Como a fórmula associada à incerteza de  $R_T$  é composta exclusivamente por valores constantes, uma vez que  $\delta V_o$  é dado pela menor divisão da escala e  $V_i$  é constante no circuito da temperatura, então:

$$\delta R_T = 0.43 \Omega$$

Quanto à incerteza da temperatura, esta varia de acordo com o valor de tensão de saída ( $V_o$ ) que se obtém em cada aquisição.

Os primeiros três valores tabelados foram retirados da *datasheet* [44], enquanto que os restantes (das resistências e das tensões) encontram-se definidos no circuito da *figura 3.4*.<sup>3</sup> Desta forma, é facilmente deduzida a *equação 3.3* a partir do circuito representado.

A *PT 1000* encontra-se representada no local por RT1 e RT2, sendo designada por RT.

---

<sup>3</sup>Os valores atribuídos e o desenho do circuito foram elaborados pelo Professor Dr. Carlos Correia numa fase prévia.

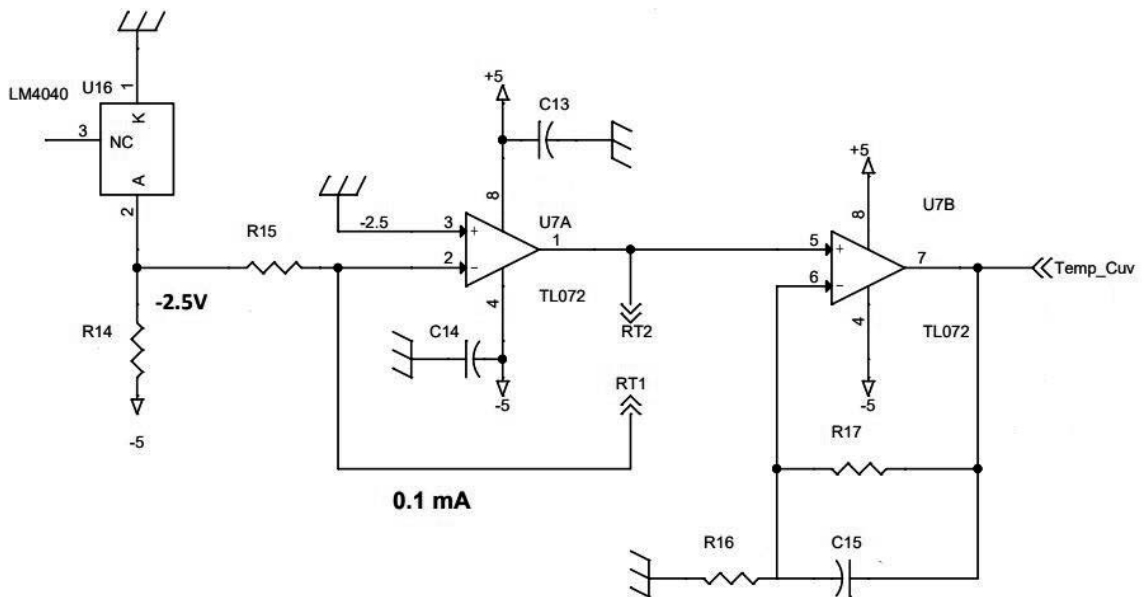


Figura 3.4: Circuito da PT 1000

### Digilent®

O hardware possui um Digilent® (*Analog Discovery 2*) que permite medir, guardar e gerar tanto sinais analógicos como digitais (*figura 3.5*). Este dispositivo multifuncional é relativamente pequeno e pode ser utilizado em qualquer local em que se pretenda trabalhar, nomeadamente fora do laboratório. Tem a vantagem de substituir vários instrumentos eletrónicos, simplificando assim a aquisição de dados [46].



(a)



(b)

Figura 3.5: Representação da a) caixa do *Analog Discovery 2* e b) Digilent® propriamente dito [46]

É de destacar algumas das suas características, nomeadamente:

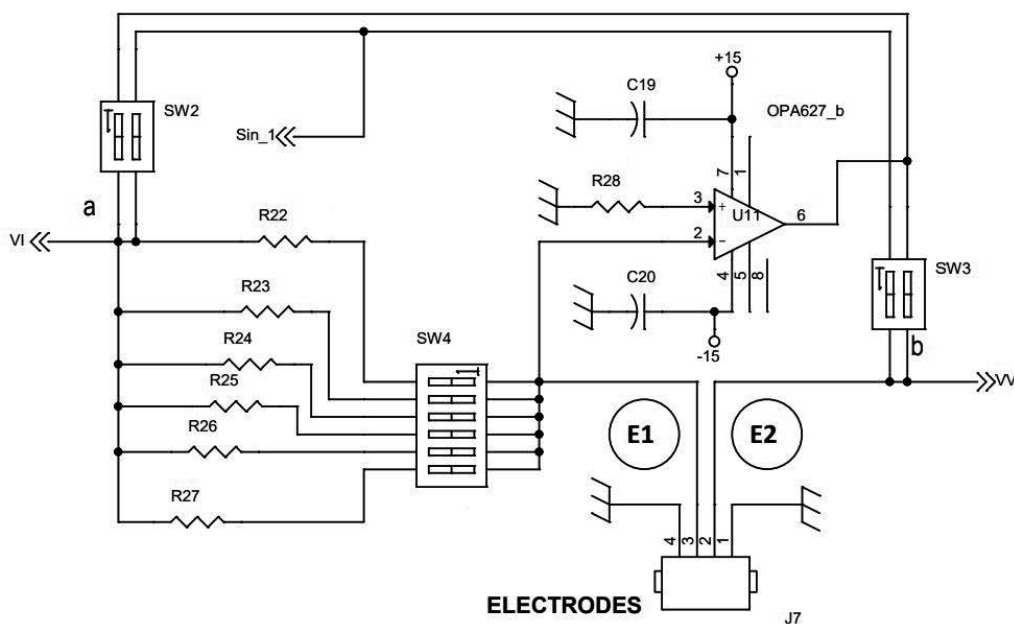
- Possui 16 pins para sinais digitais I/O;
- Permite gerar ondas na gama de 100  $\mu\text{Hz}$  até 10 MHz;
- Existe uma *toolbox* do *Matlab*<sup>®</sup> específica para o *Digilent*<sup>®</sup>;
- Possibilita usar como fonte de energia uma entrada USB.

## Circuitos

O sistema utilizado permite fazer aquisições utilizando duas técnicas distintas, tal como referido anteriormente. Para tal, este é constituído por circuitos de confiança que permitem adquirir dados relativamente à impedância e à quantidade de luz que atravessa a amostra.<sup>4</sup>

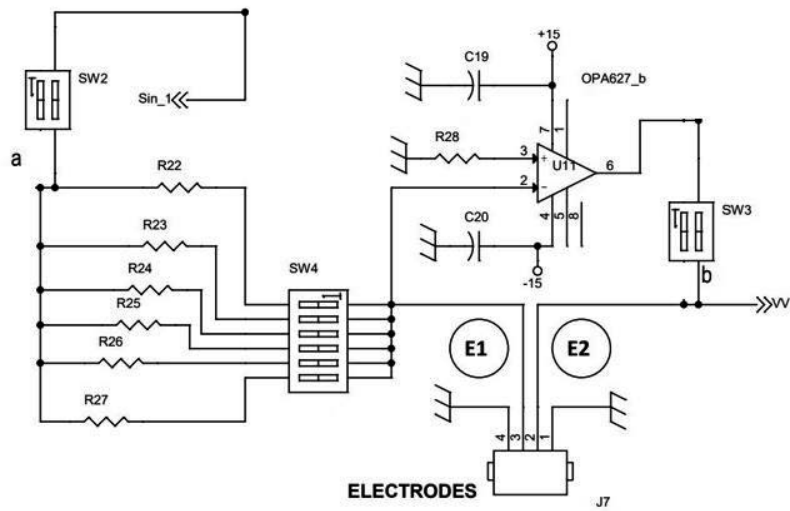
No método de impedância, o circuito possui *switches* que permitem alternar entre modos de excitação (modo I e modo V), utilizando o canal 1 ou canal 2, respetivamente. Se necessário, também possibilita modificar o valor da resistência interna através da alteração da mesma de entre as que estão disponíveis. Os valores das respetivas resistências encontram-se na *tabela 3.3*.

O esquemático global do método de impedância está representado na *figura 3.6*, sendo que se separou o circuito de cada um dos métodos na *figura 3.7*. Este encontra-se ligado ao *Digilent*<sup>®</sup>, permitindo desta forma a aquisição do sinal resultante das condições definidas neste circuito.

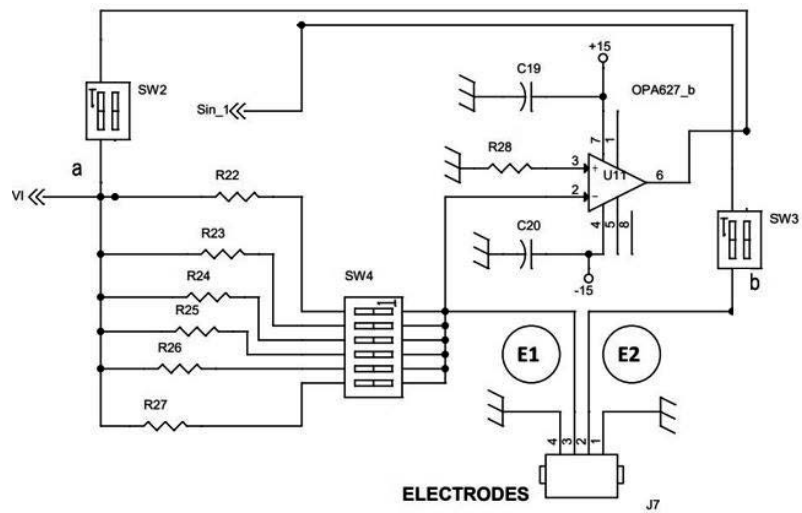


**Figura 3.6:** Circuito do método de impedância

<sup>4</sup>Os circuitos foram previamente desenhados pelo Professor Dr. Carlos Correia.



(a) Modo I



(b) Modo V

**Figura 3.7:** Circuito do método de impedância para cada um dos modos

**Tabela 3.3:** Valores das possíveis resistências internas para a impedância

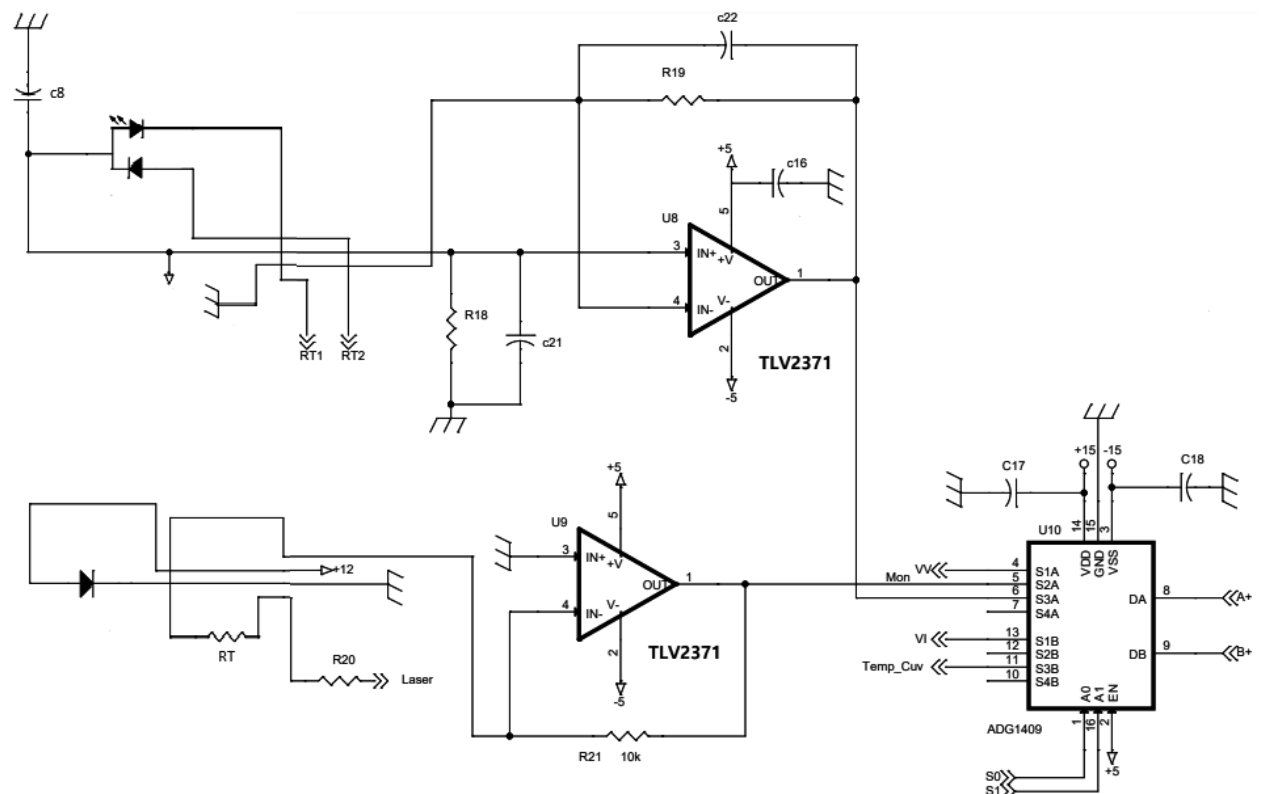
Constante	Valor ( $k\Omega$ )
$R_{22}$	100
$R_{23}$	75
$R_{24}$	33
$R_{25}$	15
$R_{26}$	8.2
$R_{27}$	2.2



No método de análise de transmissão magneto-ótica, o circuito possibilita a recolha de valores de tensão que são diretamente proporcionais à quantidade de luz que atravessa a amostra. O circuito encontra-se representado na *figura 3.8*.

O sistema possui duas placas de PCB paralelas inseridas no centro do *Halbach*. O laser está integrado numa das placas e o fotodíodo na placa oposta à mesma. A aquisição é conseguida através da inserção da cuvete entre as duas placas, estando a amostra devidamente alinhada com as mesmas, possibilitando assim a passagem de luz do laser até ao fotodíodo.

Também é possível verificar a existência de um multiplexador (componente U10 da *figura 3.8*), que possibilita alternar entre a técnica de aquisição que se pretende efetuar. Como tal, o valor de entrada é definido através de binários que são dados por S0 e S1, permitindo seleccionar a técnica pretendida de acordo com os seus valores. Assim sendo, no método magneto-ótico o circuito está subdividido em duas partes (fotodíodo laser e fotodíodo monitor) que se encontram associados a S3A e S2A do multiplexador, respetivamente. Por outro lado, para fazer aquisições no método de impedância são usados S1A e S1B.



**Figura 3.8:** Circuito do método de análise de transmissão magneto-ótica

De notar que se utilizaram dois lasers distintos aquando da utilização desta técnica.

