



Marc Fernandes Silva

**Licenciatura em Tecnologias dos Equipamentos de
Saúde**

**Projecto e construção de uma câmara de cultura
celular para uso em microscopia óptica**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador científico: Prof. José Luís Ferreira (FCT-UNL)

Co-orientador científico: Prof. Jorge Carvalho Silva (FCT-UNL)



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Março de 2015

Projecto e construção de uma câmara de cultura celular para uso em microscopia óptica

Copyright © Ano da discussão. Todos os direitos reservados. Marc Fernandes Silva, Faculdade de Ciências e Tecnologia e Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Prof. José Luís Ferreira, meu orientador científico, pela atenção, motivação e apoio que me deu, que foram fundamentais para o desenvolvimento desta dissertação.

Destaco também aos professores Jorge Silva e Célia Henriques, pelo apoio e todo o conhecimento transmitido.

Aos Sr. Mesquita, Sr. Faustino e Sr. Eduardo pelo auxílio prestado e a boa vontade sempre demonstrada.

Aos meus familiares e amigos, pelo apoio e motivação que me deram ao longo de todo o trabalho, nos bons momentos e nos maus momentos.

Ao meu irmão, Alexandre, que será sempre meu companheiro e amigo.

Finalmente gostaria de agradecer à Cristina, minha companheira, amiga, meu amor, por todo o apoio e atenção dada ao longo destes anos.

O grupo de Engenharia de Tecidos da FCT/UNL desenvolve membranas biodegradáveis que servem de substrato a culturas celulares e que se destinam a substituir temporariamente tecidos humanos danificados.

O objectivo desta dissertação é desenvolver uma câmara que permita manter uma cultura celular em incubação por um período de tempo indefinido e que simultaneamente permita a sua observação através de microscopia óptica.

Foi projectada e construída uma câmara de cultura compatível com o microscópio disponível no laboratório do Grupo de Engenharia de Tecidos da FCT/UNL, capaz de manter um ambiente interno adequado às necessidades fisiológicas das células: 37 °C, CO₂ a 5% e entre 90 a 100% de humidade sem interferir com a capacidade de formação de imagens do microscópio.

Os testes efectuados permitiram verificar que o sistema desenvolvido é capaz de controlar e monitorizar a temperatura e a percentagem de CO₂, proporcionando um ambiente adequado para manter as células em incubação por um período de tempo indefinido e permitindo a sua observação num microscópio óptico invertido.

Palavras-chave: Câmara de cultura, culturas celulares, microscopia, controlo de temperatura, controlo de concentração de CO₂.

The tissue engineering group from FCT / UNL develops biodegradable membranes which serve as cell culture substrates and are intended to temporarily replace damaged human tissues.

The goal of this thesis is to develop an assembly that allows maintaining cell culture incubation for an indefinite period of time and its observation by light microscopy.

A portable culture chamber compatible with the group inverted microscope was designed and built to be capable of maintaining adequate internal environment to the physiological needs of the cells (37° C, 5% CO₂ and between 90 and 100% humidity), without interfering with the microscope imaging ability.

The system that has been developed is able to control and monitor both temperature and CO₂ level providing an suitable environment to maintain the cells in incubation and allowing their observation on an inverted optical microscope.

Keywords: culture chamber, cell culture, microscopy, temperature control, CO₂ measures.

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice de figuras.....	xiii
Índice de tabelas.....	xv
1. Introdução.....	1
1.1. Âmbito.....	1
1.2. Objectivos.....	1
1.3. Estrutura do Documento.....	2
2. Observação da migração celular	3
2.1. Migração celular	3
2.2. Técnica de <i>time-lapse</i>	4
2.3. Culturas celulares	6
2.4. Câmaras para observação de culturas celulares.....	7
2.5. O microscópio	9
3. Sistema para observação da migração celular.....	11
3.1. Câmara.....	11
3.2. Aquecimento e humedificação da atmosfera da câmara	12
3.3. Medida da temperatura	14
3.4. Admissão de CO ₂	15
3.5. Medidas de CO ₂	16
4. Controlo e monitorização da temperatura e da concentração de CO ₂	19
4.1. Microcontrolador	19
4.2. Parâmetros de controlo	19
4.3. Controlo da temperatura e da concentração de CO ₂	21
4.4. Monitorização da temperatura e da concentração de CO ₂	22
5. Resultados experimentais.....	25
5.1. Controlo e monitorização da temperatura	25
5.2. Controlo e monitorização da concentração de CO ₂	27
6. Conclusão.....	31
Bibliografia	33
Apêndice A- Desenhos técnicos	35

Índice de figuras

Figura 2-1: Etapas do processo de migração celular. Figura adaptada[3].	4
Figura 2-2: Imagens captadas através de <i>time-lapse</i> [5].	5
Figura 2-3: Mitose observada através de microscopia de fluorescência[7].	6
Figura 2-4: Heating system da Ibidi.	7
Figura 2-5: BioStation IMQ Cell Incubator and Microscope da Nikon.	8
Figura 2-6: Okolab Microscope cage incubator.	8
Figura 3-1: Desenho esquemático da câmara de cultura.	12
Figura 3-2: Elemento de aquecimento e de humidade.	13
Figura 3-3: Esquema simbólico do circuito de amplificação do sinal do sensor de temperatura LM35 com um ganho de seis.	14
Figura 3-4: Sistema de passagem de gás.	15
Figura 3-5: Electroválvula esquematizada.	15
Figura 3-6: Sensor de concentração de CO ₂ e respectivo condicionador, GMM111 <i>Carbon Dioxide Module</i> da marca Vaisala [15].	17
Figura 4-1: Pulsos com frequência constante mas de largura variável. A tensão média, no tempo, varia consoante a largura do pulso.	20
Figura 4-2: Interface gráfica do programa desenvolvido para monitorização da temperatura e da concentração de CO ₂ na câmara de cultura.	23
Figura 5-1: Diferença de temperatura dentro da câmara.	25
Figura 5-2: Interface gráfica da aplicação de monitorização durante um ensaio do sistema de controlo de temperatura a 37 °C.	26
Figura 5-3: Interface gráfica da aplicação de monitorização durante um ensaio do sistema de controlo de temperatura a 30 °C.	26
Figura 5-4: Monitorização da temperatura na câmara de cultura através do sensor LM35.	27
Figura 5-5: Interface gráfica da aplicação de monitorização durante um ensaio do sistema de controlo de concentração de CO ₂ a 5%.	28
Figura 5-6: Formação de condensação no topo da câmara de cultura durante os ensaios.	28
Figura 5-7: Interior da câmara sem condensação após um ensaio de longa duração.	29
Figura 5-8: Valor da concentração de CO ₂ dentro da câmara ao longo do tempo.	29

Índice de tabelas

Tabela 3-1: Características técnicas	13
Tabela 3-2: Características técnicas da electroválvula.	16
Tabela 3-3: Características do sensor de CO2	16
Tabela 4-1: Lista dos terminais do microcontrolador que estão ligados aos vários componentes do sistema de controlo.....	22

1. Introdução

O Grupo de Engenharia de Tecidos desenvolve e produz membranas poliméricas biodegradáveis que se destinam a substituir temporariamente tecidos humanos danificados. As membranas devem permitir e potenciar a migração, proliferação e migração celular.

Uma forma de avaliar e quantificar a migração celular consiste na observação duma cultura celular continuamente ao longo do tempo num microscópio óptico. A baixa velocidade de migração de uma célula obriga a tempos de observação elevados (algumas dezenas de horas) o que implica que durante esse intervalo de tempo a cultura de células tenha de ser mantida em boas condições de incubação.

Para que tal aconteça é necessário manter as células num ambiente estéril, imersas num meio nutriente, a uma temperatura constante de 37 °C e com uma atmosfera de 5% de dióxido de carbono.

Para proporcionar tais condições foi construída uma câmara e um sistema que controla tanto a temperatura como a percentagem de dióxido de carbono no seu interior, com características ópticas que permitem uma boa visualização microscópica das células ao longo das várias horas de observação.

1.1. Âmbito

Este projecto surge no âmbito da unidade curricular de dissertação do curso de Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL) e da necessidade do grupo de Engenharia de Tecidos da FCT/UNL dispor de uma câmara de cultura com as características atrás descritas.

1.2. Objectivos

O objectivo principal deste trabalho é construir uma câmara de cultura num material opticamente transparente, ser estanque e esterilizável, dispor de um sistema de controlo de temperatura, de controlo de dióxido de carbono e um sistema de produção de humidade na atmosfera da câmara de cultura.

O equipamento deverá acomodar as células em placas de cultura normalizadas com um diâmetro máximo de 35 milímetros, para serem observadas por um período de tempo indefinido num microscópio óptico invertido.

1.3. Estrutura do Documento

Este documento, que visa a descrição do projecto, está estruturado da seguinte forma:

O capítulo 2 descreve as técnicas da observação celular, fazendo referência à migração celular, destacando as técnicas utilizadas, e os sistemas comerciais usados para tal. É feita ainda uma breve alusão ao microscópio utilizado no decorrer deste projecto.

O capítulo 3 é dedicado à descrição de todo o trabalho desenvolvido, nomeadamente a projecção da câmara e as características a ter em conta para a viabilidade da sua concretização, sendo essas características também aqui abordadas. São referenciados todos os componentes utilizados e suas respectivas características.

No capítulo 4 são apresentadas todas as decisões efectuadas acerca do sistema de controlo do projecto, mais especificamente o microcontrolador e os parâmetros a que ele dizem respeito.

No capítulo 5 tem-se os resultados experimentais resultantes da monitorização tanto do sensor de temperatura como do sensor de CO₂.

No capítulo 6 observam-se as conclusões deste trabalho e perspectivas de melhorias futuras do mesmo.

2. Observação da migração celular

Uma das actividades do Grupo de Engenharia de Tecidos é o desenvolvimento de membranas poliméricas biodegradáveis que servem de substrato a culturas celulares e que se destinam a regenerar a forma ou a função de um tecido ou órgão danificado de um paciente[1].

