

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA -MESTRADO
ANA MARIA TORRES DA SILVA

Ensaio de Imunoaglutinação em Chips de Acustofluídica

Maceió - 2023

ANA MARIA TORRES DA SILVA

Ensaio de Imunoaglutinação em Chips de Acustofluídica

Dissertação apresentada no Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas como requisito necessário para a obtenção do título de Mestre em Física.

Orientador:

Prof. Glauber T. Silva

Co-orientadora:

Amanda E. Silva

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586e Silva, Ana Maria Torres da.
Ensaio de imunoaglutinação em chips de acustofluídica / Ana Maria Torres da Silva. – 2023.
72 f. : il. color.

Orientador: Glauber T. Silva.
Co-orientadora: Amanda E. Silva.
Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Física. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 69-72.

1. Aglutinação. 2. Acustofluídica. 3. Imunoaglutinação. 4. Diagnóstico clínico. I. Título.

CDU: 531.742



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Física
Programa de Pós Graduação em Física

BR 104 km 14. Campus A.C. Simões
Cidade Universitária
Tabuleiro dos Martins
57072-970 Maceió - AL, Brasil
FONE : (82) 3214-1423

PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

“Ensaio de imunoaglutinação em chips de acustofluídica”

por

Ana Maria Torres da Silva

A Banca Examinadora composta pelos professores Glauber José Ferreira Tomaz da Silva (orientador e presidente da banca), do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas; José Pereira Leão Neto, do Campus Arapiraca da Universidade Federal de Alagoas; e Magna Suzana Alexandre Moreira, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, consideram a **candidata aprovada com conceito “ A ”**.

Maceió, 19 de abril de 2023.

Documento assinado digitalmente
gov.br GLAUBER JOSE FERREIRA TOMAZ DA SILVA
Data: 19/04/2023 16:46:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Glauber José Ferreira Tomaz da Silva

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSE PEREIRA LEO NETO
Data: 19/04/2023 16:21:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. José Pereira Leão Neto

Documento assinado digitalmente
gov.br MAGNA SUZANA ALEXANDRE MOREIRA
Data: 19/04/2023 16:11:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª Drª Magna Suzana Alexandre Moreira

Esta dissertação é dedicada a minha amada família.

Agradecimentos

Chegar até aqui não foi uma jornada fácil, porém meu coração transborda de gratidão pelas pessoas que caminharam ao meu lado nesta trajetória. É com imensa gratidão que expressei meu sincero agradecimento a Deus, por seu amor incondicional e pela força que sempre me concedeu. Foi Ele quem me fez acreditar que "tudo posso naquele que me fortalece" (Filipenses 4,14), guiando-me nos momentos mais difíceis e iluminando meu caminho. Sou profundamente grata por sua presença constante em minha vida e por Sua inesgotável bondade. Que eu possa sempre honrar sua graça com meu coração e minhas ações.

Gostaria de expressar minha gratidão a minha amada família (Pai, mãe e irmã), que sempre me apoiaram e encorajaram em cada etapa da minha vida. Seu amor incondicional e sacrifícios incansáveis me deram a força e a motivação necessárias para alcançar meus objetivos. Espero poder retribuir todo esse amor e cuidado ao longo da minha vida.

Gostaria de agradecer ao meu namorado por ser meu companheiro leal e dedicado em cada fase da minha vida. Sua presença amorosa me trouxe alegria, conforto e segurança, e sou grata por cada momento que compartilhamos juntos. Sou abençoada por ter você em minha vida.

Aos amigos que estiveram ao meu lado em cada etapa da minha jornada acadêmica. Sua amizade, apoio e incentivo me ajudaram a superar desafios e a alcançar meus objetivos. Os estudos juntos, conversas, sorrisos foram repletos de momentos inesquecíveis e aprendizados valiosos, e agradeço por cada um deles. Em especial ao Giclenio, gostaria de agradecer por todo o apoio, incentivo e ajuda. Além de ser um excelente companheiro de laboratório, tornou-se um grande amigo, com quem compartilhei momentos especiais e de grandes aprendizados tanto na vida acadêmica quanto na vida pessoal e profissional.