Começou-se por utilizar um laser vermelho, sendo posteriormente substituído por um laser infravermelho. As características principais de cada um encontram-se descritas na *tabela 3.4*.

**Tabela 3.4:** Comprimento de onda, *threshold* da corrente e potência ótica do laser vermelho [47] e do laser infravermelho [48]

	$\lambda$ (nm)	threshold (mA)	potência ótica (mW)
laser vermelho	670	20	15
laser infravermelho	850	25	10

Esta substituição poderia implicar alterações no circuito, uma vez que possuem diferentes gamas de funcionamento. No entanto, a corrente que passa no circuito é suficiente para o *threshold* de qualquer um dos *lasers*. Assim sendo, há passagem de corrente e, desta forma, o circuito manteve-se inalterado.

É importante realçar que, inicialmente, verificou-se um decréscimo no sinal recebido pelo fotodíodo em cada aquisição. Procurou-se desconstruir todo o processo, por forma a averiguar o foco do problema. Ora, após várias tentativas para o resolver, verificou-se que, através da análise da folha de especificações do *laser* vermelho, o aumento da temperatura leva a uma diminuição da potência para uma mesma corrente, tendo-se presumido que fosse essa a razão [47]. Assim sendo, tornou-se necessário aumentar o intervalo de tempo entre os momentos em que o *laser* se encontra ligado para fazer a aquisição, garantindo desta forma um comportamento mais constante. Este aumento reside em fração de segundos, não tendo influenciado significativamente o tempo de aquisição total.

Todos os circuitos encontram-se impressos numa mesma placa de PCB, tornando possível a posterior escolha do método de aquisição através do *software*.

### 3.1.2 Amostras

#### Caracterização das cuvetes e estrutura interna

As cuvetes são constituídas por uma estrutura transparente homogénea de PS (poliestireno), sendo que, para as amostras, se adiciona uma estrutura de PLA (poliácido láctico) no seu interior. Estas estruturas são construídas através da montagem de várias peças de PLA, impressas em 3D, por uma ordem sequencial e coladas com a ajuda de clorofórmio. O *design* das mesmas está associado ao facto de minimizar a quantidade de amostra necessário para fazer aquisições, garantindo volume

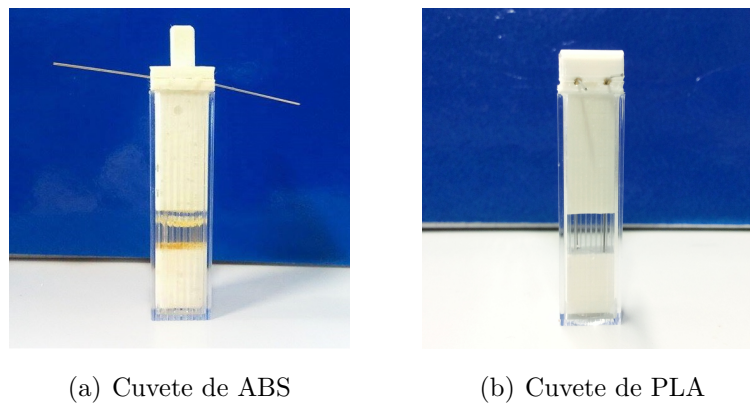
suficiente para que não exista interferência nos métodos utilizados.

A estrutura alberga cerca de 1 mL de amostra no espaço destinada à mesma. Com isto pretende-se ter o menor volume possível aquando das amostras sanguíneas, por forma a que o teste seja pouco invasivo.

Inicialmente, o material do interior das cuvetes era constituído por ABS (acrilonitrila butadieno estireno), uma vez que este material apresenta boa resistência térmica (*figura 3.9 - a*). No entanto, o PLA apresenta melhores propriedades mecânicas, tendo sido usado como substituto (*figura 3.9 - b*). Apesar de não haver intenção em reutilizar as cuvetes aquando das aquisições com sangue, numa fase de testes é imperativo o uso de um material que minimize as infiltrações e que possibilite várias aquisições em alturas diferentes, por forma a analisar parâmetros como a repetibilidade.

São também utilizados fios ortodônticos (constituídos por aço inoxidável) que servem de elétrodos e, desta forma, possibilitam a criação de um campo elétrico para as aquisições. Os elétrodos vão ficar embebidos na amostra que se encontra sob a influência de um campo magnético constante (no caso do método de impedância) ou variável (no método de análise de transmissão magneto-ótica).

Por uma questão prática e de *design*, os elétrodos das novas cuvetes ficam orientados para a frente por forma a estar direcionados com o local de conexão ao circuito para aquisições no método de impedância.



**Figura 3.9:** Versões das cuvetes utilizadas ao longo do projeto

### Objetos de teste

As amostras utilizadas foram variando ao longo do tempo, de acordo com a propriedade que se pretendia estudar. Contudo, todas elas estão associadas ao objetivo

final: identificar a presença do parasita da malária no sangue infetado.

Assim sendo, segue-se uma descrição sucinta da importância de cada uma das amostras.

- **Águas** - proporciona a observação das variações que ocorrem de acordo com o valor de pH. A água destilada é utilizada como meio de calibração para posteriores testes.
- **Groselha** - possibilita obter uma maior aproximação quanto aos resultados óticos, uma vez que se aproxima da coloração do sangue.
- **Leite** - permite verificar a influência da consistência e opacidade da amostra no resultado dos testes efetuados.
- **Hemozoína Sintética** - propicia a simulação da presença de malária nas amostras, nomeadamente as propriedades magnéticas. A HzS é fabricada num laboratório [49].



**Figura 3.10:** Hemozoína Sintética (HzS) no estado sólido [49]

- **Hemoglobina Ferrosa** - mimetiza as características sanguíneas que influenciam os testes a serem efetuados, conferindo propriedades magnéticas [50].



**Figura 3.11:** Hemoglobina  $A_0$  ferrosa (Hb) estabilizada sob a forma de pó liofilizado [50]

Tanto a Hb como a H<sub>2</sub>S necessitam de uma preparação antes da sua utilização, uma vez que se encontram no estado sólido, por forma a ficarem diluída e em suspensão coloidal, respetivamente. Para tal, foi seguido o protocolo que se encontra no *Apêndice B* e parcialmente em [51]. A preparação é feita através da mistura de Hb (para simular amostra saudável) ou H<sub>2</sub>S (para simular amostra infetada) com PBS. Esta solução de pH 7.4 é constituída por cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfatos e maioritariamente água, aproximando-se às propriedades do corpo humano [52].

## 3.2 Métodos

Os testes realizados tiveram por base a técnica EIE e ATMO, alternadamente. Para tal, faz-se uso da interface previamente criada no *Matlab*<sup>®</sup> - GUI - que possibilita o controlo do dispositivo. Desta forma, o utilizador pode selecionar as características desejadas para a aquisição de dados nos respetivos métodos.

Após dar início à aquisição de dados, escolhe-se o tipo de teste que se pretende efetuar.

### 3.2.1 Espectroscopia de Impedância Elétrica

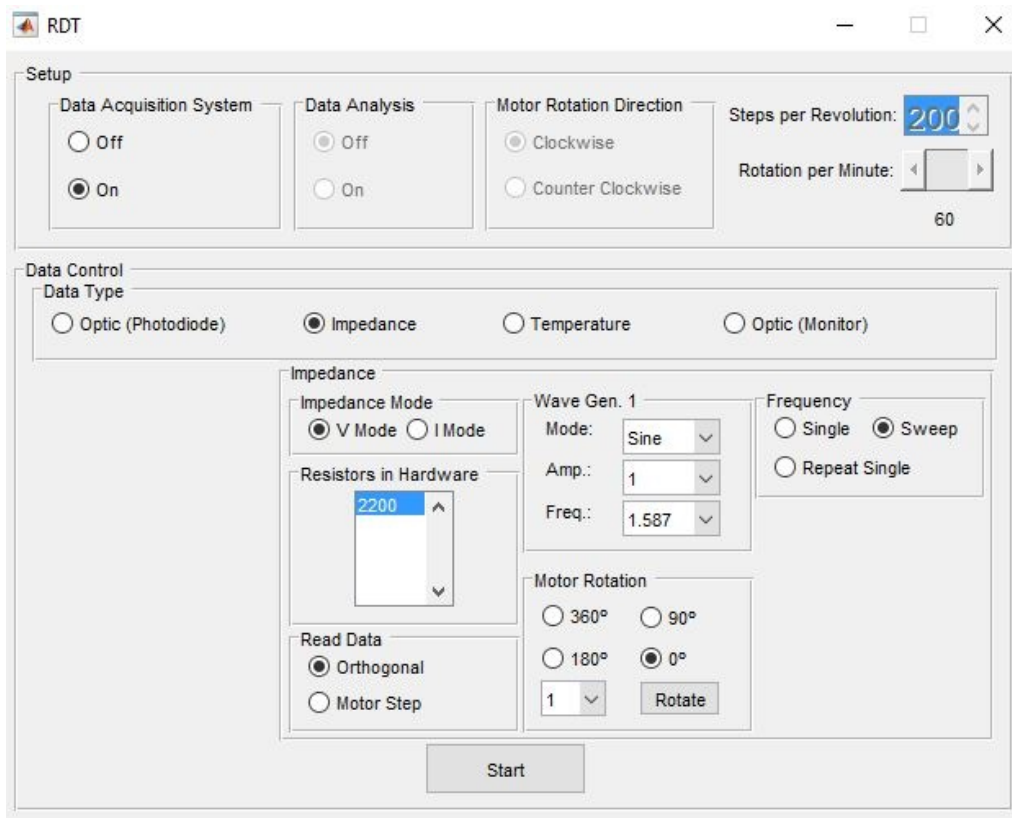
Para dar início aos testes no modo de impedância, selecionam-se os parâmetros indicados na *figura 3.12*.

Inicialmente efetuaram-se aquisições para cada um dos modos de impedância. Como se verificou melhores resultados para o modo de tensão constante (denominado por

modo V), optou-se por realizar testes apenas neste modo daí em diante.

De notar que o modo selecionado no *switch* existente do PCB deve estar de acordo com a opção selecionada no GUI para que realmente faça o circuito pretendido.

Existia também uma lista de resistências internas (tal como indicado no esquemático do circuito de impedância) que foi reduzida a uma resistência constante, algo que será explicado no capítulo seguinte.



**Figura 3.12:** Interface utilizada aquando da aquisição de dados no método de Impedância

As aquisições no método de impedância são efetuadas com a metodologia *Sweep Standard*. Esta usa uma lista de frequências que varia de 1 Hz a 1 MHz e calcula o módulo de impedância, fase e diagrama de Cole para cada uma delas.

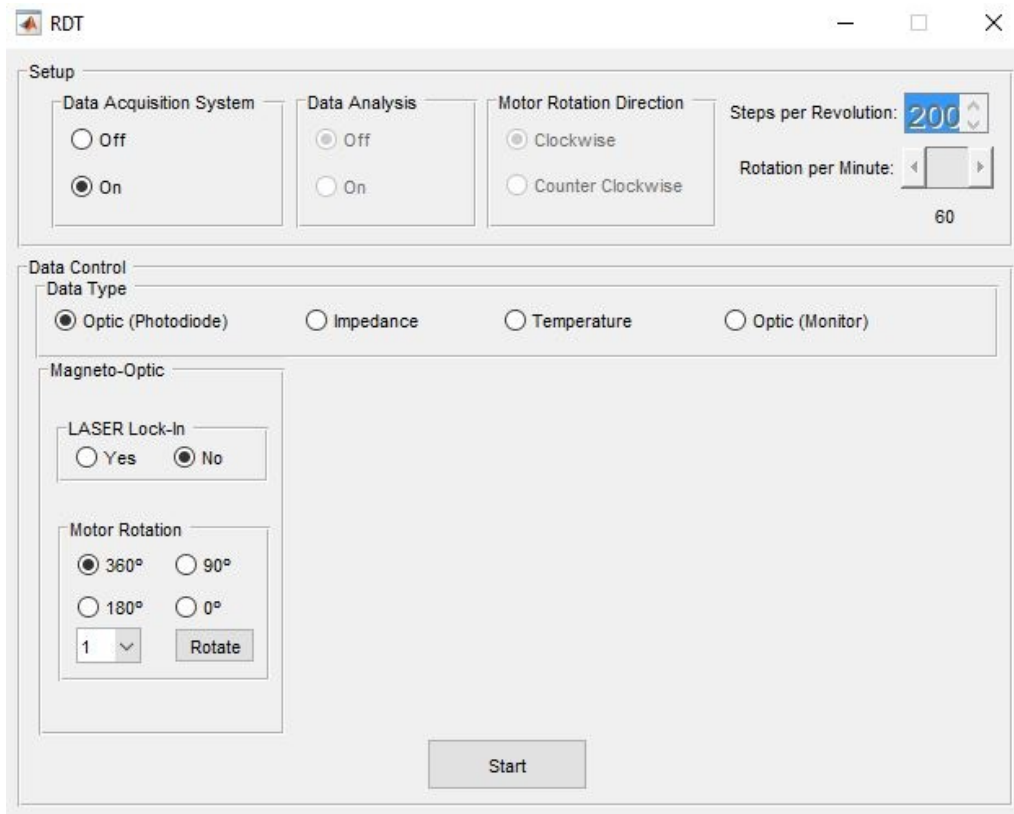
Por fim, não é utilizada rotação do motor, uma vez que os resultados obtidos foram coerentes com o *Halbach* estático, não adicionando informação pertinente.

O cálculo do módulo de impedância permite aferir a variação do mesmo de acordo com as diferentes amostras. Por outro lado, o cálculo da fase está ajustado para que os ângulos apresentados sejam sempre positivos, o que não corresponde à realidade pois ao ocorrer um atraso temporal do sinal de saída relativamente ao sinal de

entrada levaria à representação de um ângulo negativo. Por último, o diagrama de Cole permite perceber qual a capacidade do material em conduzir corrente elétrica.

### 3.2.2 Análise de Transmissão Magneto-Ótica

As aquisições no método de análise de transmissão magneto-ótica são feitas sem *lock-in* e com rotação de 360 graus (*figura 3.13*). Desta forma, é calculada a amplitude média da luz medida enquanto o *Halbach* efetua a rotação.



**Figura 3.13:** Interface utilizada aquando da aquisição de dados no método de ATMO

A representação gráfica reproduz a média da amplitude calculada a cada 15 graus de rotação, havendo um espaço temporal de 5 segundos entre aquisições para permitir o realinhamento dos cristais de hemozoína [13, 53]. Desta forma, mantiveram-se estas condições para todo o tipo de amostras que foi utilizado.





## Resultados e Discussão

Selecionaram-se os resultados mais relevantes para o estudo em questão, de acordo com o diferente tipo de amostras utilizado.

No método de impedância, a representação em escala logarítmica serve para evidenciar as discrepâncias nos resultados, algo que não se torna tão visível aquando da escala linear.