As películas ou membranas de biomateriais têm espessuras variáveis, que vão desde micrómetros (μm) a milímetros (mm), e que são preparadas por diferentes métodos utilizando um ou mais polímeros. Estas membranas são utilizadas para tratar e proteger a área de feridas ou queimaduras de fatores externos. Alguns dos polímeros utilizados na preparação destas películas são, entre outros, a polivinilpirrolidona, o ácido hialurónico, o colagénio, o alginato de sódio, o quitosano e seus derivados e a poli-N-acetil-glucosamina[2].

O objectivo destas membranas é serem biodegradáveis em subprodutos biocompatíveis, com o propósito do novo tecido poder substituir o suporte, possibilitando assim a adesão, a proliferação e a migração celular.

Existem vários métodos para medir, indirectamente, a adesão e a proliferação celular numa determinada membrana. Esta informação é importante no desenvolvimento de novas membranas com características cada vez melhores. A migração celular é também uma informação importante mas a sua quantificação exige equipamento e técnicas de aquisição e processamento de imagem.

2.1. Migração celular

Os tecidos biológicos são constituídos por células aderentes e pela matriz extracelular que as envolve. A migração celular tem uma relevância fisiológica importante, pois está associada aos fenómenos de proliferação e de diferenciação celular. Existem diferentes formas de migração celular, dependendo do tipo de células, do tipo de substrato e das suas características, bem como da força de adesão das células.

O mecanismo de migração pode ser caracterizado por um conjunto de processos que incluem a polarização, protusão e adesão, translocação do corpo celular e retracção da parte traseira (ver Figura 2-1).

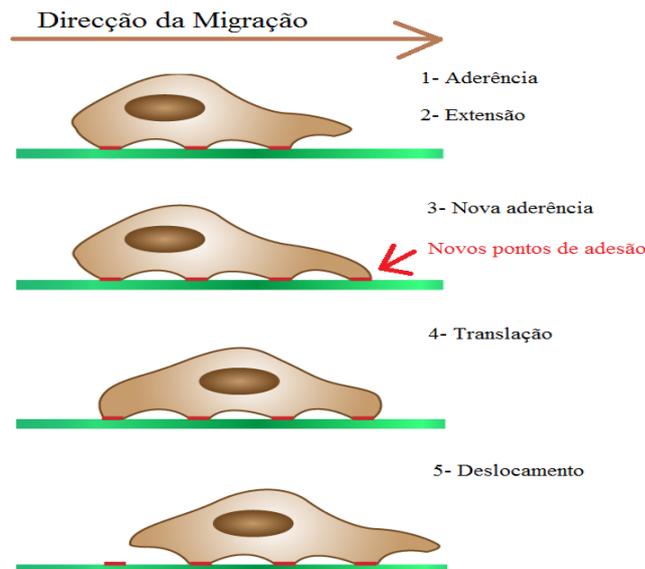


Figura 2-1: Etapas do processo de migração celular. Figura adaptada[3].

A migração celular é efectuada por interações da célula com o substrato através de pontos focais (realçado a vermelho na Figura 2-1). Mantendo-se aderente aos pontos focais, as células lançam pseudópodes exploradores, incluindo expansões mais finas denominadas por lamelípede que estabelecem novas conexões com o substrato criando pontos focais.

Os movimentos de contracção e relaxação são muito lentos, pelo que distingui-los através de um microscópio é um processo muito demorado. Uma das técnicas usadas para observar e registar a migração celular é designada *time-lapse*.

2.2. Técnica de *time-lapse*

A técnica *time-lapse* permite caracterizar e estudar a migração celular sobre vários tipos de substratos através da captura de imagens fotográficas em intervalos de tempo pré-definidos e durante um longo período de observação através de microscopia[4] (ver Figura 2-2).

O registo de imagens da migração em intervalos de tempo regulares permite, posteriormente, através de processamento de imagem, isolar e seguir a migração de células individuais. Com a escala apropriada é possível medir a deslocação, a velocidade e a distância entre a localização inicial e a localização final num dado período de tempo. Estes parâmetros permitem caracterizar as membranas quanto à migração celular. É esperado que a migração celular seja mais eficiente sobre uma membrana produzida com nanofibras alinhadas do que sobre uma membrana com nanofibras desalinhadas, por exemplo.

A aquisição de imagens em *time-lapse* pode, no entanto, ser perturbada por factores tais como as variações de temperatura e as vibrações externas, que podem interferir com a estabilidade e a focagem da imagem.

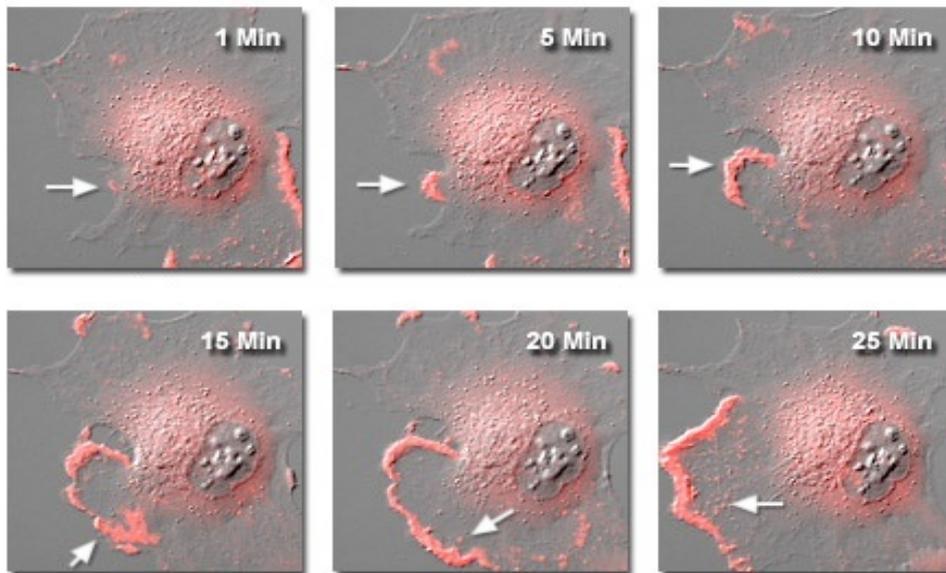


Figura 2-2: Migração celular observada com recurso técnica time-lapse durante um período de tempo de 25 minutos através de microscopia óptica[5].

A técnica *time-lapse*, pode ser utilizada em vários tipos de microscopia como por exemplo a microscopia óptica e a microscopia por fluorescência.

A microscopia óptica permite visualizar objectos, fenómenos ou detalhes invisíveis ao olho humano com uma boa resolução espacial e elevada sensibilidade. A resolução dos microscópios ópticos não excede normalmente os 0.25 micrómetros, sendo esta resolução limitada pela difracção da luz, o que os torna adequados à observação de células que podem ter dimensões entre cerca de 10 e 100 micrómetros.

A microscopia por fluorescência permite a observação de células vivas no diagnóstico clínico (patologias, microbiologia, imunologia) e em ambientes de pesquisa. A fluorescência é a propriedade que certos materiais possuem de emitir luz de forma natural ou após terem sido excitados através de uma luz com uma frequência bem determinada[6] (ver Figura 2-3).

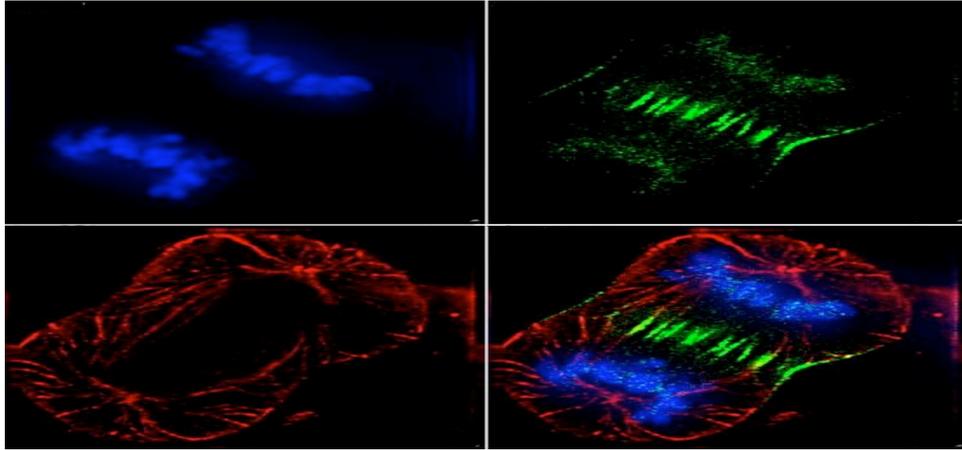


Figura 2-3: Mitose celular em células vivas observada através de microscopia de fluorescência com um tempo de observação na ordem das dezenas de horas [7].

Como todas as técnicas de microscopia óptica, a microscopia de fluorescência é limitada pela difracção da luz. A sua capacidade de resolução de imagem é aproximadamente de 200 nm.

A baixa velocidade da migração celular obriga a tempos de observação elevados (tipicamente algumas dezenas de horas), o que implica que durante esse tempo a cultura tenha que ser mantida em boas condições de incubação.

2.3. Culturas celulares

As culturas celulares *in vitro* são realizadas directamente no fundo de caixas apropriadas (de petri ou de poços, entre outras) ou sobre substratos que são depois colocados nas caixas. As células estão imersas num meio de cultura artificial, estéril, contendo nutrientes, que mantem as condições físico-químicas exigidas para a preservação das células.

Os meios de cultura são constituídos principalmente por água, sais inorgânicos, hidratos de carbono, aminoácidos, vitaminas, proteínas, *buffers* e lípidos. Cada componente desempenha uma função específica no meio de cultura, como ajudar a manter equilibrada a pressão osmótica das células, a manter o pH das células estável (entre 7.4 - 7.7) e a proporcionar uma fonte de energia para as células[8].