De maneira especial, quero expressar minha gratidão a todos aqueles que fazem parte da sala 6, Nanotac, GAF e da Intaclab, por me acolherem tão gentilmente e por tornarem meus dias mais leves e divertidos. Foi graças à amizade e apoio de cada um de vocês que pude atravessar momentos difíceis e enfrentar desafios com mais confiança.

Não poderia deixar de expressar minha sincera gratidão às minhas companheiras de apartamento, por estarem tão presentes em minha vida de uma forma tão íntima e especial. Além disso, quero dedicar um agradecimento especial a Pâmela, que esteve ao meu lado em todos os momentos - desde madrugadas de estudo até momentos tristes e felizes - se

tornando uma verdadeira irmã de coração. Sou profundamente grato por cada risada, cada conversa, cada conselho e cada abraço que compartilhamos juntos.

Aos meus professores, que cumpriram um papel fundamental ao longo de toda a minha trajetória acadêmica. Quero destacar especialmente a presença e confiança depositada em mim pelo meu orientador, Glauber, e minha co-orientadora, Amanda, que não só foi uma co-orientadora, mas também uma grande amiga, compartilhando todos os momentos comigo.

A CAPES, FAPAL e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

"Você tem que encontrar um trabalho que faça seu coração parecer grande, em vez de um
que o faça parecer pequeno"

Taylor J. Reid.

Resumo

Neste trabalho, estudamos os efeitos da acustofluídica em ensaios de imunoaglutinação por meio da reação de aglutinação de partículas de látex revestidas com Gama-Globulina anti-PCR. Utilizamos um chip de acustofluídica composto por microcanais e uma microcavidade acústica, na qual as partículas são levitadas e aglomeradas nas regiões centrais devido à força de radiação. Realizamos teste de aglutinação no chip de acustofluídica utilizando o kit denominado BIOLÁTEX PCR para caracterização do chip. Inicialmente, investigamos os padrões de aglutinação formados em uma lâmina por meio de microscopia óptica. Em seguida, analisamos como esses padrões se comportavam dentro da microcavidade acústica, investigando as reações entre antígenos e anticorpos e as condições necessárias para essa reação, além de avaliar o chip de acustofluídica em parâmetros de repetibilidade, reprodutibilidade, limite de detecção e sensibilidade. Demonstramos que os sistemas acustofluídicos têm um grande potencial para análises clínicas, especialmente para a reação entre antígenos e anticorpos, aumentando a interação entre esses componentes. Observou-se, por meio do teste de aglutinação no chip, uma diminuição significativa no tempo de reação e uma maior estabilidade dos aglutinados dentro da microcavidade. Apresentou um limite de detecção correspondente a 187,5 pg/ μ L, o que é aproximadamente 32 vezes superior em relação ao teste convencional. Isso possibilita uma maior sensibilidade do teste. O chip de acustofluídica possui características únicas que permitem sua aplicação nas ciências da vida, na área de diagnósticos clínicos, oferecendo resultados com grande potencial.

Palavras-chave: Aglutinação; Chip de acustofluídica; Ensaios de Imunoaglutinação e Diagnóstico clínico

Abstract

In this work, we studied the effects of acoustofluidics on immunagglutination assays through the particle agglutination reaction of latex particles coated with anti-PCR gamma globulin. We used an acoustofluidic chip composed of microchannels and an acoustic microcavity, in which the particles are levitated and clustered in the central regions due to radiation force. We performed agglutination tests on the acoustofluidic chip using the BIOLATEX PCR kit to characterize the chip. Initially, we investigated the agglutination patterns formed on a slide by optical microscopy. Then, we analyzed how these patterns behaved within the acoustic microcavity, investigating the reactions between antigens and antibodies and the conditions necessary for this reaction, as well as evaluating the acoustofluidic chip in terms of repeatability, reproducibility, detection limit, and sensitivity. We demonstrated that acoustofluidic systems have great potential for clinical analyses, especially for the reaction between antigens and antibodies, increasing the interaction between these components. A significant decrease in reaction time and greater stability of agglutinates within the microcavity were observed through the agglutination test on the chip. The detection limit was found to be 187,5 pg/ μ L, which is approximately 32 times higher than that of the conventional test, enabling greater sensitivity of the test. The acoustofluidic chip has unique characteristics that allow its application in life sciences, particularly in the field of clinical diagnostics, offering results with great potential.