Quanto à análise de transmissão magneto-ótica, é de notar que este teste não é útil para todo o tipo de amostras, nomeadamente líquidos transparentes.

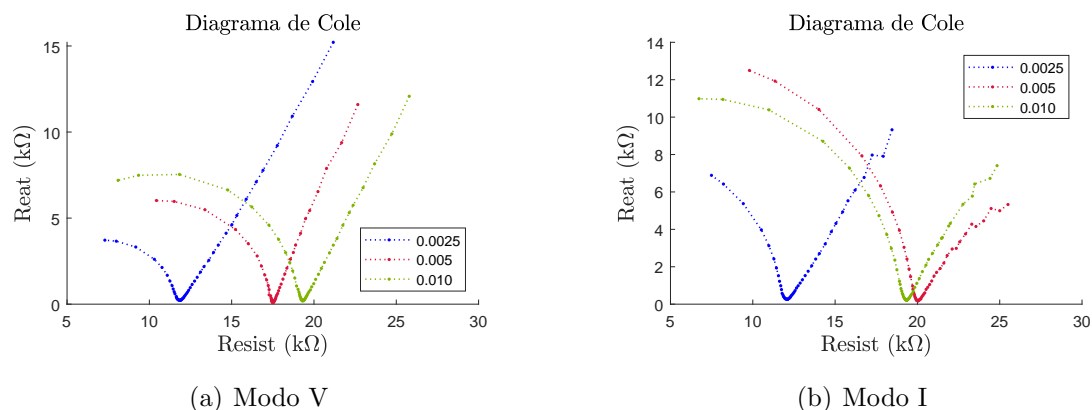
### 4.1 Ajuste de parâmetros

#### 4.1.1 Seleção do modo

Para o objetivo em questão, é mais importante garantir que não exista dispersão nas frequências mais baixas por forma a conseguir discriminar os resultados. Tendo isso em vista, comparou-se os dois modos (I e V).

Concluiu-se que, aquando do modo V, há um comportamento mais linear nas frequências mais baixas para as diferentes concentrações de groselha, algo que não se verifica no modo I (*figura 4.1*).

Posto isto, torna-se mais interessante explorar as diferentes amostras no modo V, tendo sido este o selecionado daqui em diante.



**Figura 4.1:** Diagrama de Cole de amostras de groselha em cada um dos modos

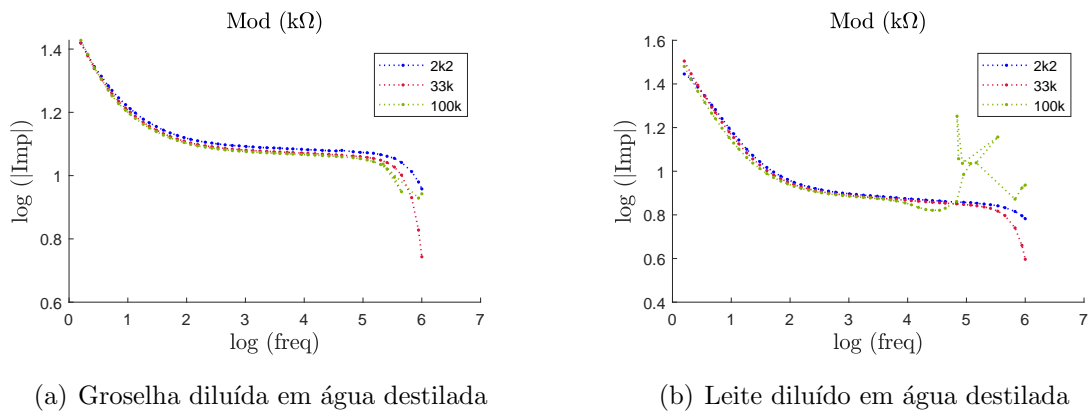
### 4.1.2 Seleção da resistência interna

Procurou-se fixar o valor da resistência interna, por forma a adquirir resultados constantes aquando das mesmas condições, bem como garantir a não saturação das respostas. As resistências disponíveis encontram-se na *tabela 4.3* do capítulo anterior.

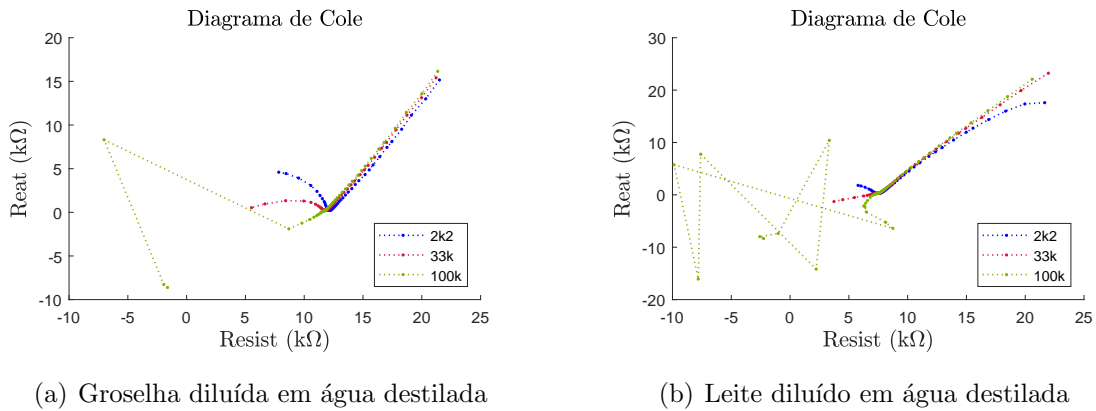
Assim sendo, efetuaram-se dois tipos de testes: um com groselha e outro com leite Grosso, ambos diluídos em água desmineralizada. Os resultados apresentados são para  $5 \mu\text{L}$  de amostra diluída em 1 mL de água, existindo coerência com testes efetuados com outras diluições (nomeadamente  $2.5 \mu\text{L}$  e  $10 \mu\text{L}$ ).

Em qualquer um dos tipos de amostra analisado, verifica-se que, aquando da seleção de uma resistência mais baixa ( $2.2\text{k}\Omega$ ), os gráficos apresentam uma deflexão final mais suave no módulo de impedância, bem como maior aproximação à semi-circunferência no diagrama de Cole, como se comprova nas *figuras 4.2* e *4.3*.

De realçar também que, aquando da representação do módulo de impedância para uma mesma concentração, este é tanto maior quanto menor for o valor da resistência interna associada.



**Figura 4.2:** Módulo de impedância de amostras de a) groselha e b) leite Grosso para diferentes resistências



**Figura 4.3:** Diagrama de Cole de amostras de a) groselha e b) leite para diferentes resistências

Para ambos os casos, constatou-se que os resultados são coerentes para resistências menores, o que comprova que a escolha da resistência interna de  $2.2\text{k}\Omega$  é adequada para qualquer um dos tipos de amostra.

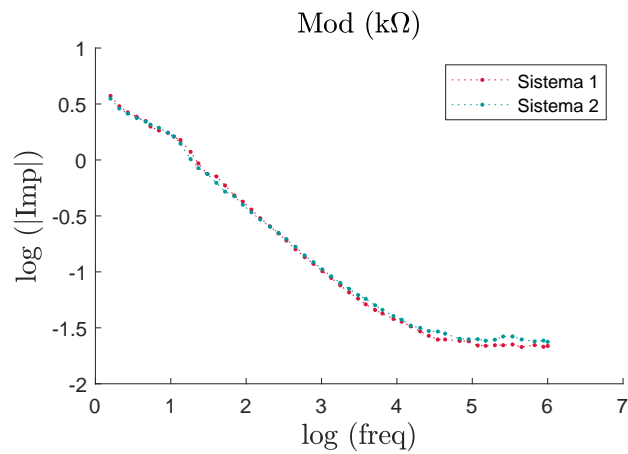
### 4.1.3 Comparação de protótipos

Inicialmente, existiam dois protótipos disponíveis para fazer testes utilizando cada uma das técnicas. Para averiguar a coerência de resultados entre os protótipos, foram feitas aquisições com a mesma amostra em ambos. Escolheu-se usar o PBS, uma vez que este tem propriedades semelhantes às do corpo humano. Os resultados obtidos encontram-se representados na *figura 4.4*, onde se comprova a semelhança dos mesmos entre os protótipos. Na legenda dos gráficos, Sistema 1 e Sistema 2 referem-se, respetivamente, ao protótipo 1 e protótipo 2, designação usada apenas

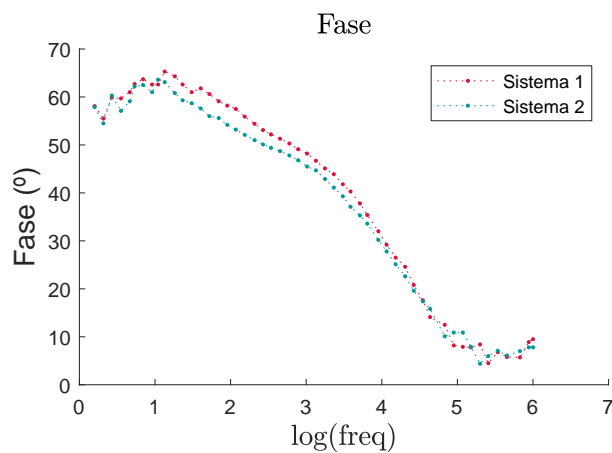
por forma a distinguir qual o protótipo utilizado em cada aquisição e poder compará-los. As oscilações verificadas podem ser associadas a algum tipo de ruído, tendo sido desprezadas.

Pode-se concluir, com base na literatura existente sobre a impedância do PBS, que os resultados obtidos - tanto para o módulo como para a fase - são coerentes com a mesma [54]. Isto permite validar o protótipo utilizado, ainda que com algum ruído associado. As diferenças que se verificam podem também estar associadas ao tipo de circuito equivalente que é considerado para as amostras.

Foram feitas também aquisições com outros tipos de amostra, tendo-se demonstrado a conformidade dos protótipos (*figura 4.5*).

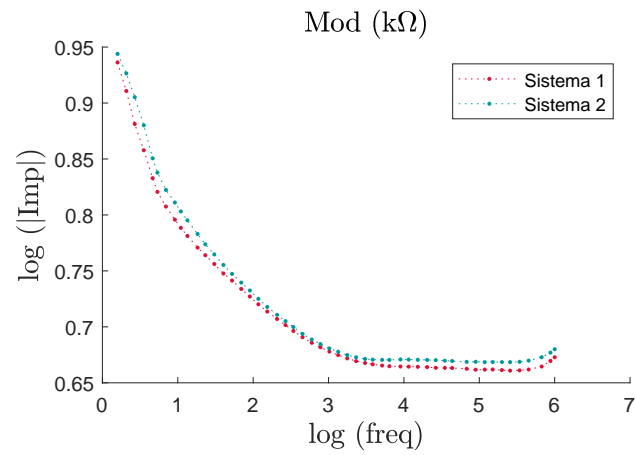


(a) Módulo

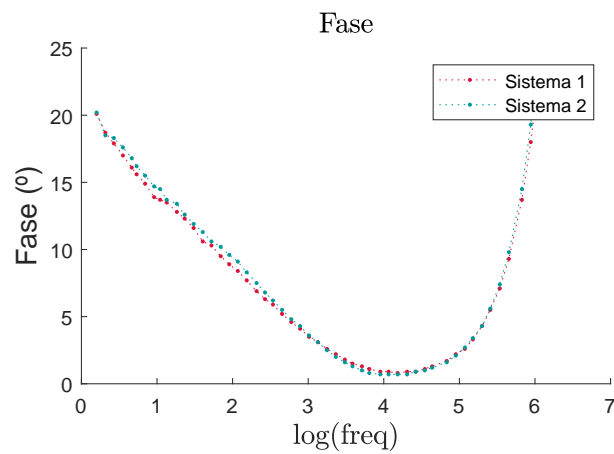


(b) Fase

**Figura 4.4:** Impedância do protótipo 1 (a magenta) e do protótipo 2 (a azul) usando PBS



(a) Módulo



(b) Fase

**Figura 4.5:** Impedância do Sistema 1 (a magenta) e do Sistema 2 (a azul) usando groselha

Posto isto, daqui para a frente as aquisições foram todas efetuadas usando o mesmo sistema.

## 4.2 Resultados preliminares

### 4.2.1 Diferentes tipos de amostras

#### Águas

Começou-se por analisar diferentes tipos de água, com vista a estabelecer um padrão entre a concentração de iões e os valores de impedância.

Após testar a repetibilidade das amostras, isto é, várias aquisições com as mesmas condições, concluiu-se que esta evidência está diretamente relacionada com a concentração de iões que as águas possuem em comum. A partir dos dados adquiridos, é possível concluir que a água com maior concentração de iões (Vimeiro Original) é a que corresponde ao menor valor de impedância e maior pH (*tabela 4.1*). No entanto, esta conclusão pode não ser tão linear como parece, uma vez que só se está a ter em consideração a concentração de iões que têm em comum, podendo contudo existir influência dos restantes iões que não se encontram presentes em todos os tipos de água analisados.

De notar que o soro fisiológico e a água desmineralizada aparecem como líquidos de controlo. No entanto, torna-se evidente que a água desmineralizada, ao não possuir praticamente nenhuns iões, será a que apresenta maior impedância.

**Tabela 4.1:** Tipos de líquidos utilizados, o seu pH e qual o valor máximo médio do respetivo módulo de impedância

tipo de líquido	pH	impedância (k $\Omega$ )
soro fisiológico	-	26
Vimeiro Original	7.3	33
Evian	7.2	41
Pingo Doce	5.7	52
Vitalis	4.7	68
desmineralizada	-	75

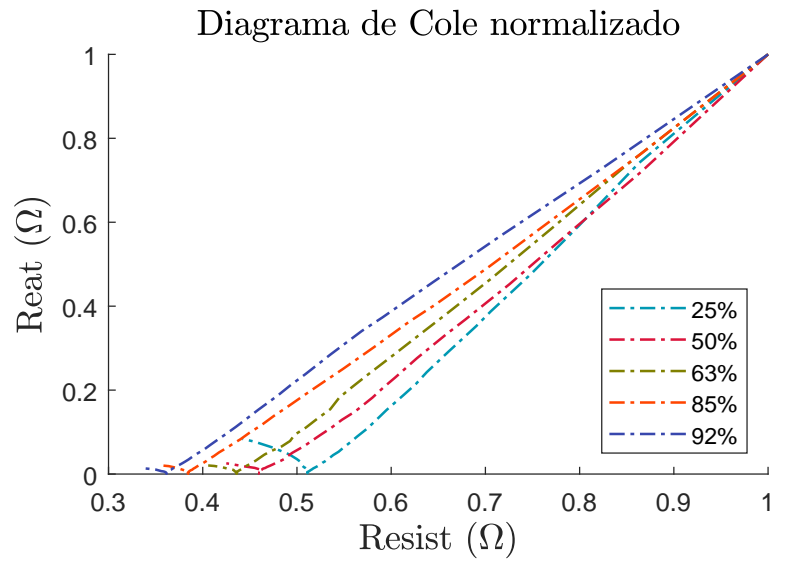
## Groselha

A groselha foi utilizada apenas com o intuito de mimetizar a cor do sangue, podendo ter sido utilizado qualquer outro líquido que possuísse essa mesma coloração.