Por forma a manter condições de cultura semelhantes às do corpo humano, há necessidade de garantir que o meio de cultura esteja a uma temperatura de aproximadamente 37 °C. Para conseguir estas condições existem incubadoras em que as culturas celulares, acondicionadas em caixas apropriadas, são colocadas numa câmara com controlo de temperatura. Para minimizar o efeito da evaporação do meio de cultura é usual manter-se um elevado grau de humidade na atmosfera da câmara. Por outro lado, com vista a ajudar a manter o meio de cultura com o pH adequado, são cada vez mais frequentes as incubadoras que controlam a percentagem de dióxido de carbono no seu interior em valores por volta dos 5%.

Para que se possa observar uma cultura celular por várias horas são então necessárias condições de incubação semelhantes às que se encontram numa incubadora. Essas condições devem ser criadas numa câmara com dimensões e características que permitam a observação da cultura através de um microscópio.

2.4. Câmaras para observação de culturas celulares

Uma análise dos equipamentos para observação de culturas que existem no mercado permitiu verificar que são usadas várias soluções técnicas para a integração dum câmara de incubação com o microscópio; desde os que dispõem apenas de uma pequena câmara que é colocada directamente na mesa do microscópio àqueles em que a câmara é integrada com o microscópio.

O “*Heating system*”, da Ibidi[9], mostrado na Figura 2-4, é constituído por uma pequena câmara de incubação que é fixada na mesa do microscópio e dispõe de tubos ligados a sistemas que proporcionam as condições de incubação adequadas. Este tipo de concepção permite a utilização de vários tipos de placas de cultura, pois a câmara de incubação principal está adaptada a placas cujas dimensões podem ir até aos 127 mm de comprimento, 85 mm de largura e 35 mm de altura.

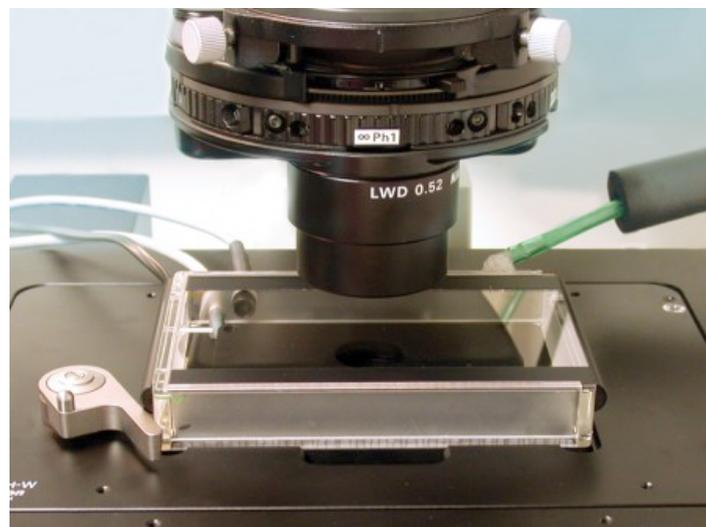


Figura 2-4: Heating system da Ibidi onde é visível a câmara de incubação fixa na mesa do microscópio.

Uma unidade de controlo externo ligada a uma garrafa de CO₂ fornece a mistura de gás apropriada. A humidade é gerada num recipiente de água aquecida em torno do prato de cultura. O vidro superior tem um sistema de aquecimento que previne a condensação e, sendo de alta qualidade, permite a transmissão clara da luz e o uso da técnica “*Time-Lapse*”.

A Ibidi comercializa a câmara de cultura por um valor aproximado de 3 150 €[10] e a unidade de controlo com o sistema de introdução de gases (CO₂ + O₂) e do sistema de humificação por cerca de 10 400 €.

A BioStation IMQ, da Nikon[11], é uma incubadora de células construída de forma integrada com um microscópio (ver Figura 2-5).

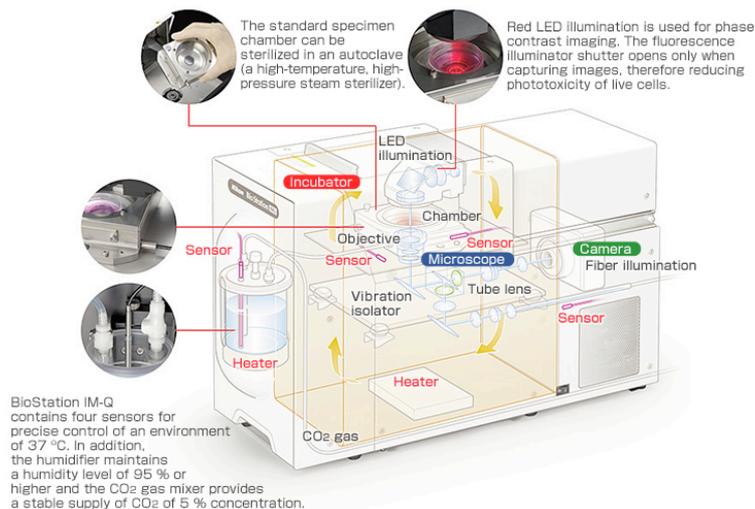


Figura 2-5 Modelo do tipo caixa da BioStation IMQ Cell Incubator and Microscope da Nikon.

O microscópio é invertido e dispõe de uma câmara fotográfica digital ligada a um computador, permitindo assim a visualização das imagens directamente no monitor.

Os gases (CO_2 e O_2) são primeiro misturados e humidificados, fluindo depois para a incubadora. O aquecimento da câmara é feito por circulação de água aquecida através de condutas. O facto de o equipamento ser à prova de vibração e possuir um isolamento térmico permite a aquisição de imagens estáveis durante longos períodos de incubação.

Por último, tem-se um modelo tipo caixa que isola do exterior a mesa do microscópio, as lentes e outras partes do microscópio como o Microscope Cage Incubator da *Okolab*[12] ilustrado na Figura 2-6.



Figura 2-6: Okolab Microscope cage incubator e respectivas portas que permitem o fácil acesso ao interior da caixa.

A caixa é feita de um plástico transparente e mantém no seu interior as condições ambientais adequadas à cultura das células. Possui pequenas portas nas paredes de modo a permitir o fácil acesso ao seu interior. O ar quente é conduzido para o interior da câmara com recurso a um aquecedor

externo. O CO₂ e o vapor de água são misturados, externamente, e bombeados até à caixa, proporcionando assim um ambiente húmido.

Dos três tipos de câmaras de cultura analisados anteriormente, a solução que mais facilmente se adequa às condições existentes no laboratório do Grupo de Engenharia de Tecidos é aquela em que a câmara pode ser autonomamente montada na mesa do microscópio. As características geométricas da câmara dependem então do microscópio a utilizar.

2.5. O microscópio

Para a realização do projecto está disponível o microscópio Ti-S da Nikon[13] com o acessório para microscopia de fluorescência T1-FM. O microscópio tem ainda instalado uma máquina fotográfica digital D610 também da Nikon.

O microscópio tem a particularidade de ser um microscópio invertido, mais adequado à observação de culturas celulares do que um microscópio não invertido. Esta configuração permite a manipulação de caixas de Petri e caixas de poços com culturas celulares sobre a mesa do microscópio. Dadas estas características é possível colocar sobre a sua mesa objectos que poderão ter até cerca de 15 cm de altura. As dimensões da mesa são 25 cm de largura e 20 cm de profundidade.

Por ser invertido, as lentes, montadas no revólver, encontram-se debaixo da mesa. O sistema de focagem faz com que a lente escolhida se possa aproximar ou afastar da mesa na vertical. A observação da cultura é feita através de um orifício na mesa com cerca de 3 cm de diâmetro, sobre o qual é colocada a caixa de petri ou a caixa de poços.

A amplificação máxima pretendida para a observação celular é de 200 vezes, conseguida com o uso de uma lente ocular com uma ampliação de 10 vezes e uma objectiva com uma ampliação de 20 vezes cuja distância focal é de 3mm.

A máquina fotográfica digital permite definir um intervalo de tempo entre disparos automáticos que vai desde um segundo a vinte e quatro horas. É ainda possível programar a hora de início e o número de fotografias que se pretende adquirir.

3. Sistema para observação da migração celular

Para além das características, principalmente geométricas, da câmara, dependerem das características do microscópio invertido, há ainda outros aspectos a ter em consideração na sua construção, nomeadamente quanto aos materiais, à sua transparência e esterilização.

3.1. Câmara

Para permitir a passagem da luz do sistema de iluminação do microscópio até à cultura celular, a parte de cima da câmara de cultura terá que ser transparente. De igual forma, para permitir que a luz atinja a objectiva do microscópio, situada debaixo da mesa, a parte de baixo da câmara terá que ser igualmente transparente.

Tendo em conta a necessidade de esterilização periódica da câmara, escolheu-se utilizar o acrílico na sua construção. O acrílico apresenta a vantagem de ser fácil de obter e de maquinar, quando comparado com outras opções como o policarbonato e o vidro. Apresenta contudo algumas desvantagens tal como o facto de não ser adequado para ser esterilizado em autoclave.

Pela simplicidade da geometria optou-se por construir uma câmara circular que permita a instalação de uma caixa de petri de 35 mm ao centro. Para não criar obstáculos à passagem da luz até à objectiva do microscópio, optou-se por um desenho em que a caixa de petri fica encaixada num furo na base da câmara. A vedação entre a câmara e o exterior é assim feita apenas por pressão das abas da caixa de petri sobre as bordas do furo e não é, por isso, estanque (ver Figura 3-1).

Para não ser um obstáculo à passagem da luz, optou-se por instalar o elemento de aquecimento e humedificação em redor da caixa de petri. No desenho da câmara foram tidos em consideração quer o espaço necessário para instalar e manusear o elemento de aquecimento quer o espaço necessário para manusear a caixa de petri.

A base da câmara foi colada à parede circular e o topo da câmara é amovível (tampa), para permitir aceder ao interior.