Keywords: Agglutination; acoustofluidics chip; Immunoagglutination Assays e Clinical Diagnosis

1	Introdução	14
1.1	Imunoaglutinação	15
1.2	Acustofluídica	17
1.3	Ensaio de Imunoaglutinação Assistidos por ultrassom	18
1.4	Apresentação Geral do Trabalho	20
2	Microcavidade Cilíndrica	22
2.1	Dinâmica dos Fluidos	22
2.1.1	Equações de Conservação	23
2.1.2	Equação de Helmholtz	24
2.1.3	Solução da Equação de Helmholtz	27
2.2	Microcavidade Cilíndrica no Chip de Acustofluídica	29
2.2.1	Força de Radiação Acústica Primária	29
2.2.2	Força de Radiação Acústica Secundária	31
3	Imunoaglutinação e Acustofluídica	35
3.1	Interação Antígeno-Anticorpo (Ag-Ac)	35
3.2	Ensaio de Imunoaglutinação	40
3.3	Efeitos da acustofluídica em ensaios de imunoaglutinação	45
3.3.1	Microfluídica	45
3.3.2	Acustofluídica	47

SUMÁRIO

4	Ensaio de Imunoaglutinação em chips de acustofluídica	51
4.1	Chips de acustofluídicas	51
4.1.1	Instrumentação acústica	52
4.2	Teste de Aglutinação (Biolátex PCR)	54
4.3	Resultados e Discussões	55
5	Considerações Finais e Perspectivas	67

LISTA DE FIGURAS

- 2.1 Microcavidade cilíndrica ideal: (a) Acoplada em uma chip de acustofluídica ilustrada através da seção transversal. (b) Microcavidade cilíndrica com paredes rígidas de altura L e raio a preenchida com fluido. 23
- 2.2 Fluido submetido a uma tensão de cisalhamento que se deforma continuamente. 23
- 2.3 Plano transversal do chip de acustofluídica com uma microcavidade ilustrada pela cor azul. Na parte superior uma lâmina de vidro e na parte inferior um atuador piezocerâmico (PZT). 29
- 2.4 Plano transversal do chip de acustofluídica com uma microcavidade ilustrada pela cor azul. A microcavidade contém fluido composto por partículas que sofrem a ação da força de radiação acústica primária ocorrendo assim a levitação. 31
- 2.5 Representação da força de radiação acústica secundária através da interação de duas partículas com distância d 31
- 2.6 Plano transversal do chip de acustofluídica com uma microcavidade ilustrada pela cor azul. A microcavidade contém fluido composto por partículas que sofrem a ação da força de radiação acústica secundária ocorrendo assim a aglomeração. 33
- 2.7 Plano transversal da microcavidade cilíndrica (a) Partículas sedimentadas sem ação dos campos acústicos. (b) Partículas aprisionadas pela interação dos campos acústicos, levitação por força primária e aglomeração por força secundária. 34