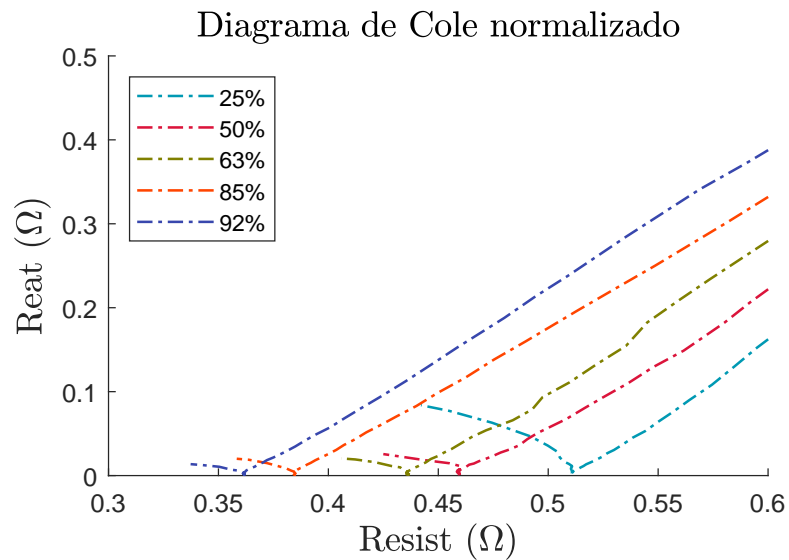
Posto isto, foram feitas diluições de groselha com água destilada, por forma a obter-se diferentes concentrações. Verifica-se, pelo diagrama de Cole, que existe uma relação entre as concentrações de groselha (*figura 4.6*).

Verifica-se que a resistência é tanto maior quanto menor for o valor da concentração da amostra. Por outro lado, a parte associada à formação do semi-círculo característico do diagrama de Cole é mais definida para menor concentração, havendo maior influência da reatância.

De notar que se iterou este processo, validando a repetibilidade dos resultados.



(a)

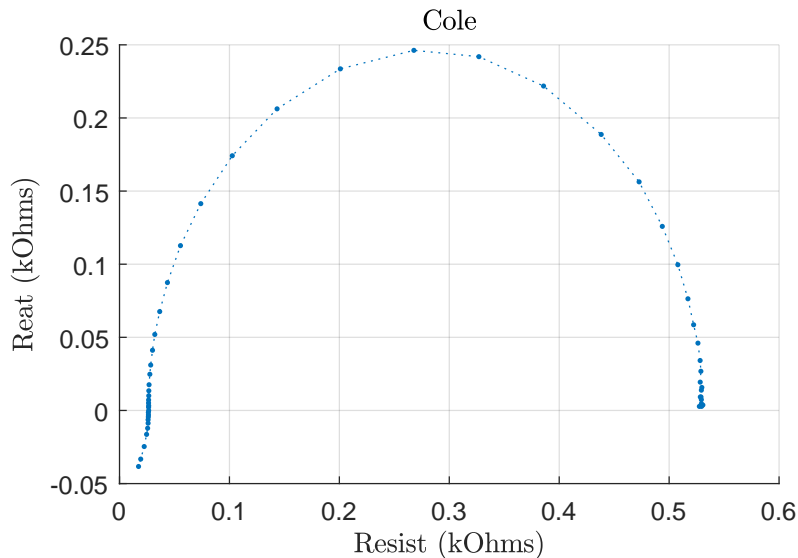


(b)

**Figura 4.6:** Comparação entre as diferentes concentrações de groselha, onde a) normalizado e b) amplificado

## 4.2.2 Circuito RC

Por forma a avaliar o comportamento do diagrama de Cole, testou-se ligar um circuito RC (com uma resistência e um condensador) em paralelo e avaliar o resultado no modo de impedância (*figura 4.7*).



**Figura 4.7:** Diagrama de Cole do circuito RC em paralelo

O resultado vai de encontro ao que existe na literatura para o diagrama de Cole, ainda que apresente um artefacto semelhante ao exemplo dado no caso da *figura 2.4 - E* [26]. Desta forma, pode-se concluir que o circuito base das amostras é semelhante ao utilizado neste teste. Para além disso, mesmo neste caso simplista, já se verifica a existência de algum tipo de erro desconhecido, ainda que praticamente insignificante.

### 4.2.3 Elemento de Fase Constante (CPE)

Com o intuito de perceber melhor a variação que ocorre tanto no modo V como no modo I, bem como verificar se a atribuição de cada um dos modos era coerente com os dados adquiridos, fez-se uma escala de resistências. Esta escala consiste em usar uma carga conhecida para  $R_2$  em vez de ser um líquido (onde a sua carga era desconhecida), sabendo assim, à priori, qual o resultado que é esperado obter-se.

Para o efeito desejado, utilizaram-se as resistências presentes na *tabela 4.2*.

Optou-se por usar a mesma resistência  $R_1$  tanto para o modo V como para o modo I, uma vez que não se verificou saturação em nenhum dos modos. Desta forma, tornou-se também possível fazer uma comparação de resultados muito mais fidedigna.



**Tabela 4.2:** Resistência  $R_1$  constante para as diferentes resistências  $R_2$ 

$R_1$ ( $\Omega$ )	$R_2$ ( $\Omega$ )
2200	470
	1200
	3300
	4700
	5600
	8200
	10000
	12000
	14900
	18500

Concluiu-se que, ao usar resistências fixas em vez de uma carga desconhecida, para qualquer um dos modos, não houve variação das amplitudes da tensão de saída ao longo do tempo. Posto isto, associou-se esta variação ao facto dos líquidos possuírem CPE, algo inerente a componentes biológicos.

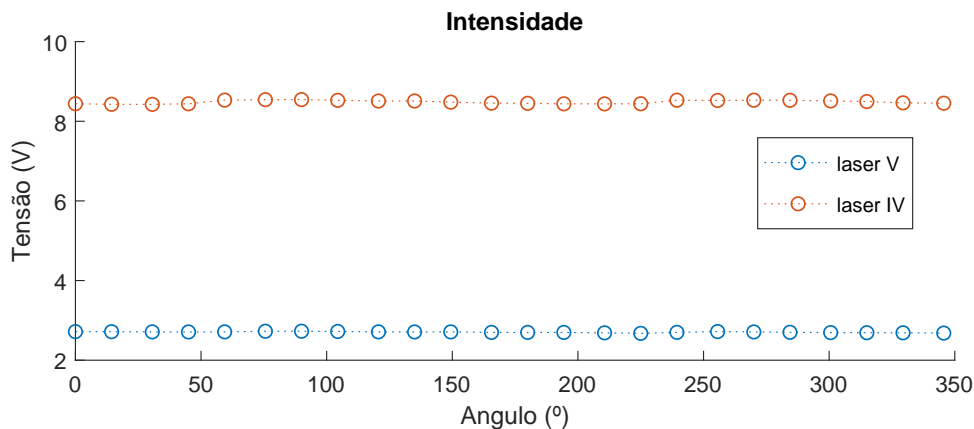
#### 4.2.4 Laser vermelho e laser infravermelho

De forma a verificar qual a capacidade de discriminação entre amostras, comparou-se os resultados obtidos com o laser vermelho com os do laser infravermelho.

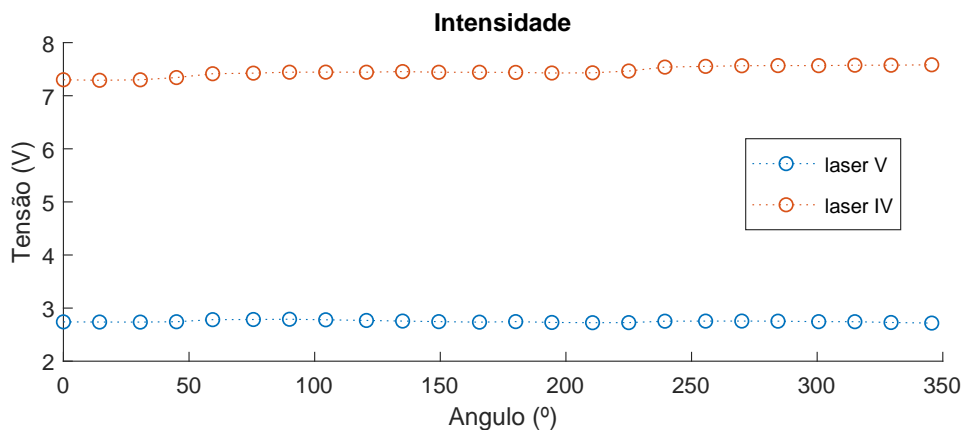
De realçar que os resultados gráficos para o método magneto-ótico apresentam o ângulo em função da tensão. Ora, uma vez que a intensidade luminosa pode ser dada pela corrente medida, e sendo o valor da resistência constante em todas as aquisições, o valor de tensão obtido vai ser diretamente proporcional à intensidade luminosa, permitindo desta forma retirar conclusões.

Verifica-se que o laser infravermelho apresenta maior sensibilidade para pequenas diferenças de concentração - enquanto o laser vermelho possui valores aproximadamente iguais para duas concentrações de hemozoína distintas, o laser infravermelho apresenta maior distinção entre as mesmas.

Por outro lado, existe maior transmissão de luz aquando da diminuição de hemoglobina (aumento da hemozoína) - comparando a *figura 4.8* com a *figura 4.9*.



**Figura 4.8:** Comparação entre o laser vermelho (a azul) e o laser infravermelho (a laranja) para uma concentração de  $0.2\mu\text{L HzS}$



**Figura 4.9:** Comparação entre o laser vermelho (a azul) e o laser infravermelho (a laranja) para uma concentração de  $0.5\mu\text{L HzS}$

Estudos efetuados comprovam que, aquando da comparação do comprimento de onda a que emite o laser infravermelho com o do laser vermelho, a distinção entre amostras saudáveis e infetadas é mais diferenciada no laser vermelho (aproximadamente a  $660\text{nm}$ ) [55]. Isto verifica-se tanto na fase de anel como na de trofozoítos. Assim sendo, este é o laser mais apropriado para a recolha dos dados, sendo o mais explorado daqui em diante.

#### 4.2.5 Independência da temperatura

Nas aquisições com diferentes concentrações de groselha foi possível concluir que a impedância é muito pouco dependente da temperatura, uma vez que, para distintas temperaturas, se obteve valores semelhantes de impedância.

Para além disso, pode-se também deduzir, a partir dos resultados obtidos, qual a sensibilidade associada à temperatura. Ora, após variadas aquisições, conclui-se que a maior variação foi de  $0.05 \text{ V}/^\circ\text{C}$ . Assim sendo, considera-se que o aparelho apresenta uma boa sensibilidade.

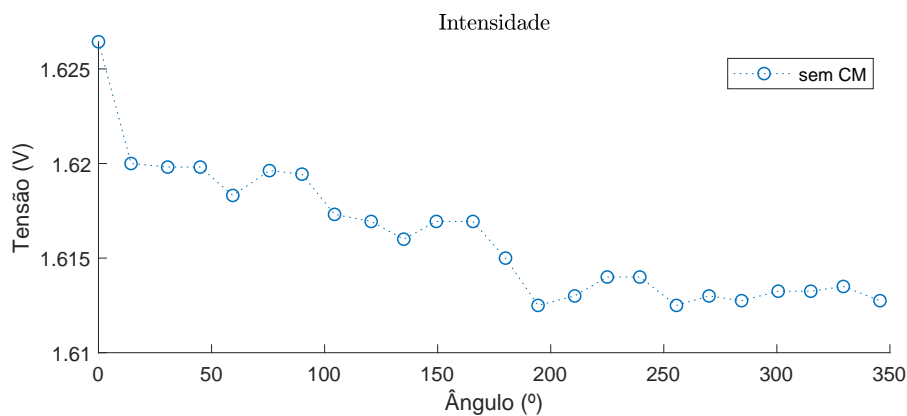
Como os testes foram feitos numa sala com ambiente condicionado, a variação da temperatura não influenciou, de forma significativa, os resultados.

#### **4.2.6 Influência do campo magnético (CM)**

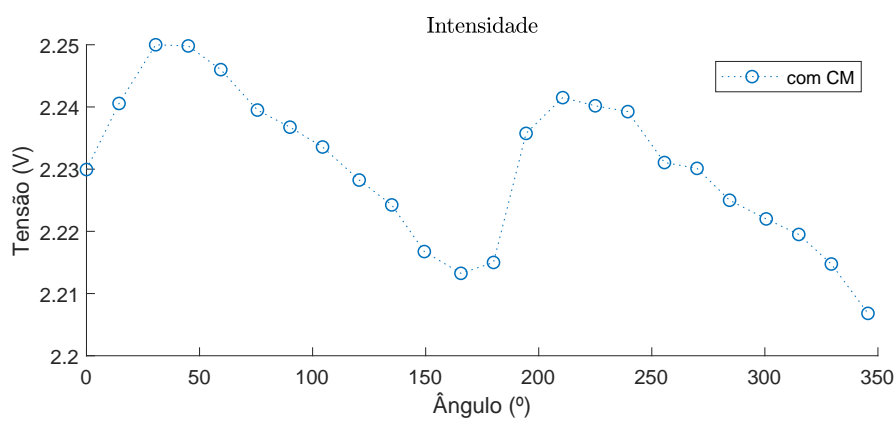
Seguidamente, efetuaram-se testes com o intuito de diferenciar o efeito do campo magnético. Como tal, improvisou-se um sistema fora da influência do mesmo, garantindo apenas o alinhamento do laser com o fotodíodo monitor, seguido da exposição ao campo magnético. Ambos os testes foram efetuados com uma cuvette vazia entre as duas placas de PCB, para garantir que a influência não seria provocada pela amostra escolhida. Os resultados obtidos encontram-se representados na *figura 4.10*.

Aquando da inexistência de campo magnético, a tensão não varia com a rotação do *Halbach*, estando susceptível à luz ambiente e às variações que isso implica (*figura 4.10 - a*)).

No entanto, a partir do momento que se coloca sob a influência do campo magnético (*figura 4.10 - b*)), verificam-se variações de acordo com o ângulo, onde existe uma periodicidade de 180 graus.