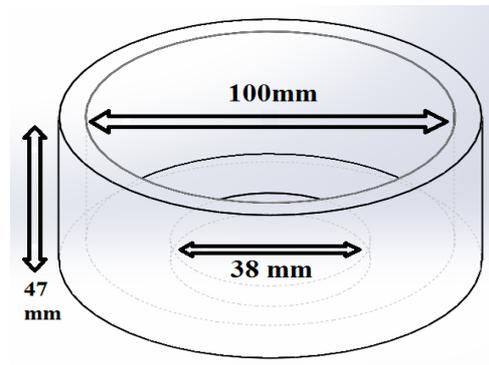


Figura 3-1: Esquema gráfico e respectivas medidas da câmara de cultura projectada.

As dimensões exteriores da câmara construída são de apenas cerca de 10 cm de diâmetro e 5 cm de altura.

Na parede da câmara foram feitos vários orifícios para permitir a troca de gases com os sistemas exteriores e para permitir a passagem de fios eléctricos do sistema de aquecimento e controlo de temperatura.

3.2. Aquecimento e humedificação da atmosfera da câmara

Dada a geometria da câmara optou-se por construir um elemento de aquecimento e humedificação cilíndrico, feito a partir de fios condutores de Cromel e Alumel. Apesar de serem condutoras, estas duas ligas apresentam valores de resistividade elevados, que fazem com que seja possível obter potências de aquecimento consideráveis com fios relativamente curtos.

Foi construído um cilindro vazado, com um diâmetro externo de 3 cm, em cujo interior irá ser colocada a água. Os fios de Cromel Alumel são enrolados no exterior do cilindro e, uma vez colocado na câmara, este fica a circundar a caixa de petri onde irá decorrer a cultura celular (ver Figura 3-2).

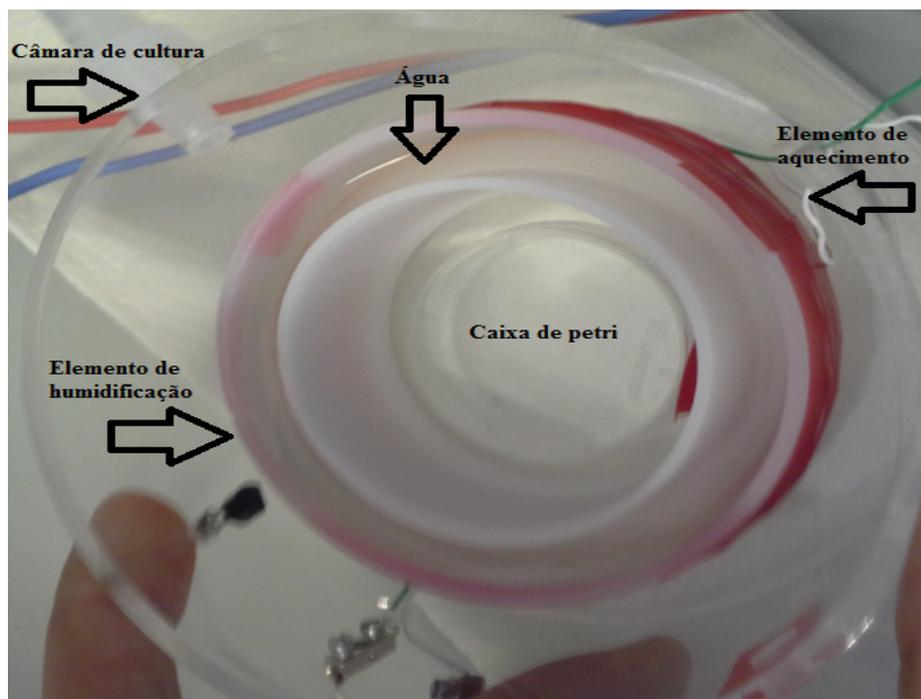


Figura 3-2: Câmara de cultura projectada onde é visível o elemento de aquecimento envolto nesta, e o elemento de humidificação cilíndrico.

Os fios de Cromel e Alumel são normalmente comercializados aos pares com o objectivo de serem usados na construção de termopares do tipo K. As características do Cromel e do Alumel estão descritas na tabela 3-1.

Tabela 3-1: Características técnicas

Tipo de liga metálica	Resistividade (Ω/m)
Fio com revestimento branco — Alumel	10.25
Fio com revestimento verde — Cromel	22.22

Uma vez que são comercializados aos pares, optou-se por usar ambos os fios, ligados em série, para criar um único elemento de aquecimento. Como fonte de alimentação eléctrica do sistema de aquecimento dispunha-se de uma fonte de tensão de 12 V capaz de fornecer 2 A. Experiências prévias permitiram estabelecer 16 W como potência máxima de aquecimento a usar. Para usar esta potência de aquecimento, a corrente será de 1.33 A e portanto será necessário usar um elemento com uma resistência de cerca de 9 Ω . Dada a resistividade das ligas usadas, um único elemento de aquecimento (com dois fios do mesmo comprimento e de ligas diferentes) teria que ter um comprimento de cerca de 55 cm.

Uma vez que o perímetro do suporte de aquecimento e humidificação é de cerca de 21 cm, um elemento de aquecimento com apenas 55 cm de comprimento daria pouco mais de duas voltas,

podendo fazer com que o calor gerado não fosse distribuído uniformemente. Então foi decidido usar dois elementos de aquecimento com o dobro da resistência eléctrica, ou seja, 18Ω , e portanto com o dobro do comprimento, ligados em paralelo, perfazendo então uma resistência equivalente de 9Ω .

Cada um dos dois elementos de aquecimento é assim constituído por cerca de 55 cm de Cromel ligado em série com 55 cm de Alumel, com uma resistência total de cerca de 18Ω , capaz de fornecer uma potência de aquecimento de cerca de 8 W quando alimentado por uma tensão de 12 V.

3.3. Medida da temperatura

Para medir a temperatura foi escolhido o circuito integrado LM35. Este circuito integra o sensor de temperatura com um condicionador de sinal calibrado de fábrica que permite obter, como saída, um sinal eléctrico em tensão de 0.01 V por cada 1°C [14].

O LM35 pode fazer leituras de temperatura entre os -55°C e os $+150^\circ\text{C}$ com uma precisão na ordem dos 0.5°C e uma impedância de saída na ordem dos 0.1Ω para uma carga de 1 mA.

No dimensionamento do amplificador de sinal do LM35 arbitrou-se que a temperatura a medir nunca seria superior a 80°C , e portanto o valor máximo da tensão de saída será 0.80 V. Para amplificar esta tensão até um máximo de 4.8 V escolheu-se usar um amplificador operacional em montagem não inversora com um ganho de 6.

Dado não se esperarem grandes variações de temperatura, optou-se por implementar, à saída do amplificador de sinal, um filtro passivo passa baixo com uma frequência de corte de 10 Hz.

Com o filtro, a impedância de saída do circuito passou a ser mais baixa, pelo que se usou um amplificador operacional em configuração de seguidor de tensão. O esquema completo do condicionador de sinal do LM35 é o que se encontra na Figura 3-3.

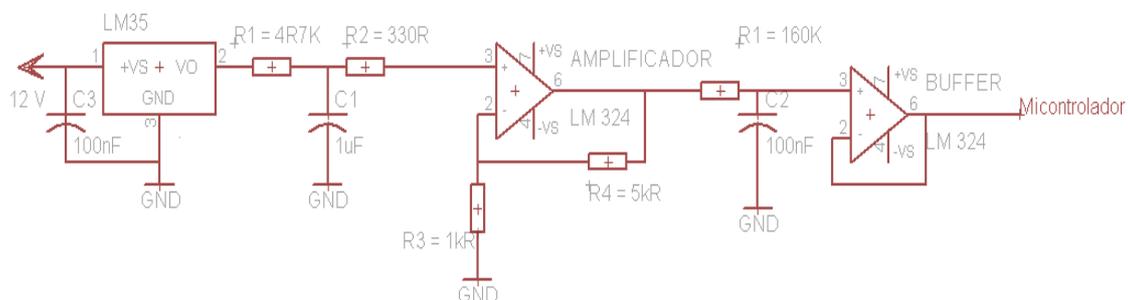


Figura 3-3: Esquema simbólico do circuito de amplificação do sinal do sensor de temperatura LM35 com um ganho de seis.

O sensor de temperatura é introduzido radialmente através da parede da câmara, ficando a superfície alinhada com a face interna da parede da câmara.

3.4. Admissão de CO₂

O laboratório tem instalada uma linha de distribuição de CO₂ a partir de uma botija com uma pressão de saída regulada para cerca de 500 mbar. Actualmente a linha destina-se a fornecer CO₂ a uma incubadora celular que tem como exigência um fornecimento de CO₂ a uma pressão mínima de 300 mbar. Nesta linha foi acrescentada uma derivação para se criar uma nova linha, ser usada pela câmara de cultura, a que foi acrescentada uma válvula de actuação manual. Assim, a nova linha da distribuição do CO₂ pode ser isolada da anterior linha já existente (ver Figura 3-4).



Figura 3-4: Sistema de admissão do gás CO₂ a partir de uma botija já existente no laboratório.

Para permitir o controlo da admissão do CO₂ foi inicialmente instalada uma electroválvula directamente na nova linha de distribuição. Dada a pressão na linha, os testes efectuados permitiram concluir que mesmo com tempos de abertura da electroválvula muito pequenos, a quantidade de CO₂ entregue à câmara era excessiva, pelo que foi decidido introduzir um mano-reductor na linha.

Com uma pressão na linha reduzida (próxima da pressão atmosférica), o volume de CO₂ entregue à câmara pode assim ser controlado pelo tempo de abertura da electroválvula (ver Figura 3-5). As características eléctricas da electroválvula são as que se encontram na Tabela 3.2.



Figura 3-5: Electroválvula esquematizada.

A ligação entre a electroválvula e a câmara será feita através de tubos de silicone. Por forma a minimizar o volume morto entre a electroválvula e a câmara os tubos terão que ser o mais curtos

possível, porém não tão curtos que possam transmitir vibrações à mesa do microscópio, onde assentará a câmara de cultura.