LISTA DE FIGURAS

3.1	Representação ilustrativa de componentes antigênicos.	36
3.2	Estrutura do anticorpo do tipo imunoglobulina (IgG).	36
3.3	Imunocomplexos de ligação Ag- Ac, denominado por zona de Equivalência.	38
3.4	Região com excesso de antígenos, comprometendo a formação de imunocomplexos.	39
3.5	Região com excesso de anticorpos, ausência da formação de imunocomplexos.	39
3.6	Micropartícula composta por anticorpos aderidos à sua superfície.	40
3.7	Representação ilustrativa do processo de aglutinação.	41
3.8	Representação ilustrativa de aglutinação (a) Aglutinação específica. (b) Aglutinação não específica.	42
3.9	Representação ilustrativa do estágio inicial de imunoaglutinação. Micropartículas conjugadas com anticorpos interagindo através da ligação Ac-Ag.	42
3.10	Representação ilustrativa do estágio inicial de imunoaglutinação com baixa concentração de antígenos. Ensaio do tipo (a) singleto, (b) duplete e (c) triplete.	43
3.11	Representação ilustrativa de um microcanal preenchido por um fluido que transporta micropartículas cujo fluxo é laminar.	46
3.12	Representação ilustrativa de um microcanal preenchido por um fluido com micropartículas que possuem movimento Browniano.	47
3.13	Representação ilustrativa de um microcanal preenchido por um fluido com solução reagente composta por micropartículas conjugadas com anticorpos e componentes antigênicos que possuem movimento Browniano gerando contato entre anticorpos e antígenos proporcionando a formação de complexos.	47
3.14	Representação ilustrativa do ensaios de imunoaglutinação em uma microcavidade acustofluídica. (a) Agregados de micropartículas conjugadas com anticorpos e antígenos saindo do microcanal (sedimentação). (b) Levitação dos agregados devido a ação de forças de radiação acústica primária. (c) Rede de agregados (aglomeração) devido a ação da força de radiação acústica secundária.	49

4.1	A representação do chip de acustofluídica, mostrando a fotografia da parte superior do chip acoplado ao suporte (a) e uma seção transversal do chip (b), com a microcavidade acústica representada pela cor verde-água, a lâmina e o atuador piezoelétrico localizados no topo e no fundo, respectivamente. . .	52
4.2	Configuração instrumental acústica utilizada nos ensaios de imunoaglutinação no chip de acustofluídica.	53
4.3	Configuração instrumental acústica utilizada nos ensaios de imunoaglutinação no chip de acustofluídica no laboratório de acústica física.	53
4.4	Teste de aglutinação Biolátex PCR da empresa Bioclin constituído por regente látex PCR (tampa branca) composto por partículas de látex sensibilizadas com anti-PCR, controle positivo (tampa vermelha) composto por solução aglutinante, controle negativo (tampa azul) composto por salina e placa de teste.	54
4.5	Teste mediante a aglutinação de partículas de látex para determinação da proteína C reativa em lente objetiva de 20x. (a) Painel experimental - Lâmina de fundo preto acoplada ao microscópio óptico. (b) Controle positivo, aglutinação visível caracterizando a reação Ac-Ag mediante a partículas de látex. (c) Controle negativo, ausência de aglutinação, não houve reação Ac-Ag.	55
4.6	Teste mediante a aglutinação de partículas de látex para determinação da proteína C reativa em lente objetivo de 20x. (a) Painel experimental - Chip de acustofluídica de fundo preto acoplada ao microscópio óptico. (b) Controle positivo, aglutinação visível caracterizando a reação Ac-Ag mediante a partículas de látex. (c) Controle negativo, ausência de aglutinação, não houve reação Ac-Ag.	56
4.7	Teste mediante a aglutinação de partículas de látex para determinação da proteína C reativa em lente objetiva de 4x- Controle positivo em respectivos tempo. (a) 30 s, amostra entrando na microcavidade; (b) 1 min; (c) 2 min; (d) 5 min; (e) 9 min; (f) 15 min.	57
4.8	Teste Biolátex PCR- controle negativo em respectivos tempo com lente objetiva de 4x. (a) 30 s, amostra entrando na microcavidade; (b) 1 min; (c) 2 min; (d) 5 min; (e) 9 min; (f) 15 min.	58