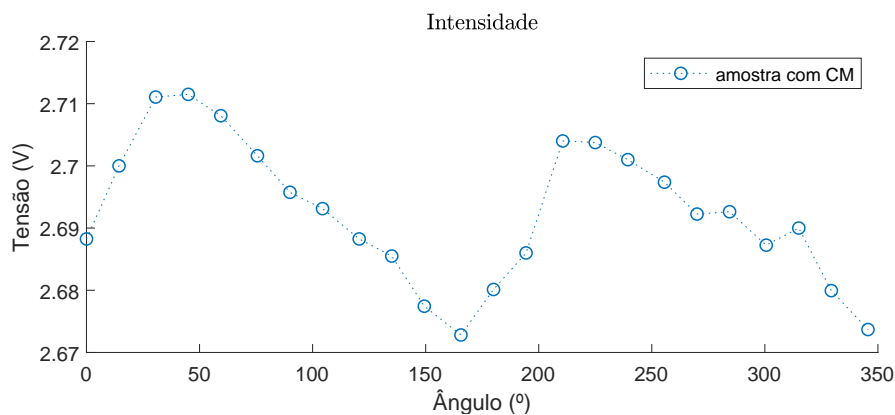
(a)



(b)

**Figura 4.10:** Aquisição no método ótico a) num sistema sem influência do campo magnético e b) num sistema sob a influência do mesmo

Em seguida, testou-se com uma amostra de água destilada sob influência do campo magnético, comprovando-se a periodicidade anteriormente verificada (*figura 4.11*).



**Figura 4.11:** Aquisição no método ótico com uma amostra de água destilada num sistema sob a influência do mesmo

## 4.3 Resultados finais

### 4.3.1 Amostras saudáveis

Os resultados obtidos para a amostra de 100% Hb correspondem à diluição 1 do protocolo presente no *Apêndice B*, ou seja, aquando da presença de uma gota de Hb para 1 ml de PBS. A preparação inicial da hemoglobina para se obter a concentração de 14,29 mg/ml<sup>5</sup> é apenas utilizada para a gota de Hb.

Tendo em conta que a composição sanguínea entre indivíduos pode apresentar variações, efetuaram-se testes com diferentes concentrações de hemoglobina com vista a simular essas mesmas discrepâncias.

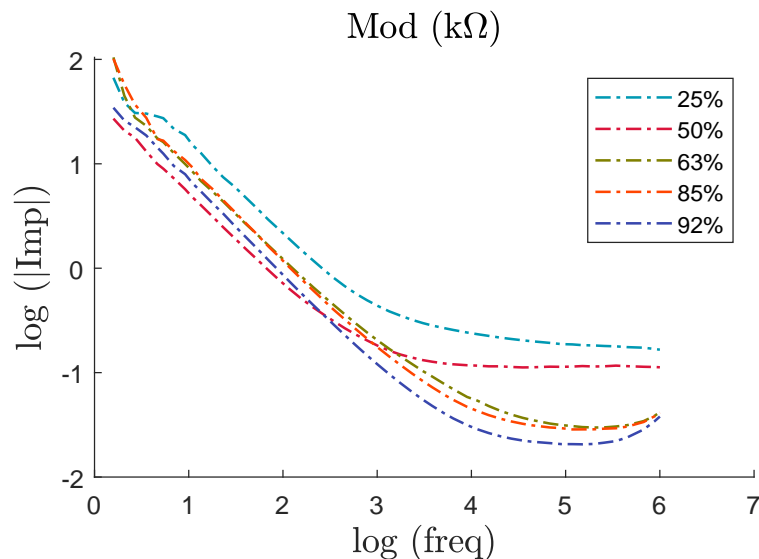
Como se verificou a existência de saturação, houve necessidade de reajustar a resistência interna. Este tipo de resposta é justificado pela mudança do tipo de amostra onde, pelo cálculo associado ao amplificador inversor, se verifica que a resistência desta amostra é superior às testadas até então. Assim, o  $V_{out}$  aumenta drasticamente, o que leva à saturação a partir de metade da lista de frequências.

Ora, uma vez que este tipo de amostra pretende simular o sangue, é importante garantir que o circuito seja ajustado de acordo com estes resultados. Uma vez que nenhuma das resistências disponibilizadas inicialmente no *switch* (SW4 presente na *figura 3.4*) assegurou bons resultados, daqui em diante a resistência foi alterada de 2.2k $\Omega$  para 510 $\Omega$ . A tensão de entrada foi alterada de 1 V para 0.1 V, por forma a conseguir obter-se valores aceitáveis.

Os resultados obtidos para diferentes concentrações de Hb estão representados na *figura 4.12*. Estes são bastante elucidativos, demonstrando que existe uma relação entre o módulo de impedância e a percentagem de hemoglobina presente na amostra, uma vez que o módulo é tanto maior quanto menor for a presença da mesma na segunda metade da escala de frequências. Numa fase inicial, verifica-se que a concentração de 50% apresenta um comportamento distinto das restantes concentrações, que mantêm uma relação entre elas.

---

<sup>5</sup>Este valor é o que está definido no protocolo do *Apêndice B*, sendo apenas um valor intermédio possível que está contido na gama normal de Hb (tanto de uma pessoa do sexo masculino como do sexo feminino), permitindo a generalização dos resultados.

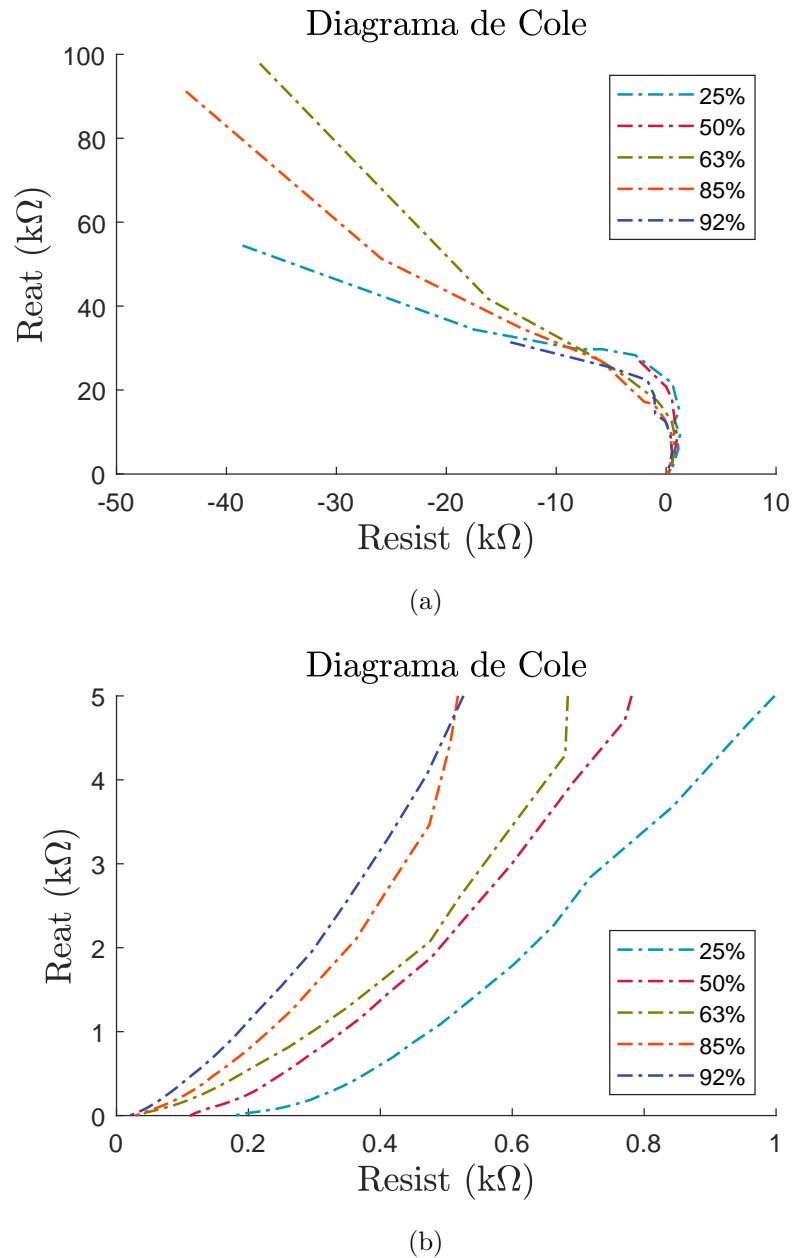


**Figura 4.12:** Módulo de Impedância das diferentes concentrações de hemoglobina diluídas em água destilada (azul claro - 25%; rosa - 50%; verde - 63%; laranja - 85%; azul escuro - 92%)

Verifica-se também uma coerência relativamente à concentração na análise do diagrama de Cole, onde se conclui que o gráfico se vai deslocando para a esquerda à medida que se aumenta a concentração da solução (*figura 4.13 - a*), sendo mais perceptível quando se faz *zoom* da área de interesse (*figura 4.13 - b*).

Ainda que com diferente escala, este comportamento vai de encontro ao que é esperado em amostras biológicas, como se pode ver em [28]. No entanto, apresenta uma curvatura oposta à obtida na literatura, obtendo-se valores negativos para a parte real da impedância. Ora, isto deve-se ao facto do ângulo nestas frequências estar em quadrantes em que o cosseno é negativo, o que se traduz, matematicamente, num resultado negativo para a equação da resistência. Fisicamente, reconhece-se estranheza neste fenómeno, uma vez que não se espera a existência de resistências negativas.

Visto que este comportamento começou a ocorrer aquando do uso de amostras biológicas (Hb ou a mistura desta com HzS), pode ser justificado com a presença de um CPE que não existia até então. Como referido anteriormente, este elemento ainda não se encontra bem definido, tornando a sua ação um pouco imprevisível e de difícil justificação. Contudo, pode-se facilmente concluir que ele existe e que este circuito não se resume ao apresentado em 4.2.2, sendo muito mais complexo e fugindo ao diagrama de Cole ideal (semi-círculo).



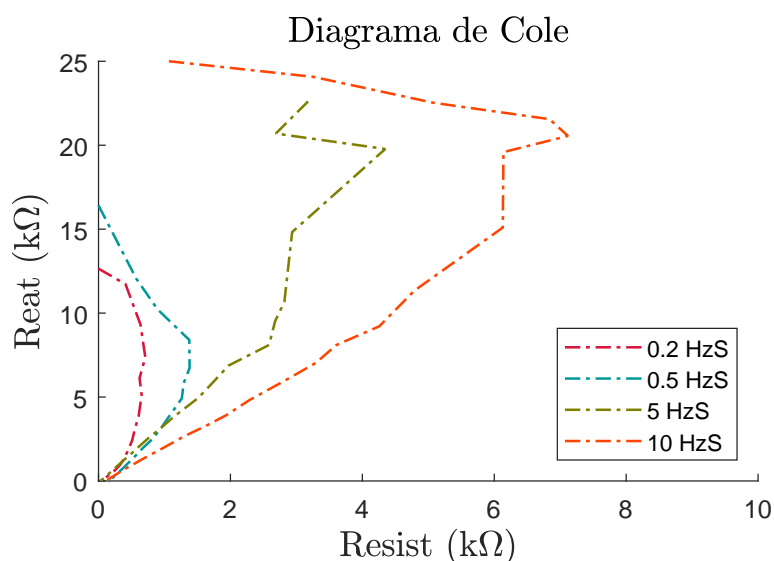
**Figura 4.13:** Diagrama de Cole de a) visão global e b) zoom na zona de maior interesse das diferentes concentrações de hemoglobina diluídas em água destilada (azul claro - 25%; rosa - 50%; verde - 63%; laranja - 85%; azul escuro - 92%)

### 4.3.2 Amostras infetadas

Na *figura 4.14* encontram-se representados os diferentes níveis de parasitemia, iniciando no nível 3 ( $0.2\mu\text{L}$ ), a partir do qual se começam a evidenciar os primeiros sintomas de uma pessoa infetada com malária, até ao nível 6 ( $10\mu\text{L}$ ), período no qual já é requerida uma transfusão sanguínea (ver *Apêndice B*). Nestes resultados

foi usada a HzS dissolvida em Hb para simular o sangue infetado.

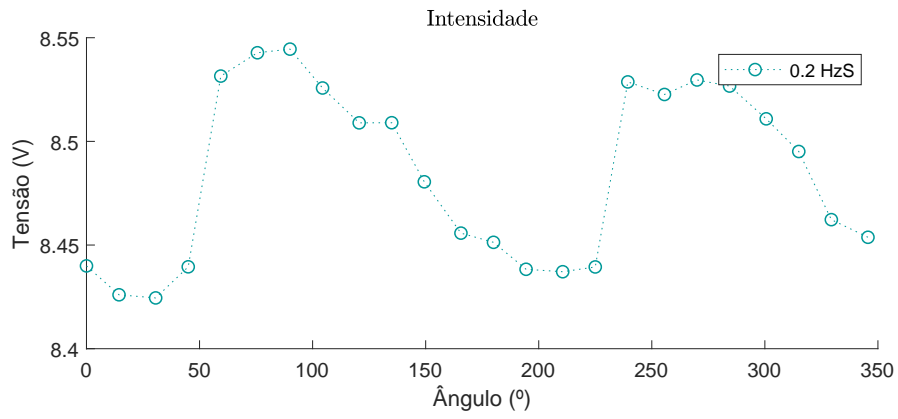
Torna-se também evidente que a impedância varia de acordo com o nível de infecção presente no sangue, o que é uma mais valia para distinguir os estágios da doença. Verifica-se que, para estados de parasitemia mais avançados (maior concentração de hemozoína no sangue), há maior variação da resistência de acordo com a frequência. Para além disso, existe um aumento da reatância com o aumento das frequências para qualquer uma das concentrações testadas. Aqui volta a verificar-se um comportamento semelhante ao obtido para diferentes concentrações de hemoglobina, onde existem valores negativos na parte real da impedância, ainda que não sejam representados. A justificação prende-se com o que foi referido anteriormente.



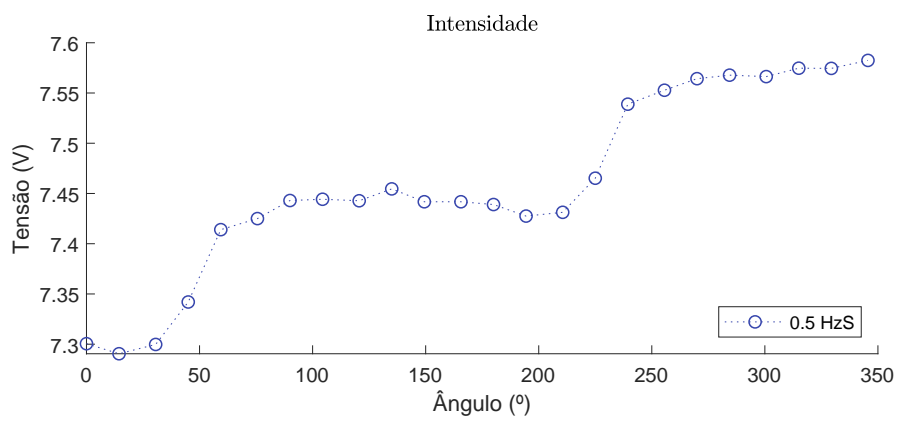
**Figura 4.14:** Diagrama de Cole das diferentes concentrações de hemozoína em amostras de hemoglobina (rosa -  $0.2\mu\text{L}$ ; azul -  $0.5\mu\text{L}$ ; verde -  $5\mu\text{L}$ ; laranja -  $10\mu\text{L}$  de HzS em 1mL de Hb)

Nos resultados para o método magneto-ótico verifica-se que a tensão diminui com o aumento da concentração de HzS na amostra, ou seja, quanto mais concentrada for a solução, menor a quantidade de luz que atravessa a amostra (*figura 4.15*). Para além disso, verifica-se a oscilação de acordo com o ângulo de rotação do *Halbach*. Ainda que na amostra de  $0.5\mu\text{L}$  de HzS o comportamento se encontre um pouco alterado face aos obtidos para as outras amostras, continua a existir dois momentos distintos onde há clara influência do campo magnético e do ângulo.