Tabela 3-2: Características técnicas da electroválvula.

Marca/Modelo	Sparkfun/AQT15SP
Alimentação	12V
Material	Plástico
Temperatura de funcionamento	1°C a 75°C
Caudal	0.02Mpa≥3L/Min
Tipo de uso	Ambiente de baixa pressão e água

3.5. Medidas de CO₂

Não há muitos sensores para medir concentrações de CO₂ nos níveis pretendidos — cerca de 5%. O sensor GMM111 *Carbon Dioxide Module* da marca Vaisala, é comercializado já com o respectivo condicionador de sinal calibrado de fábrica (ver Figura 3-6). Permite medir concentrações de CO₂ até 10% e, neste valor, a sua saída em tensão é de 10 V. Tem também como característica o facto de funcionar em ambientes com percentagens de humidade até 99% (ver Tabela 3-3).

Tabela 3-3: Características do sensor de CO₂

Tensão de alimentação	24V
Humidade de funcionamento	0 a 99% sem condensação
Temperatura de funcionamento	+5°C a +55°C
Fluxo de CO₂	0.2 a 0.8l/min
Saída analógica	0 a 10V

Uma vez já estar a ser utilizada uma fonte de alimentação eléctrica de 12 V, optou-se por aproveitá-la para gerar, recorrendo a um elevador de tensão DC-DC, os 24 V necessários para alimentar o GMM111. Os testes efectuados permitiram verificar que a fonte de alimentação eléctrica fornece cerca de 100 mA ao elevador de tensão para alimentar o GMM111.

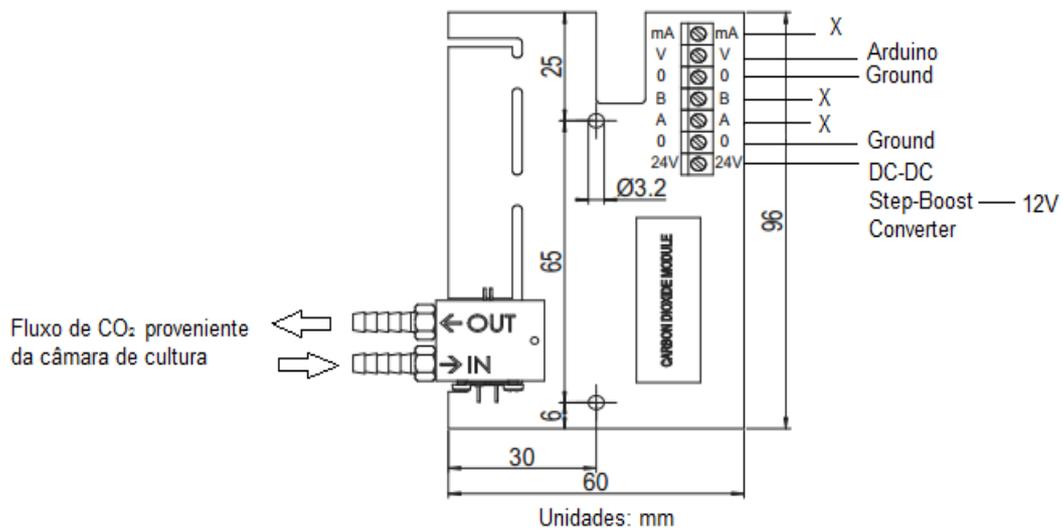


Figura 3-6: Sensor de concentração de CO₂ e respectivo condicionador, GMM111 *Carbon Dioxide Module* da marca Vaisala [15].

Para normalizar a saída em tensão do GMM111 foi necessário implementar um amplificador atenuador, com um ganho de 0.5, para ser ter como tensão máxima de saída os 5 V.

4. Controlo e monitorização da temperatura e da concentração de CO₂

Para controlar tanto a temperatura como a concentração de CO₂ optou-se por usar um microcontrolador. O microcontrolador comunica através de USB com um computador, permitindo assim que o utilizador escolha os valores dos parâmetros de controlo — temperatura e concentração de CO₂ — e monitorize todo o processo de controlo.

4.1. Microcontrolador

Uma vez que tanto as medidas de temperatura como as medidas de concentração de CO₂ não necessitam de ser efectuadas com elevadas taxas de aquisição, optou-se por utilizar, dado o seu baixo custo, um microcontrolador. Além disso, o facto do microcontrolador ser programável permite que os algoritmos de controlo sejam implementados directamente neste, sem recurso ao computador. O computador pode assim assumir apenas um papel de monitorização do processo.

O microcontrolador escolhido foi o ATmega328, que funciona a uma frequência de 16MHz, tem 6 entradas analógicas e 14 terminais que podem ser configurados como entradas ou saídas digitais, dos quais 6 podem ser usados para gerar pulsos com largura variável (PWM - *Pulse-with modulation*). O microcontrolador encontra-se já instalado num *kit* — Arduíno Uno — que disponibiliza um acesso fácil aos vários terminais e comunica através de uma ficha USB do tipo B.

As entradas analógicas do microcontrolador estão associadas a um conversor analógico-digital com uma gama de tensão de entrada de 0 V a 5 V com uma resolução de 10 *bits*, ou seja, consegue discriminar tensões na ordem dos, aproximadamente, 0.5 mV [$5 / (2^{10} - 1)$].

4.2. Parâmetros de controlo

A temperatura que se pretende obter na câmara de cultura pode ser atingida através do controlo da potência eléctrica fornecida aos elementos de aquecimento. Pela sua facilidade de implementação

através do microcontrolador, optou-se por realizar um controlo da potência através da geração de pulsos de largura variável (PWM), descrito através da Figura 4-1.

Os terminais de saída PWM do microcontrolador apenas fornecem potências baixas, claramente inadequadas para fornecer os 18 W de potência máxima a fornecer aos dois elementos de aquecimento da câmara. Esta situação é no entanto facilmente contornada através do uso de transístores MOSFET, em que a porta (*gate*) pode ser directamente controlada pelo sinal PWM do microcontrolador e a corrente eléctrica é fornecida ao elemento de aquecimento através da fonte (*source*) do MOSFET.

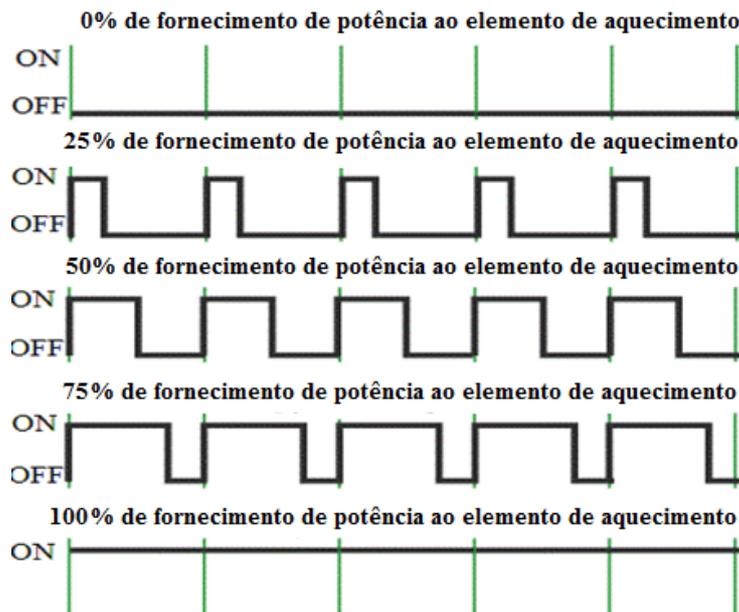


Figura 4-1: Pulsos com frequência constante mas de largura variável. A tensão média, no tempo, varia consoante a largura do pulso.

A concentração de CO₂ na câmara de cultura é função da pressão ajustada e regulada pelo manó-redutor e do tempo de abertura da electroválvula. O tempo de abertura da válvula define o volume de CO₂ a ser entregue à câmara de cultura. No entanto este volume também é função da pressão ajustada no manó-redutor. Assim, para se poder ter controlo sobre a concentração de CO₂ é necessário que a pressão de entrega seja mantida fixa num determinado valor sempre que se utilize o sistema de controlo. Dada a baixa resolução do manómetro do manó-redutor, foi fixado um ângulo de abertura do regulador em cerca de 30° a partir da posição de fechado. Estima-se que, nestas condições, a pressão de entrega seja inferior aos 10 mbar.

Na condição de que a pressão de entrega seja fixa e constante, o volume de CO₂ que é entregue à câmara é então apenas função do tempo de abertura da electroválvula. Este tipo de função é aquele que se encontra no controlo de uma saída digital do microcontrolador, contudo, também neste caso é necessário fornecer à electroválvula uma corrente que o microcontrolador não é suposto ser capaz de fornecer. Há assim necessidade de recorrer a mais um circuito com um transístor MOSFET.

Ensaio preliminares permitiram verificar que há um significativo atraso entre o momento em que a válvula é accionada e o momento em que a medida da concentração do CO₂ estabiliza. Assim optou-se por se abrir a electroválvula por um período de tempo fixo e controlar a concentração do CO₂ através do intervalo de tempo entre aberturas consecutivas da electroválvula.

4.3. Controlo da temperatura e da concentração de CO₂

Pretende-se que a temperatura na câmara de cultura seja de, aproximadamente, 37 °C, a atingir apenas através do recurso aos elementos de aquecimento. Ou seja, não há um sistema para promover o arrefecimento da atmosfera da câmara. O arrefecimento dá-se apenas devido às trocas de calor entre a câmara e o exterior (mesa do microscópio e atmosfera do laboratório). Há assim que ter algum cuidado com o controlo de temperatura para evitar que esta ultrapasse o valor pretendido.

O circuito de medida de temperatura tem uma saída que varia entre 0 V e 4.8 V para uma temperatura que varia entre 0 °C e 80 °C, donde resulta uma resolução da medida de temperatura de, aproximadamente, 0.08 °C.