4.9	Teste mediante a aglutinação de partículas de látex para determinação da proteína C reativa em lente objetiva de 20x. (a) Zona de equivalência, reagente e controle positivo, ambos sem diluição; (b) Excesso de antígenos - Reagente com diluição 1:4 e controle positivo sem diluição.	59
4.10	Teste mediante a aglutinação de partículas de látex para determinação da proteína C reativa em lente objetiva de 20x. (a) Zona de equivalência - controle positivo e reagente, ambos sem diluição; (b) Excesso de anticorpos - Controle positivo com diluição de 1:4 e reagente sem diluição.	60
4.11	Teste mediante a aglutinação de partículas de látex para determinação da proteína C reativa em lente objetiva de 20x. Diluição seriada 1:1, 1:2 e 1:4, promovendo excesso de antígenos (CP:R) e excesso de anticorpos (R:CP).	61
4.12	Teste mediante a aglutinação de partículas de látex com lente objetiva de 4x para a validação da técnica de acustofluídica através do parâmetro de repetibilidade	62
4.13	Teste mediante a aglutinação de partículas de látex com lente objetiva de 4x para a validação da técnica de acustofluídica através do parâmetro de reprodutibilidade.(a) Operador 1 e chip 1; (b) Operador 2 e chip 1; (c) Operador 1 e chip 2 e (d) Operador 2 e chip 2.	63
4.14	Validação da técnica de acustofluídica através das diluições do reagente Anti-PCR e diluições do controle positivo para o estudo do limite de detecção do sistema	64
4.15	Diluição do reagente Anti-PCR e diluição do controle positivo em um sistema de microscopia óptica composto por lâmina.	65

A detecção precisa de antígenos e anticorpos em amostras biológicas é de fundamental importância para o diagnóstico e tratamento de várias doenças, por exemplo, Covid-19, HIV/AIDS, entre outras. Nos últimos anos, chips de acustofluídicas têm emergido como uma tecnologia promissora para a realização de ensaios de imunoaglutinação, permitindo a detecção eficiente da ligação entre antígenos e anticorpos em amostras biológicas. A acustofluídica é uma técnica que se baseia na utilização de ondas acústicas de alta frequência para criar padrões de fluxo em líquidos contendo partículas, permitindo a manipulação de partículas com base em suas propriedades físicas (LENSHOF; LAURELL, 2010).

Esse método tem sido aplicado em diversas áreas, incluindo a biotecnologia, através da associação com microcanais, manipulação de células biológicas e na aplicação de imunoensaios assistidos por ultrassom. (GUO et al., 2015; HULTSTRÖM et al., 2007; LAURELL et al., 2007; NETO et al., 2015; WIKLUND et al., 2014). Nesse contexto, a realização de ensaios de imunoaglutinação em chips de acustofluídicas representa uma importante contribuição para o desenvolvimento de técnicas acustofluídicas de baixo custo e alta sensibilidade. Nesta dissertação, apresentamos um estudo sobre o uso de chips acustofluídicos para a realização de ensaios de imunoaglutinação, discutindo seus princípios, aplicações e potenciais benefícios para o diagnóstico clínico.

1.1 Imunoaglutinação

A imunologia é uma ciência que estuda o sistema imunológico, suas funções e especificidades. Em 1796, Edward Jenner observou que o vírus *Cowpox* (vírus da varíola bovina) podia proteger contra a varíola humana, realizando o processo de inoculação e denominando-o como vacinação. Na década de 1890, Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato identificaram componentes que se ligam às toxinas, neutralizando suas atividades, os quais foram nomeados como anticorpos (Ac). Devido aos estudos do imunologista russo Elie Metchnikoff, percebeu-se que os anticorpos poderiam ser estimulados contra outras substâncias, conhecidas como antígenos.(ABBAS et al., 2015; MURPHY, 2014; SILVERSTEIN, 2009).

O sistema imunológico sempre despertou a curiosidade dos cientistas, tanto devido à sua complexidade quanto à formação de complexos resultantes das ligações entre anticorpos (Ac) e antígenos (Ag). Devido à formação desses complexos, tornou necessário um estudo aprofundado sobre a reação existente e as condições ideais para que essas ligações ocorram.(JANEWAY C. A., 2001)

A reação entre antígenos e anticorpos começou a ser estudada através do espalhamento de luz na década de 1920, através da formação de imunocomplexos (GOLDSBY et al., 2000; ORTEGA-VINUESA; BASTOS-GONZÁLEZ, 2001). Inicialmente, a principal desvantagem encontrada estava na visualização, já que seria necessária uma grande quantidade de complexos imunológicos para a detecção óptica. Assim, foram estudadas novas técnicas para o aprimoramento da detecção e, conseqüentemente, o aumento da sensibilidade.(MURPHY; WEAVER, 2017)