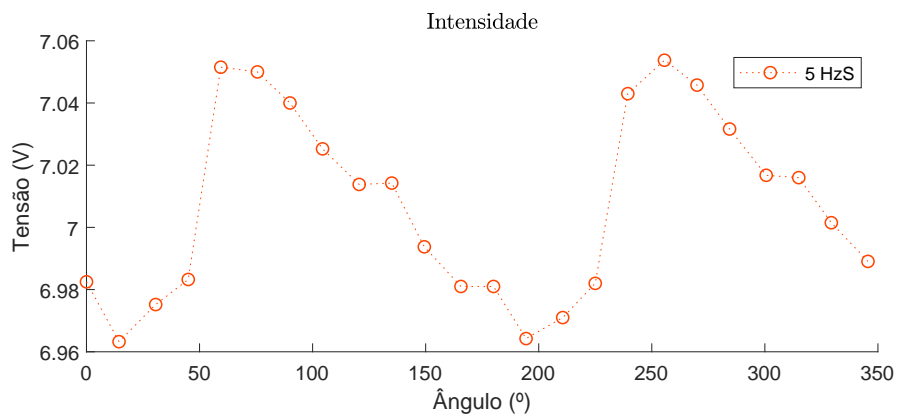




(a) 0.2 μL HzS em 1 mL de Hb



(b) 0.5 μL HzS em 1 mL de Hb



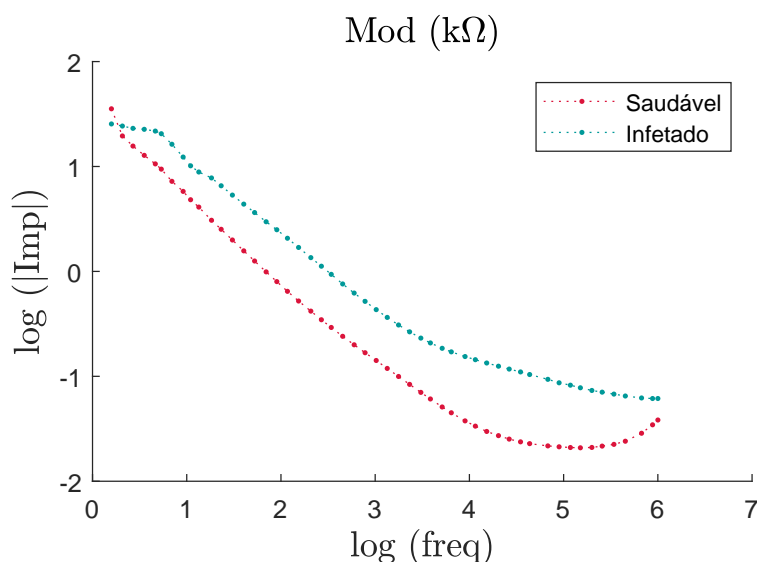
(c) 5 μL HzS em 1 mL de Hb

**Figura 4.15:** Intensidade da luz do laser que atravessa as amostras com diferentes concentrações de hemozina em amostras de hemoglobina

### 4.3.3 Distinção entre amostra saudável e infetada

Através das aquisições pelo método de impedância, conclui-se que o sistema é capaz de discriminar entre sangue de um indivíduo saudável (sem a presença de hemozoína) e o de um indivíduo infetado, havendo uma clara distinção entre os mesmos, como se pode verificar na *figura 4.16*.

Nas primeiras frequências da amostra infetada - associadas às primeiras aquisições - estas podem estar sob a influência do realinhamento dos cristais de hemozoína com o campo magnético, existindo alguns pontos desalinhados com o traçado global. O alinhamento mantém-se constante a partir daí, refletindo-se num comportamento mais coerente para a restante gama de frequências.



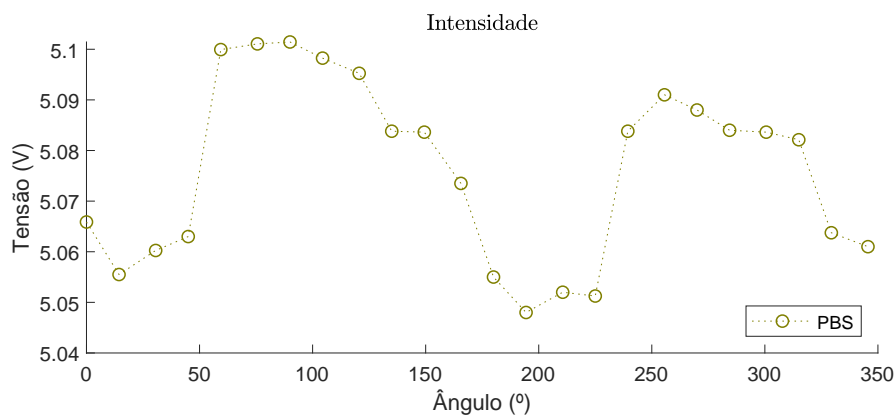
**Figura 4.16:** Módulo de impedância de duas amostras distintas: uma amostra que possui apenas Hb (indivíduo saudável, representado a magenta) e de uma infetada com HzS (indivíduo infetado, representado a azul).

Realça-se também o facto do módulo da impedância numa amostra de Hb ser menor ao longo da gama de frequências comparativamente à amostra com presença de HzS. Isto justifica-se através da degradação da hemoglobina, uma vez que ocorre libertação do grupo heme que se vai degradar em peróxido de hidrogénio e hemozoína [56]. Ora, a libertação do peróxido aumenta a concentração de iões  $H^+$  no meio, levando a uma diminuição do valor de pH e, conseqüentemente, ao aumento no valor de impedância.

Estes resultados estão de acordo com aquilo que é esperado para amostras biológicas. Nas baixas frequências, a corrente apenas passa em torno das células, havendo uma

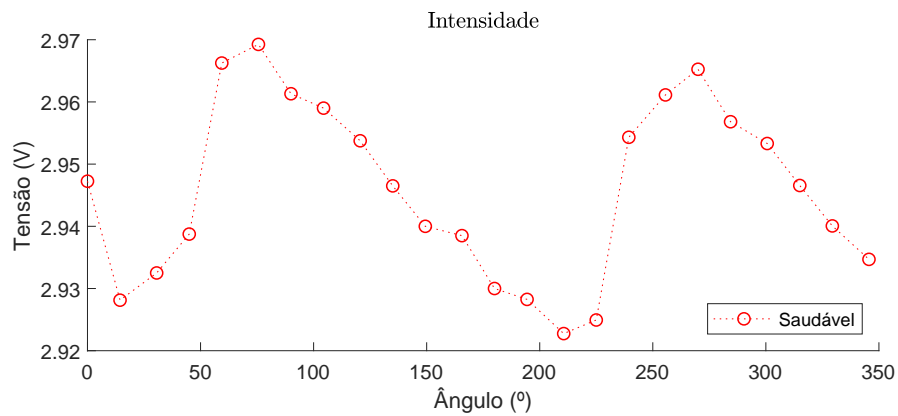
membrana a isolar o citoplasma. No entanto, quando se aumenta a frequência, a membrana torna-se mais condutora e a corrente passa através das células. Desta forma, as células tornam-se mais resistivas à passagem de corrente, ou seja, diminui o valor de impedância [54].

Quanto ao método magneto-ótico, começou-se por avaliar uma amostra de PBS, uma vez que esta mimetiza as propriedades do corpo humano, por forma a confirmar a variação com o ângulo. Os resultados obtidos na *figura 4.17* comprovam isso mesmo, mantendo-se a periodicidade.

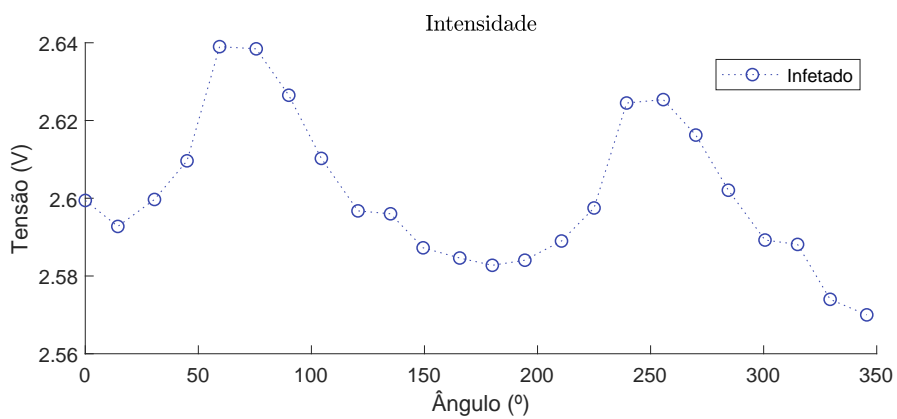


**Figura 4.17:** Intensidade da luz do laser para uma amostra de PBS

Quanto às amostras saudável e infetada, as intensidades de luz transmitidas são superiores na primeira face à segunda (*figura 4.18*). Visualmente, este resultado já seria expectável, uma vez que ao adicionar hemozoína à amostra esta escurece e, por isso, transmite menor quantidade de luz. Estas conclusões também foram obtidas em estudos presentes na literatura [55].



(a)



(b)

**Figura 4.18:** Intensidade da luz do laser para dois tipos de amostras: a) saudável e b) infectada

## Conclusões

Os estudos efetuados durante este projeto permitiram retirar algumas conclusões interessantes e úteis para o objetivo final: detetar o parasita da Malária numa pequena amostra sanguínea.

Comprova-se que o sistema é capaz de distinguir entre uma amostra saudável e infetada, bem como diferenciar níveis de parasitemia. Estas conclusões são uma mais valia pois permitem identificar, numa amostra de 1 mL de sangue, se existe ou não infeção do mesmo numa fase muito precoce, aquando da presença dos primeiros sintomas específicos da doença. Desta forma, reconhece-se a utilidade do protótipo enquanto teste de diagnóstico rápido para identificação da Malária. Contudo, é de realçar que os estudos quanto ao CPE privaram a interpretação física de alguns resultados.

Tendo tudo em consideração, conclui-se que o protótipo apresenta uma boa sensibilidade e resolve alguns problemas que ainda são predominantes, nomeadamente a nível de portabilidade, rapidez e custos. No entanto, continua a ser necessário a melhoria de certas características por forma a garantir melhores resultados.

### 5.1 Trabalho Futuro

1. A nível do design, é crucial garantir uma nova configuração que permita assegurar que os elétrodos não entram em contacto, quer na zona exposta como na que fica oculta pelo PLA. Desta forma, a construção da cuvete seria menos morosa e os resultados seriam, seguramente, mais consistentes entre amostras.
2. Elaborar uma metodologia que evite a formação de bolhas no líquido, permitindo adquirir resultados mais constantes.
3. Criar uma interface *user friendly* no protótipo propriamente dito em vez de correr programa no *Matlab*<sup>®</sup>, aprimorando a estética do mesmo.

## 5. Conclusões

---

4. Explorar um método que permita identificar níveis de parasitemia mais baixos, aquando da inexistência de sintomas.
5. Identificar os erros associados aos Diagramas de Cole de forma precisa, possibilitando a correção dos mesmos e melhor interpretação dos resultados.







# Bibliografia

- [1] W. H. Organization, “World malaria report 2017,” p. 4, 2017.
- [2] M. S. Hede and B. R. Knudsen, “The use of highly sensitive detection methods for eradication of,” *Ann Clin Cytol Pathol*, vol. 3, no. 8, p. 1084, 2017.
- [3] F. D. Krampa, Y. Aniweh, G. A. Awandare, and P. Kanyong, “Recent progress in the development of diagnostic tests for malaria,” *Diagnostics*, vol. 7, no. 3, p. 54, 2017.
- [4] A. P. Gomes, R. R. Vitorino, A. d. P. Costa, E. G. d. Mendonça, M. G. d. A. Oliveira, and R. Siqueira-Batista, “Severe plasmodium falciparum malaria,” *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, vol. 23, no. 3, pp. 358–369, 2011.
- [5] I. Silva, R. Lima, G. Minas, and S. O. Catarino, “Hemozoin and hemoglobin characterization by optical absorption towards a miniaturized spectrophotometric malaria diagnostic system,” in *Bioengineering (ENBENG), 2017 IEEE 5th Portuguese Meeting on*, pp. 1–4, IEEE, 2017.
- [6] S. E. Shokoples, M. Ndao, K. Kowalewska-Grochowska, and S. K. Yanow, “Multiplexed real-time pcr assay for discrimination of plasmodium species with improved sensitivity for mixed infections,” *Journal of clinical microbiology*, vol. 47, no. 4, pp. 975–980, 2009.
- [7] S. C. Murphy, J. P. Shott, S. Parikh, P. Etter, W. R. Prescott, and V. A. Stewart, “Malaria diagnostics in clinical trials,” *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol. 89, no. 5, pp. 824–839, 2013.
- [8] S. Kasetsirikul, J. Buranapong, W. Srituravanich, M. Kaewthamasorn, and A. Pimpin, “The development of malaria diagnostic techniques: a review of the approaches with focus on dielectrophoretic and magnetophoretic methods,” *Malaria journal*, vol. 15, no. 1, p. 358, 2016.
- [9] P. Chandrakasan, “Electric impedance microflow cytometry for characterization of cell disease states3,” *Lab Chip*, vol. 13, pp. 3903–3909, 2013.