O controlo é feito com base nas medidas de temperatura, que são feitas com uma taxa de aquisição de uma por segundo na entrada analógica A0 do microcontrolador (ver tabela 4.1). Quanto maior for a largura de pulso do sinal de controlo mais potência média, ao longo do tempo, é fornecida aos elementos de aquecimento, e portanto mais rapidamente a atmosfera da câmara é aquecida. Assim, a largura dos pulsos é determinada em função da diferença entre a temperatura medida e a temperatura que se pretende atingir.

À medida que a temperatura se aproxima do valor desejado, a largura do pulso de controlo vai sendo cada vez menor até atingir um mínimo de 20%. A partir daqui o controlo é do tipo "on/off", ou seja, o sinal de controlo é aplicado aos elementos de aquecimento se a diferença de temperatura for inferior em 0.5 °C ao valor desejado e deixa de ser aplicado quando a temperatura atingir o valor desejado. Foi utilizado o terminal D7 do microcontrolador como saída digital (ver tabela 4.1).

O sistema de medida de concentração do CO₂ tem uma saída que varia entre 0 V e 5 V para uma concentração que varia entre os 0 % e os 10 %. A resolução da medida é então de cerca de, aproximadamente, 0.01 %. O microcontrolador efectua medidas de concentração de segundo a segundo na entrada analógica A4.

A câmara de cultura não tem um sistema de exaustão da atmosfera, pelo que também é necessário algum cuidado para não introduzir demasiado CO₂ na câmara, uma vez que a diminuição da concentração se fará a um ritmo muito lento.

Para ter um maior controlo sobre o volume de CO₂ a introduzir na câmara, foi definido um tempo curto, fixo, de cerca de 50 ms de abertura da electroválvula. Verificou-se que, por exemplo, nestas condições, a actuação de cinco vezes (de meio minuto a meio minuto) da electroválvula fez elevar a concentração de CO₂ em cerca de 2 %. O tempo que decorre entre a acção da electroválvula e a estabilização da leitura da concentração é de cerca de 5 minutos.

O controlo da concentração do CO₂ é então feito em função da diferença entre o valor medido e o valor pretendido, como abaixo explicado:

- Concentração CO₂ <0.8% → a electroválvula abre de meio minuto em meio minuto;
- 0.8% <Concentração CO₂ <2% → a electroválvula abre de minuto a minuto;
- 2% <Concentração CO₂ <3.2% → a electroválvula abre de 5 em 5 minutos;
- 3.2% <Concentração CO₂ <5% → a electroválvula abre de 7 em 7 minutos.

Esta actuação é feita através da saída digital D9 do microcontrolador (ver Tabela 4.1).

Tabela 4-1: Lista dos terminais do microcontrolador que estão ligados aos vários componentes do sistema de controlo.

Terminal	Ligação
D7	Elemento de aquecimento
D9	Electroválvula
A0	Sensor de temperatura
A4	Sensor de CO ₂

4.4. Monitorização da temperatura e da concentração de CO₂

O microcontrolador dispõe de um porto de comunicação USB, pelo que se optou por utilizar um computador para monitorizar as acções de controlo implementado. Decidiu-se fazer a programação do computador em linguagem "G", em LabVIEW, da *National Instruments*.

Foi desenvolvido um conjunto de comandos para que o microcontrolador e o computador pudessem comunicar entre si tanto os valores da temperatura como os da concentração de CO₂. A estrutura de comandos é do tipo "X1234%", em que "X" pode tomar o valor "T" ou "S", significando respectivamente "temperatura" e "concentração de CO₂", seguido de um valor numérico e terminando em "%". Este último carácter serve para indicar o fim do comando e o valor numérico é o valor da temperatura ou da concentração multiplicado por um factor de 100. Os valores numéricos comunicados entre o computador e o microcontrolador terão assim duas casas decimais. No exemplo anterior o valor numérico seria 12.34.

O programa, desenvolvido em ambiente *LabVIEW*, possibilita a visualização numérica e gráfica da temperatura e do fluxo do CO₂ dentro da câmara de cultura.

Caso o utilizador assim o deseje, é possível guardar as medidas dos sensores num ficheiro *Excel* para uma posterior leitura e análise dos valores.

É de referir que foram efectuados vários testes à interface, para certificar o seu bom funcionamento, bem como ao sistema, recorrendo para isso a várias taxas de aquisição dos valores obtidos através dos sensores.

Na interface gráfica, como se pode observar na Figura 4-2, o utilizador tem à sua disposição:

- Em A é possível seleccionar os canais pretendidos e indica há quanto tempo a aquisição está a decorrer e permite também definir a duração da aquisição.
- Em B, pressionando o botão "Gravar", é possível gravar todos os valores obtidos desde o início da execução do programa num ficheiro, possível de ser aberto em Excel. Este documento contém a informação sobre os tempos de aquisição e os respectivos valores de temperatura e fluxo de CO₂, bem como a data e hora de gravação.
- Na opção C podemos estabelecer a comunicação, escolhendo o porto a que se pretende ligar o cabo de interligação entre o microcontrolador e o computador e possibilitar ao utilizador escolher a temperatura de funcionamento dentro da câmara.

- A opção D possibilita ao utilizador decidir quando começar a aquisição dos sinais dos sensores, independentemente do programa estar ou não em execução.
- Em E, pressionando o botão “Sair”, o programa termina a execução.
- Já na opção F é exibido o gráfico da temperatura dentro da câmara e da temperatura desejada dentro da câmara, ambos em função do número da aquisição.
- Finalmente, em G, são mostrados os valores do fluxo de CO₂ dentro da câmara de cultura que é medido em cada interação.

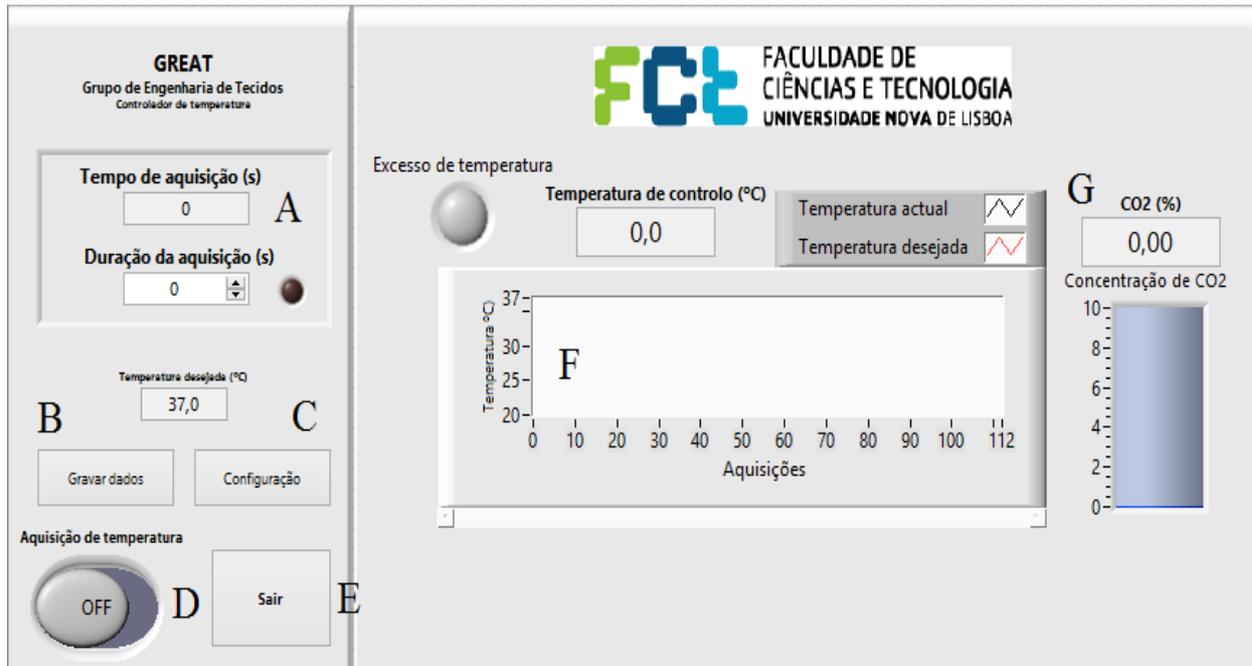


Figura 4-2: Interface gráfica do programa desenvolvido para monitorização da temperatura e da concentração de CO₂ na câmara de cultura.

5. Resultados experimentais

5.1. Controlo e monitorização da temperatura

Uma vez que se pretende obter o controlo da temperatura no interior da caixa de petri, local onde se encontra a cultura celular, e a temperatura é medida na parede da câmara, foram efectuados ensaios para determinar a relação entre a temperatura medida nestas duas zonas da câmara.

Para além do sensor colocado na parede da câmara, foi colocado um segundo sensor na tampa da caixa de petri. Foram efectuadas diversas medidas de temperatura, tendo-se obtido resultados semelhantes ao que pode ser observado no gráfico da figura 5-1.

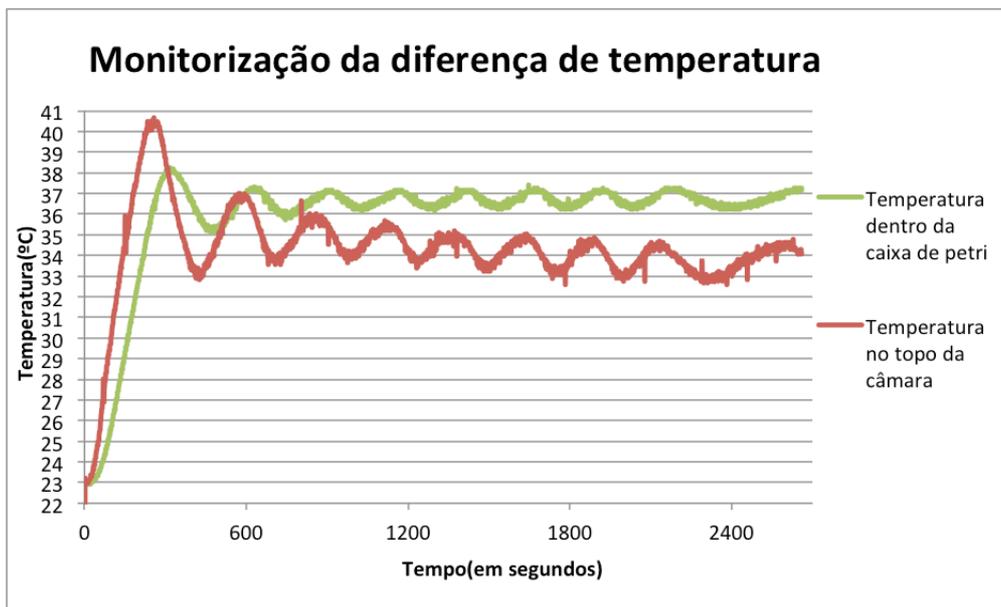


Figura 5-1: Gráfico da monitorização da diferença de temperatura, calculada através da temperatura dentro da caixa de petri e da temperatura no topo da câmara.

Verifica-se que a temperatura na caixa de petri é, em média, cerca de 2 °C superior à que é medida na parede da câmara. Esta diferença de temperatura deve-se ao facto de a caixa de petri se encontrar no

centro do elemento de aquecimento, enquanto o sensor na parede da câmara se encontra mais afastado e desviado do elemento de aquecimento.

Com o estabelecimento da relação entre a medida da temperatura da caixa de petri e a medida da temperatura na parede da câmara foi então possível usar esta última como parâmetro de controlo da temperatura na caixa de petri.

O resultado do funcionamento da aplicação para monitorização da temperatura e da concentração do CO₂ pode ser visualizado na Figura 5-2.

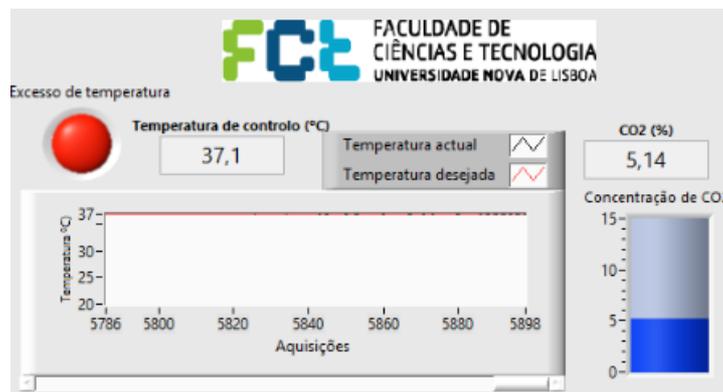


Figura 5-2: Interface gráfica da aplicação de monitorização durante um ensaio do sistema de controlo de temperatura a 37 °C.

No gráfico presente na interface gráfica da aplicação, mostrada na Figura 5-2, verifica-se que a temperatura, na prática, está a tender para o valor de referência de 37 °C.

Para constatar se o circuito funcionava correctamente, definiu-se um novo valor da temperatura desejada, de 30 °C, e observou-se o gráfico na interface gráfica da aplicação que pode ser vista na Figura 5-3.

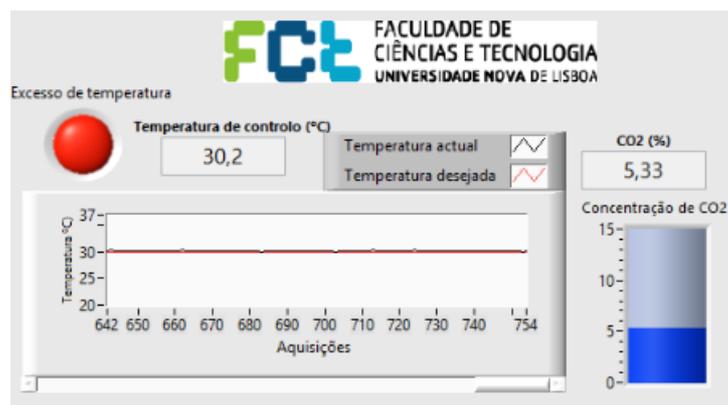


Figura 5-3: Interface gráfica da aplicação de monitorização durante um ensaio do sistema de controlo de temperatura a 30 °C.

À semelhança do que aconteceu no ensaio anterior, verifica-se que a temperatura se mantém estável no valor desejado, ficando assim comprovado o correcto funcionamento desta parte do sistema de controlo.

Para monitorizar a temperatura o sensor foi colocado na câmara, tendo sido medidos os valores de temperatura ao longo do tempo com o objectivo de se saber se a temperatura se mantinha constante ao longo de um grande intervalo de tempo. Nestas condições, conseguiu-se a monitorização da temperatura representada no gráfico da Figura 5-4.

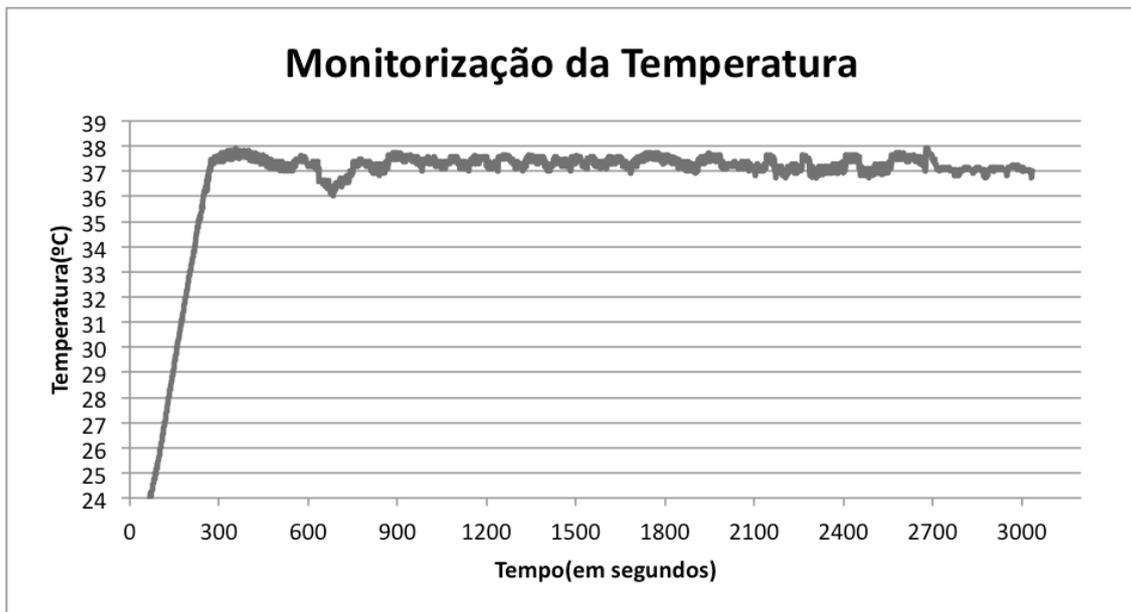


Figura 5-4: Monitorização da temperatura na câmara de cultura através do sensor LM35.

O objectivo era que a temperatura da câmara se mantivesse nos 37 °C ao longo do tempo da experiência, no entanto isto não se verifica. O que acontece é que há uma oscilação. Tal situação é considerada normal e típica de um controlo do tipo *on-off* e a oscilação de cerca de 1 °C é considerada aceitável para o tipo de aplicação em causa.

5.2. Controlo e monitorização da concentração de CO₂

Na Figura 5-5 pode observar-se o gráfico da concentração de CO₂ dentro da câmara durante os dois ensaios anteriores (referentes às Figuras 5-2 e 5-3). Uma vez que os valores se mantêm nos valores desejados, pode-se afirmar que o controlo da concentração de CO₂ dentro da câmara foi alcançado.

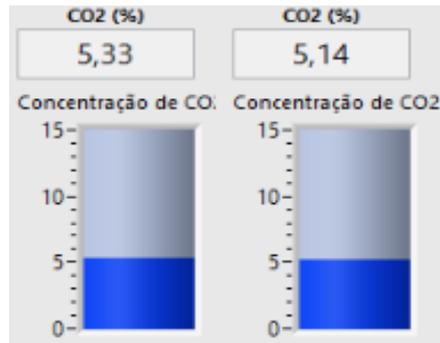


Figura 5-5: Interface gráfica da aplicação de monitorização durante um ensaio do sistema de controlo de concentração de CO₂ a 5%.

Durante os ensaios da câmara de cultura verificou-se o aparecimento de condensação no topo (ver Figura 5-6), reduzindo a iluminação do interior da câmara, mas sem que se verificasse interferência com a capacidade de formação de imagens do microscópio, pois só ocorreu a condensação no topo da câmara e não na sua base (ver Figura 5-7).

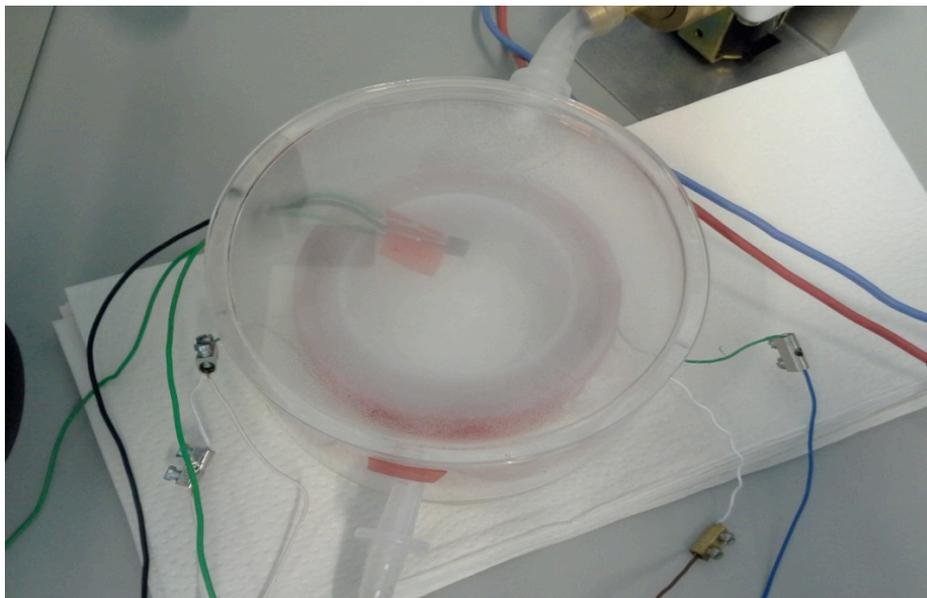


Figura 5-6: Observação de formação de condensação no topo da câmara de cultura durante os ensaios.