- [10] A. F. Cowman, D. Berry, and J. Baum, “The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell,” *J Cell Biol*, vol. 198, no. 6, pp. 961–971, 2012.
- [11] J. Nam, H. Huang, H. Lim, C. Lim, and S. Shin, “Magnetic separation of malaria-infected red blood cells in various developmental stages,” *Analytical chemistry*, vol. 85, no. 15, pp. 7316–7323, 2013.
- [12] L. S. Garcia, “Malaria,” *Clinics in Laboratory Medicine*, vol. 30, no. 1, pp. 93 – 129, 2010. Emerging Pathogens.
- [13] S. Anjo, “The Electrical Impedance Spectroscopy Technique – 3 Case Studies in Chemical and Biological Materials,” 2016.
- [14] “LIBPhys - Laboratório de Instrumentação, Engenharia Biomédica e Física da Radiação.” <http://fisica.uc.pt/ax/investigacao/investigacao.php>, 2011.
- [15] Exatronic, “Exatronic - Innovation Insight.” <https://www.exatronic.pt/pt/>, 2016.
- [16] “PGD - Pedro Gomes Design Unipessoal, LDA.” <http://pedrogomesdesign.com/>, 2015.
- [17] “Matibabu.” <http://www.innovation4malaria.org/matibabu.html>, 2017.
- [18] V. Soulard, H. Bosson-Vanga, A. Lorthiois, C. Roucher, J.-F. Franetich, G. Zanghi, M. Bordessoulles, M. Tefit, M. Thellier, S. Morosan, *et al.*, “Plasmodium falciparum full life cycle and plasmodium ovale liver stages in humanized mice,” *Nature communications*, vol. 6, p. 7690, 2015.
- [19] S. Cho, S. Kim, Y. Kim, and Y. Park, “Optical imaging techniques for the study of malaria,” *Trends in biotechnology*, vol. 30, no. 2, pp. 71–79, 2012.
- [20] N. Bosschaart, G. J. Edelman, M. C. Aalders, T. G. van Leeuwen, and D. J. Faber, “A literature review and novel theoretical approach on the optical properties of whole blood,” *Lasers in medical science*, vol. 29, no. 2, pp. 453–479, 2014.
- [21] A. Butykai, A. Orbán, V. Kocsis, D. Szaller, S. Bordács, E. Tátrai-Szekeres, L. F. Kiss, A. Bóta, B. Vértessy, T. Zelles, *et al.*, “Malaria pigment crystals as magnetic micro-rotors: key for high-sensitivity diagnosis,” *Scientific reports*, vol. 3, p. 1431, 2013.

- 
- [22] Á. Orbán, Á. Butykai, A. Molnár, Z. Pröhle, G. Fülöp, T. Zelles, W. Forsyth, D. Hill, I. Müller, L. Schofield, *et al.*, “Evaluation of a novel magneto-optical method for the detection of malaria parasites,” *PloS one*, vol. 9, no. 5, p. e96981, 2014.
- [23] P. Electrochemistry, C. Elements, C. Equivalent, and C. Models, “Basics of electrochemical impedance spectroscopy,” *Appl Note AC*, vol. 286, pp. R491–7, 2010.
- [24] TechTarget, “Impedance.” <https://whatis.techtarget.com/definition/impedance>, 2018.
- [25] A. Szypłowska, A. Nakonieczna, A. Wilczek, B. Paszkowski, G. Solecki, and W. Skierucha, “Application of a coaxial-like sensor for impedance spectroscopy measurements of selected low-conductivity liquids,” *Sensors*, vol. 13, no. 10, pp. 13301–13317, 2013.
- [26] D. Ayllón, R. Gil-Pita, and F. Seoane, “Detection and classification of measurement errors in bioimpedance spectroscopy,” *PloS one*, vol. 11, no. 6, p. e0156522, 2016.
- [27] J. Hong, D. S. Yoon, S. K. Kim, T. S. Kim, S. Kim, E. Y. Pak, and K. No, “Ac frequency characteristics of coplanar impedance sensors as design parameters,” *Lab on a Chip*, vol. 5, no. 3, pp. 270–279, 2005.
- [28] C. Ribaut, K. Reybier, O. Reynes, J. Launay, A. Valentin, P. L. Fabre, and F. Nepveu, “Electrochemical impedance spectroscopy to study physiological changes affecting the red blood cell after invasion by malaria parasites,” *Bio-sensors and Bioelectronics*, vol. 24, no. 8, pp. 2721–2725, 2009.
- [29] Á. Orbán, M. Rebelo, P. Molnár, I. S. Albuquerque, A. Butykai, and I. Kézsmárki, “Efficient monitoring of the blood-stage infection in a malaria rodent model by the rotating-crystal magneto-optical method,” *Scientific reports*, vol. 6, p. 23218, 2016.
- [30] D. M. Newman, J. Heptinstall, R. J. Matelon, L. Savage, M. L. Wears, J. Beddow, M. Cox, H. D. Schallig, and P. F. Mens, “A magneto-optic route toward the in vivo diagnosis of malaria: preliminary results and preclinical trial data,” *Biophysical journal*, vol. 95, no. 2, pp. 994–1000, 2008.
- [31] G. Stephen, “Rapid malaria detection using the magneto-optical properties of the malaria pigment,” 2014.

- [32] M. W. Vogel, A. Giorni, V. Vegh, R. Pellicer-Guridi, and D. C. Reutens, “Rotatable small permanent magnet array for ultra-low field nuclear magnetic resonance instrumentation: A concept study,” *PloS one*, vol. 11, no. 6, p. e0157040, 2016.
- [33] H. Suzuki, M. Sato, A. Hanafi, Y. Itoi, S. Suzuki, and A. Ito, “Magnetic field performance of round layout linear halbach array using cylinder-shaped permanent magnets,” in *Linear Drives for Industry Applications (LDIA), 2017 11th International Symposium on*, pp. 1–2, IEEE, 2017.
- [34] Y.-J. Wang, C.-D. Chen, C.-K. Sung, and C. Li, “Natural frequency self-tuning energy harvester using a circular halbach array magnetic disk,” *Journal of Intelligent Material Systems and Structures*, vol. 23, no. 8, pp. 933–943, 2012.
- [35] B. Shen, J. Geng, C. Li, X. Zhang, L. Fu, H. Zhang, J. Ma, and T. Coombs, “Optimization study on the magnetic field of superconducting halbach array magnet,” *Physica C: Superconductivity and its Applications*, vol. 538, pp. 46–51, 2017.
- [36] C. Mahende, B. Ngasala, J. Lusingu, T.-S. Yong, P. Lushino, M. Lemnge, B. Mmbando, and Z. Premji, “Performance of rapid diagnostic test, blood-film microscopy and pcr for the diagnosis of malaria infection among febrile children from korogwe district, tanzania,” *Malaria journal*, vol. 15, no. 1, p. 391, 2016.
- [37] A. R. Cardoso, G. Cabral-Miranda, A. Reyes-Sandoval, M. F. Bachmann, and M. G. F. Sales, “Detecting circulating antibodies by controlled surface modification with specific target proteins: Application to malaria,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 91, pp. 833–841, 2017.
- [38] T. Grossman, E. Schwartz, J. Vainer, V. Agmon, Y. Glazer, D. Goldmann, and E. Marva, “Contribution of real-time pcr to plasmodium species identification and to clinical decisions: a nationwide study in a non-endemic setting,” *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 36, pp. 671–675, Apr 2017.
- [39] F. B. Tek, A. G. Dempster, and Í. Kale, “Parasite detection and identification for automated thin blood film malaria diagnosis,” *Computer vision and image understanding*, vol. 114, no. 1, pp. 21–32, 2010.
- [40] J. R. Macdonald and W. B. Johnson, “Fundamentals of impedance spectroscopy,” *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications, Second Edition*, pp. 1–26, 2005.

- 
- [41] G. Instruments, “Reference 3000.” <https://www.gamry.com/potentiostats/reference-3000/>, 2018.
- [42] G. Figueroa-Miranda, L. Feng, S. C.-C. Shiu, R. M. Dirkzwager, Y.-W. Cheung, J. A. Tanner, M. J. Schöning, A. Offenhäusser, and D. Mayer, “Aptamer-based electrochemical biosensor for highly sensitive and selective malaria detection with adjustable dynamic response range and reusability,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 255, pp. 235–243, 2018.
- [43] Farnell, “Datasheet stepping motor type Y129.” <https://datasheet.octopart.com/Y129-Astrosyn-datasheet-11981772.pdf>.
- [44] I. S. Technology, “Platinum temperature sensors.” [http://akizukidenshi.com/download/ds/ist/BTP\\_E1.0.pdf](http://akizukidenshi.com/download/ds/ist/BTP_E1.0.pdf).
- [45] L. Ferreira, “Técnicas laboratoriais de física.” [http://www.fis.uc.pt/data/20102011/apontamentos/apnt\\_5\\_10.pdf](http://www.fis.uc.pt/data/20102011/apontamentos/apnt_5_10.pdf), 2010.
- [46] I. Digilent, “Analog discovery 2 - reference manual.” [https://reference.digilentinc.com/\\_media/reference/instrumentation/analog-discovery-2/ad2\\_rm.pdf](https://reference.digilentinc.com/_media/reference/instrumentation/analog-discovery-2/ad2_rm.pdf), 2018.
- [47] Thorlabs, “Datasheet Laser Diode - HL6756MG.” <https://www.thorlabs.com/drawings/1ef9b722138f3180-91B8A31B-E616-4755-F9429AD47C56A190/HL6756MG-SpecSheet.pdf>, 2005.
- [48] Thorlabs, “Laser Diode Technical Data - L850P010.” <https://www.thorlabs.com/drawings/1ef9b722138f3180-91B8A31B-E616-4755-F9429AD47C56A190/L850P010-SpecSheet.pdf>, 2008.
- [49] InVivoGen, “Hemozoin - synthetic heme crystal.” <https://www.invivogen.com/hemozoin>.
- [50] Sigma-Aldrich, “Hemoglobin A0, ferrous stabilized human.” <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h0267?lang=pt&region=PT>.
- [51] M. Martins, “Malaria Diagnosis System Based On Electric Impedance Spectroscopy,” 2017.
- [52] F. BioReagents, “Phosphate Buffered Saline, 10x solution.” <https://www.fishersci.com/msds?productName=BP3991&gcqr=1>, 2010.
- [53] I. Sousa, “Development of a magneto-optic device for rapid detection of Malaria,” 2016.

- [54] K. N. U. G. Dona, J. Liu, Y. Qiang, E. Du, and A. Lau, “Electrical equivalent circuit model of sickle cell,” in *ASME 2017 International Mechanical Engineering Congress and Exposition*, pp. V010T13A029–V010T13A029, American Society of Mechanical Engineers, 2017.
- [55] J. Opoku-Ansah, M. J. Eghan, B. Anderson, and J. N. Boampong, “Wavelength markers for malaria (*plasmodium falciparum*) infected and uninfected red blood cells for ring and trophozoite stages,” *Applied Physics Research*, vol. 6, no. 2, p. 47, 2014.
- [56] S. N. Paula, “Exploring impedance spectroscopy as a mean of malaria diagnostic,” 2014.







# Apêndices



## Apêndice A

### Propagação de erros para a linearização da temperatura

- Incerteza associada a T

Partindo da equação inicial:

$$T = \frac{-R_0 \cdot A + \sqrt{(R_0 \cdot A)^2 - 4 \cdot B \cdot R_0 \cdot (R_0 \cdot R_T)}}{2 \cdot B \cdot R_0} \quad (1)$$

E sabendo que:

$$\delta T = \left| \frac{dT}{dR_T} \right| \delta R_T = |n \cdot R_T^{n-1}| \delta R_T \quad (2)$$

$$(\sqrt[n]{f})' = \frac{f'}{n \cdot \sqrt[n]{f^{n-1}}} \quad (3)$$

Obtém-se:

$$\left| \frac{dT}{dR_T} \right| = \frac{4 \cdot B \cdot R_0}{2 \cdot B \cdot R_0 \cdot (2 \cdot \sqrt{(A^2 \cdot (R_0^2 - 4 \cdot B \cdot R_0 \cdot (R_0 - R_T))})} \quad (4)$$

Assim sendo, a incerteza associada à temperatura é dada por:

$$\delta T = \frac{\delta R_T}{\sqrt{((A \cdot R_0)^2 - 4 \cdot B \cdot R_0 \cdot (R_0 - R_T))}} \quad (5)$$

- Incerteza associada a  $R_T$

Partindo da equação inicial:

$$R_T = \frac{\frac{-V_o}{V_i} \cdot R_{15}}{\frac{R_{17}}{R_{16}} + 1} \quad (6)$$

E sabendo que:

$$\delta R_T = \left| \frac{dR_T}{dV_o} \right| \delta V_o \quad (7)$$

$$\left| \frac{dR_T}{dV_o} \right| = - \frac{R_{15} \cdot V_i \cdot \left( \frac{R_{17}}{R_{16}} + 1 \right)}{V_i \cdot \left( \frac{R_{17}}{R_{16}} + 1 \right)^2} \quad (8)$$

Desta forma, obtém-se com (7) e (8):

$$\delta R_T = \frac{R_{15}}{V_i \cdot \left( \frac{R_{17}}{R_{16}} + 1 \right)} \delta V_o \quad (9)$$

## Apêndice B

---

# **Experimental Protocol - Tests with Hemoglobin**

Matibabu 2017

---

Sara Anjo and Andreia Gaudêncio  
September 20, 2017

## Acronyms

HbA0	Ferrous Hemoglobin A <sub>0</sub> (human)
Hz	Hemozoin
HzS	Synthetic Hemozoin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PLA	Polylactic Acid

## List of Tables

1	Parasite relations . . . . .	4
2	Data for preparation of test tubes . . . . .	6
3	Standard Dilution for MATIBABU tests . . . . .	11
4	HzS/Hb dilution . . . . .	11

## Contents

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>4</b>
1.1	Hb . . . . .	4
1.2	HzS . . . . .	4
1.3	Hb with 0.2% of parasitemia . . . . .	4
<b>2</b>	<b>HbA0 and HzS Production</b>	<b>5</b>
2.1	Reagents and Materials . . . . .	5
2.2	PBS Preparation . . . . .	5
2.3	Hb Preparation . . . . .	5
2.4	HzS Preparation . . . . .	5
2.5	HzS Dilution . . . . .	6
<b>3</b>	<b>Materials</b>	<b>7</b>
3.1	Prototype . . . . .	7
3.2	Materials . . . . .	7
3.2.1	Polystyrene bucket . . . . .	7
3.2.2	3D printed support structure . . . . .	7
3.2.3	Electrodes . . . . .	8
3.3	Important Notes . . . . .	8
<b>4</b>	<b>Tests</b>	<b>9</b>
4.1	Using <i>Matlab</i> <sup>®</sup> . . . . .	10
4.1.1	MOT - Standard . . . . .	10
4.1.2	MOT - 2 angles . . . . .	10
4.1.3	EIST - Sweep Standard . . . . .	10
4.1.4	EIST - Single Frequency . . . . .	10
4.1.5	EIST - 2 angles Sweep . . . . .	10
4.2	IBILI protocol . . . . .	10
4.2.1	Standard dilutions . . . . .	10
4.2.2	Standard tests . . . . .	11
4.2.3	Standard file saving methodology . . . . .	11
4.2.4	Environmental observations . . . . .	12
<b>5</b>	<b>Appendix</b>	<b>13</b>



# 1 Introduction

The main goal of this experimental protocol is to refer the necessary information about HbA0 including its preparation in order to perform *Matibabu* experiments. Also, this protocol mentions the preparation of solutions with HbA0 and HzS imitating infected blood.

## 1.1 Hb

The major protein present in red blood cells is Hemoglobin (Hb), each cell containing more than 600 million Hb molecules. An adult Hb molecule contains four globin chains: two alpha and two beta (HbA0). The normal range for Hb in females is 11.5-15.5 mg/ml and in males is 13.5-17.5 mg/ml.

In these experiments it's used human HbA0 from *Sigma-Aldrich*.

## 1.2 HzS

Hemozoin (Hz) is a Heme crystal resulting from the metabolism of the parasite Plasmodium, which causes malaria. HzS has chemical and physical properties similar to Hz. Its properties may vary depending on the method of compound synthesis. In this protocol HzS of acidic origin is used, coming from the supplier *In vivo Gen*.

## 1.3 Hb with 0.2% of parasitemia

To guarantee the main goal of these experiments it's essential to understand how the Hz concentration in blood is related to the degree of parasitemy which will be here explained.

As the previous protocol already referred, for a 0.2% level of parasites the patient presents symptoms, meaning 100 000 parasites in 1  $\mu$ l of blood.

Table 1: Parasite relations [?]

Degree	Parasite (%)	Parasites/ $\mu$ L	Notes
1	0.0001 - 0.0004	5 - 20	film sensitivity
2	0.002	100	Patient presents symptoms - typically seasonal
3	0.2	10 000	Threshold where immune patients presents symptoms
4	2	100 000	Maximum parasite of <i>P. Vivax</i> and <i>P. Ovale</i>
5	2 - 5	100 000 - 250 000	Hiperparasitemy/ severe malaria - high mortality
6	10	500 000	Requires blood transfusion - high mortality.

Knowing that 330 parasites produce approximately 1 ng of Hz, this implies a preparation of a solution with  $[HzS] = 0.03 \text{ mg/ml}$  to obtain the degree 3 of parasitemy.

Later, to guarantee the detection of disease as mentioned in the first protocol the experiments will include different levels of parasitemy to the one considered here, taking also in consideration lower degrees of parasitemy.

## 2 HbA0 and HzS Production

The production of HbA0 is based in a dilution of the powder from *Sigma Aldrich* and HzS in a dilution of the *InvivoGen* pill according to the protocol.

### 2.1 Reagents and Materials

- HbA0 *Sigma Aldrich*
- HzS *InvivoGen*
- PBS, pH 7.4
- Vortex
- Ultrasonic tub
- Precision balance

### 2.2 PBS Preparation

- Produce 1l of PBS
- Add one portion (tablet) of Sigma-Aldrich preparation to 1l of distilled / deionized water.

### 2.3 Hb Preparation

- Weight 5mg HbA0 *Sigma Aldrich*
- Mix 5mg of HbA0 in 0,35ml of PBS, getting a concentration of 14,29mg/ml<sup>1</sup>

### 2.4 HzS Preparation

- Weight HzS *InvivoGen*
- Must be weighted 5mg of HzS for future preparation of concentration 1mg/ml
- Mix 5mg of HzS in 5ml of PBS (note that the HzS is immiscible, so it will give a suspension - colloid mixture - of brownish hue)

It originates 1ml of solution !! This ml should be diluted.

---

<sup>1</sup>Considering the levels of Hb existing in both males and females we use this intermediate value for the experiments.

Table 2: Data for preparation of test tubes

<b>Tube</b>	<b>[HzS] (mg/ml)</b>	<b>Parasitemy (%)</b>	<b>Degree</b>
<b>1</b>	1.5	10	6
<b>2</b>	0.75	5	5
<b>3</b>	0.5	3.33	5
<b>4</b>	0.3	2	5
<b>5</b>	0.1	0.67	4
<b>6</b>	0.075	0.5	4
<b>7</b>	0.03	0.2	3
<b>8</b>	0.005	0.033	3
<b>9</b>	0.001	0.0067	3
<b>10</b>	0.00075	0.005	3
<b>11</b>	0.0003	0.002	2
<b>12</b>	0.000015	0.0001	1

## 2.5 HzS Dilution

Containing this time 1 ml HzS diluted in PBS, proceed to successive dilutions to take measurements. Considering the data presented in the Table 2, it is considered that  $[HzS]_{max} = 1.5 mg/ml$ . For this reason, this will be the  $[HzS]_{max}$  used and will be present in *Tube 1*. It is intended to decrease [HzS] to a minimum ratio of  $[HzS]_{min} = 0.000015 mg/ml$ .<sup>2</sup>

<sup>2</sup>For more information about parasitemy related issues consult the Experimental Protocol for Hz.

## 3 Materials

The knowledge about the materials used is truly important to understand some results. Some details about the materials and respective providers are presented in this chapter.

### 3.1 Prototype

The overall skeleton is produced by a 3D printer using PLA (for better mechanic properties) and PBS (for better thermal resistance). The skeleton is constructed in pieces, and it is important to refer:

- main structure
- main cover
- circuit box
- Halbach cylinder holder
- motor shaft handler
- sample curb

### 3.2 Materials

The sample holder is an adapted bucket composed by three main elements:

- Polystyrene bucket
- 3D printed support structure
- electrodes

#### 3.2.1 Polystyrene bucket

1st demand of two types o polystyrene buckets with 4.5ml from *Labbox* (catalogue is available in <https://www.labbox.com/descargables/3.pdf> - page 141 of 2017 version) wuth references **MAPS-010-100** and **MAPS-F10-100**.

#### 3.2.2 3D printed support structure

Composed by 3 main pieces:

- base
- top
- cover

This structures aim to fill the empty space of the bucket in order to reduce the liquid volume needed.

### 3.2.3 Electrodes

The electrodes are included in the 3D printed support structure. Two stainless steel wires are used. These wires are provided by *Two Medical* through the shop website "<http://ecxshop.com/pt/>" to a professional. The wire choose was "**Fio em Rolo-CrNi duro elást .036" 50g**" with reference "**MO5501590**".

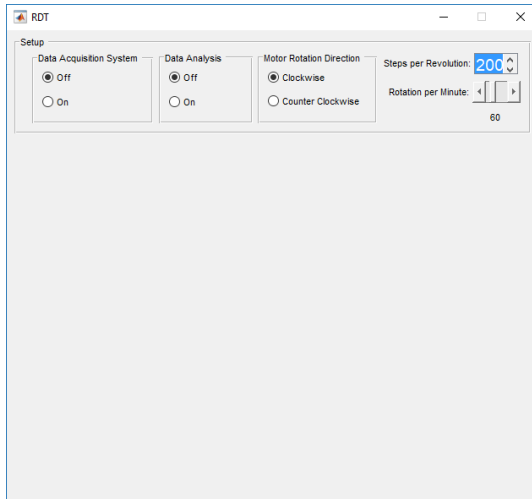
### 3.3 Important Notes

Be careful with the bucket holder:

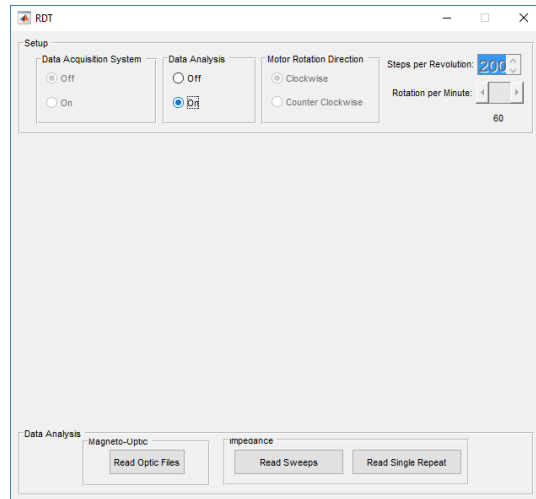
- The bucket must be completely clean and free of scratches or cracks specially in the light incision sides;
- The wires for impedance acquisition must be well attached before starting acquisitions;
- The sample must fulfil the whole cavity. Otherwise the tests will be counterfeit.

## 4 Tests

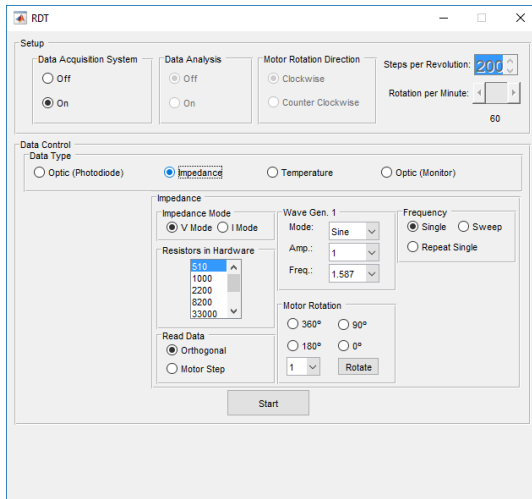
After getting the concentrations tubes ready and well conserved, the tests may be carried out within a month. The resultant documents' names must be clear and contain the information of the tube number, the *modus operandi* (MOT - Magneto Optic Technique - or EIST - Electrical Impedance Spectroscopy). MOT can be evaluated by *Standard* (measurement of the light intensity through the sample) or *2 angle* (time last measurement for 2 angles - usually 0 degrees and 90 degrees) acquisition and EIST can perform *sweep standard* (frequency sweep), *single frequency* (one frequency only used and applied during a time interval) or *2 angle sweep* (sweep standard for two angles).



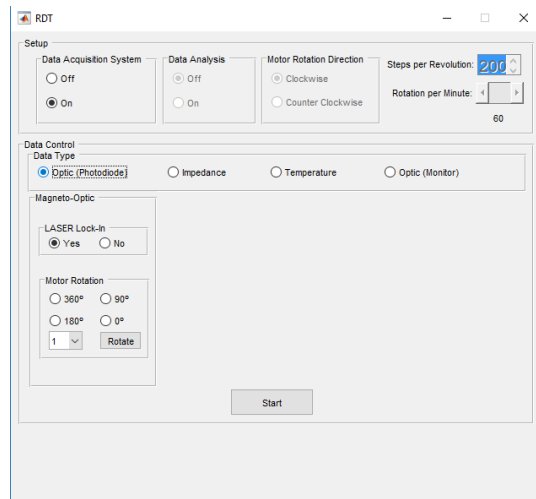
(a) RDT Interface off



(b) RDT Interface to read Data



(c) RDT Interface for Impedance acquisition



(d) RDT Interface for MOT acquisition

Figure 1: Matlab GUI

## 4.1 Using *Matlab*<sup>®</sup>

In order to further future acquisitions, all the steps will be described since you run *RDT.m* in *Matlab*<sup>®</sup>. The GUI (Guide User Interface) used is represented in the Figure 1.

### 4.1.1 MOT - Standard

The average amplitude of light measured while the Halbach cylinder rotated 360 degrees is calculated. Each point in the graphic gives the averaged amplitude of the signal for 15 degrees rotation of the Halbach cylinder. It was chosen a time of 5 seconds between acquisitions to allow the orientation of the HzS crystals.

### 4.1.2 MOT - 2 angles

The average amplitude of light measured is calculated during two minutes for each 2 orthogonal angles (for 0 degrees and for the Halbach cylinder rotation of 90 degrees). A time interval of 5 seconds between acquisitions was chosen to allow the orientation of the HzS crystals.

### 4.1.3 EIST - Sweep Standard

Sweep standard uses a frequency list (from 1Hz up to 1MHz) and calculates impedance modulus, phase and Cole-Cole Diagram for each frequency.<sup>3</sup>

### 4.1.4 EIST - Single Frequency

The best frequency is selected by observing the output signal (output signal framed between a minimum measurable signal and a threshold before signal saturation). This is observed by performing a sweep study. The impedance modulus and phase are calculated while the Halbach cylinder rotated 360 degrees from 45 degrees to 45 degrees during 1 minute for each angle and repeating each 10 seconds.

### 4.1.5 EIST - 2 angles Sweep

Acquisitions are performed during three minutes for each 2 orthogonal angles (for 0 degrees and for the Halbach cylinder rotation of 90 degrees). A time interval of 10 seconds between acquisitions was chosen to allow the orientation of the HzS crystals.

## 4.2 IBILI protocol

The presented section was created to standardize the test's *modus operandi*. All the investigators must follow the present protocol for data acquisition and file saving.

---

<sup>3</sup>The range of frequencies could be slightly different from the ones referred in this protocol.

#### 4.2.1 Standard dilutions

The HbA0 must be tested in a dilution with and without Hz so, we're able to simulate infected and non-infected blood respectively.

Knowing that we have available about 0,35 ml of Hb solution, to assure a 0.2% of parasitemy it is necessary to take in account the values of HzS to mix in a preparation of 5 $\mu$ l dilution in 1 ml of PBS (imitating a dilution of 1 droop of blood in PBS).<sup>4</sup>

Table 3: Standard Dilution for MATIBABU tests

Dilutions:		steps to follow
control:	100% PBS	1ml PBS
Dilution 1:	5 ul/ml	1 drop of Hb + 1 ml PBS

Table 4: HzS/Hb dilution

[HzS] (mg/ml)	Parasitemy (%)	Scale	Steps to follow
<b>0.03</b>	0.2	3	add 0,2 $\mu$ l to 1000 $\mu$ l of Hb solution diluted ( $c = 5\mu$ l/ml)

#### 4.2.2 Standard tests

Attending to the different test duration it is suitable to follow the test order presented here:

- Perform EIST Sweep Standard (observe signal saturations and adapt the system in the first acquisition - keep the internal resistance constant to allow data comparison); **Note: when with HzS, do the 2 angle test!**
- Perform MOT 2 angles (it is fast enough!!) (lock in and no lock in);
- Perform impulse test - waveforms;
- Observing S.A acquisition, perform a single frequency - short acquisition 20 \* 10s .

#### 4.2.3 Standard file saving methodology

Folder title: **sample number – gender(M/F) – disease status** (*diseasedegree/nodisease*)

EIST files: **SW\_dilutionName\_InternalResistance**

MOT files: **MOT\_dilutionName\_lockinStatus**(*lockin/nolockin*)

Wave Forms files: **WF\_dilutionName\_mode**(*I/V*)

Wave Forms figures: **WF\_dilutionName\_mode**(*I/V*)

<sup>4</sup>The dilution considered is equivalent to dilution 1 in the previous experimental protocol.



#### 4.2.4 Environmental observations

- The tests must be performed in a **controlled environment** (temperature, pressure, radiation, light...).
- The test must be performed in the **first 30 minutes after blood collection** to avoid blood coagulation.
- Data must be treated and carefully observed after **each acquisition** in order to avoid systematic/random errors.

## 5 Appendix

### Crucial Notes

- Dating the tubes containing the various concentrations
- Indicate the tubes' H<sub>2</sub>S concentration
- H<sub>2</sub>S has a term of 1 month
- Keep the tubes in the refrigerator (among 4 – 6 degrees)
- The storage temperature of Hb is -20°C.