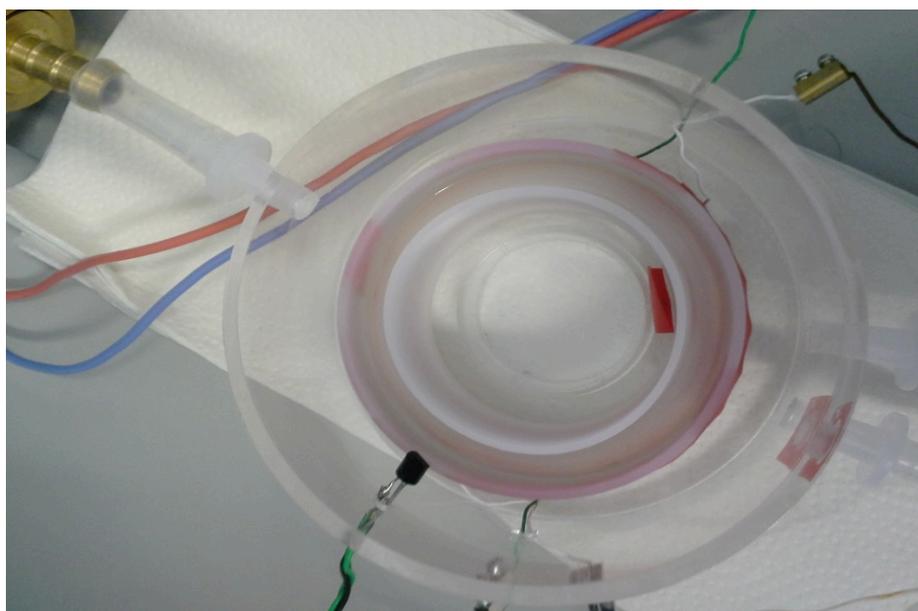


Figura 5-7: Interior da câmara sem condensação após um ensaio de longa duração.

A monitorização da concentração do CO_2 foi realizada com o sistema de aquecimento em funcionamento. A concentração do CO_2 em função do tempo pode ser observada no gráfico da Figura 5-8.

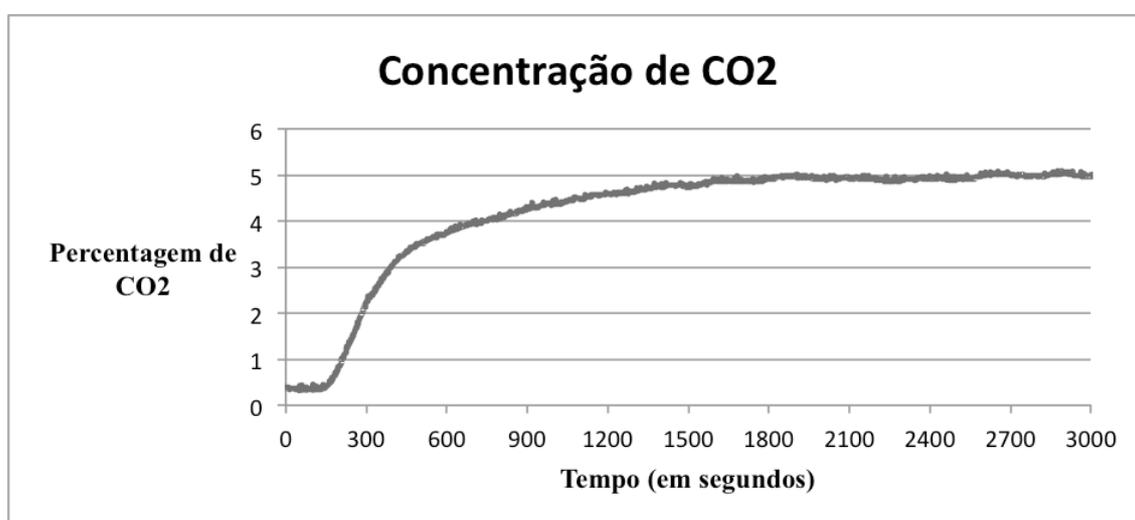


Figura 5-8: Valor da concentração de CO_2 dentro da câmara ao longo do tempo.

Através do gráfico observa-se a estabilização da concentração de CO_2 dentro da câmara ao longo do tempo, podendo-se, por conseguinte, afirmar o bom funcionamento deste sistema.

6. Conclusão

O objectivo principal desta dissertação residiu na construção de uma câmara de cultura celular para se poder estudar células em microscopia óptica, por tempo indefinido, mantendo as condições fisiológicas celulares adequadas, recorrendo para isso à implementação de um sistema de controlo das condições ambientais através de um microcontrolador, podendo o processo ser monitorizado com um computador.

O trabalho desenvolvido no âmbito da dissertação de mestrado consistiu, essencialmente, na implementação de um sistema de controlo de temperatura e de CO₂ numa câmara transparente, com capacidade para acolher culturas de células, e com a possibilidade de estas serem observadas num microscópio invertido.

Com os resultados obtidos conclui-se que a implementação de um sistema de controlo de condições ambientais adequadas à cultura de células é possível. O microcontrolador revelou ser uma mais-valia no sistema desenvolvido, pelo facto de dispor de funcionalidades que facilmente foram adaptadas ao controlo da temperatura, da concentração de CO₂ e de comunicação através da porta série/USB.

O *software* de desenvolvimento LabVIEW mostrou ser acessível e intuitivo, proporcionando as ferramentas adequadas para desenvolvimento da aplicação para monitorização dos parâmetros e desenvolvimento da interface gráfica, através das suas várias bibliotecas. A comunicação entre o computador e o microcontrolador tornou-se simples de implementar devido às funcionalidades de comunicação em série disponíveis no ambiente de desenvolvimento.

Os testes efectuados permitem verificar que o sistema desenvolvido é capaz de controlar e monitorizar a temperatura e a concentração de CO₂, proporcionando um ambiente adequado para manter as células em incubação por tempo indefinido e permitindo a sua observação num microscópio óptico invertido.

Como melhorias a considerar futuramente, considera-se revelante o aperfeiçoamento dos controlos de temperatura e de CO₂ e o desenvolvimento de um sistema que evite a condensação do vapor de água no topo da câmara. Este último objectivo pode ser conseguido através do aquecimento do topo da câmara ou através de um dispositivo que provoque a condensação do vapor em excesso antes que este atinja o topo da câmara.

- [1] G. Amoabediny, N. Salehi-nik, and B. Heli, “The Role of Biodegradable Engineered Scaffold in Tissue Engineering,” *Biomater. Sci. Eng.*, no. 1, pp. 153–158, 2007.
- [2] A. D. Sezer and E. Cevher, “Biopolymers as Wound Healing Materials: Challenges and New Strategies,” *Biomater. Appl. Nanomedicine*, pp. 383–394, 1992.
- [3] W.Commons, “Four steps of cell migration.” [Online]. Available: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Four_steps_of_cell_migration.png. [Accessed: 15-Nov-2014].
- [4] Nikon, “Time-Lapse.” [Online]. Available: http://www.nikoninstruments.com/en_EU/Learn-Explore/Techniques/Time-Lapse. [Accessed: 26-Nov-2014].
- [5] Nikon, “Maintaining Live Cells on the Microscope Stage.” [Online]. Available: <http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/livecellmaintenance.html>. [Accessed: 22-Nov-2014].
- [6] Nikon, “Fluorescence.” [Online]. Available: http://www.nikoninstruments.com/en_EU/Learn-Explore/Techniques/Fluorescence. [Accessed: 29-Nov-2014].
- [7] Futura-Sciences, “Microscope en fluorescence.” [Online]. Available: <http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/dico/d/medecine-microscope-fluorescence-7775/>. [Accessed: 30-Nov-2014].
- [8] Aldrich Sigma, “The Cell Environment (including types of culture medium).” [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/the-cell-environment.html>. [Accessed: 12-Dec-2015].
- [9] Ividi Cells in focus, “Heating & Incubation Systems for Live Cell Imaging,” pp. 1–4, <http://ibidi.com/xtproducts>.
- [10] Ividi Cells in Focus, “Heating & Incubation Systems for Live Cell Imaging Price List 2012,” pp. 15–16, <http://ibidi.com/xtproducts>.
- [11] Nikon, “BioStation IM-Q.” [Online]. Available: <http://www.nikon.com/products/instruments/lineup/bioscience/time/imq/>. [Accessed: 10-Dec-2014].
- [12] Warner Instrument, “Okolab Microscope Cage Incubator.” [Online]. Available: https://www.warneronline.com/prod_popup.cfm?id=1229. [Accessed: 30-Nov-2015].
- [13] Nikon, “Eclipse Ti-S.” [Online]. Available: http://www.nikoninstruments.com/en_EU/Products/Light-Microscope-Systems/Inverted-Microscopes/Eclipse-Ti-S. [Accessed: 10-Feb-2015].
- [14] T. Instrument, “LM35 Precision Centigrade Temperature Sensors Precision Centigrade Temperature Sensors,” pp. 1–13, 2000.
- [15] I. Vaisala, “GMM111 Carbon Dioxide Module,” *Environment*, pp. 1–2, 2008.

Apêndice A- Desenhos técnicos