Para aprimorar essa reação, era necessário utilizar mecanismos que aumentassem a visualização. Foi então que surgiu a ideia de conectar antígenos e anticorpos a partículas apropriadas, de tal modo que quando ocorresse a ligação, essa reação pudesse ser detectada. A partícula geralmente utilizada é o polímero (látex), tecnologia que se tornou bastante pesquisada nos ensaios baseados na reação entre os componentes Ag e Ac.(HERMANSON, 2013)

Em 1956, Singer e Plotz desenvolveram uma nova tecnologia baseada na aglutinação em látex a partir de partículas de polímero. Com base nessa técnica, o primeiro imunoenensaio para detecção do fator reumatoide foi construído.(SINGER; PLOTZ, 1956). Esta tecnologia é utilizada no imunodiagnóstico e deu início à técnica de imunoaglutinação na área de

imunologia clínica, responsável pelas análises laboratoriais conhecidas como ensaios de imunoaglutinação do látex (LIA) ou testes de aglutinação do látex (LAT). (ROITT et al., 2001)

Novas tecnologias e aplicações surgiram após a realização do primeiro imunoensaio de aglutinação. Assim, novas plataformas à base de partículas de látex foram desenvolvidas e ampliadas. Essas plataformas apresentam um crescimento considerável, visto que várias técnicas analíticas estão sendo empregadas para aprimorar a reação entre Ag e Ac. Como resultado, surgiram novos diagnósticos para infecções microbianas, doenças autoimunes, detecção de drogas e proteínas do soro, entre outras aplicações. (MOLINA-BOLÍVAR; GALISTEO-GONZÁLEZ, 2005; WEEMEN; SCHUURS, 1971).

Tais ensaios tornaram-se objeto de estudos para vários pesquisadores, apresentando novos métodos de detecção para doenças. Vinuesa e González relatam que somente na última década, revistas de medicina e veterinária contabilizaram mais de 400 publicações, sendo o teste de imunoaglutinação de látex usado como ferramenta de análise e pesquisa. Atualmente, aproximadamente 300 doenças podem ser detectadas através desta técnica. (ORTEGA-VINUESA; BASTOS-GONZÁLEZ, 2001).

Com o aprimoramento dos testes de aglutinação e a descoberta de novos materiais, esta tecnologia possui atualmente diversas aplicações analíticas, desde laboratórios clínicos de toxicologia e biologia molecular até o controle de produtos farmacêuticos e ambientais. (ELLIS; SOBANSKI, 2000; GRIBNAU et al., 1986; SILVEIRA et al., 2005; TIJSSEN; ADAM, 1991).

Diante das diversas aplicações, vários estudos foram desenvolvidos para quantificação da sensibilidade e especificidade desses testes, a fim de caracterizar suas vantagens e desvantagens. Dentre as vantagens, destacam-se a detecção visual, o baixo custo e a acessibilidade. Entretanto, quanto às desvantagens, esses testes apresentam sensibilidade e especificidade baixas, além da estabilidade da ligação Ag/Ac no suporte utilizado, entre outros fatores. (VAZ et al., 2014).

Com o objetivo de corrigir as desvantagens apresentadas nos testes de aglutinação em látex, o ultrassom está sendo utilizado como uma nova tecnologia para aprimorar essas técnicas. Nos últimos anos, o ultrassom tem se tornado uma ferramenta importante na área de bioanalítica, principalmente para a rápida imunoaglutinação e funcionalização das partículas de látex. (WIKLUND; HERTZ, 2006). Além disso, o ultrassom apresenta

potencial para melhorar o desempenho dos imunoenaios, ao induzir o contato entre as partículas.(WIKLUND et al., 2014).

Estudos relatam que os testes padrão de aglutinação em látex podem não ser quantitativos e podem ser difíceis de interpretar. Portanto, o uso do ultrassom pode ajudar a solucionar os problemas associados a esses testes,induzindo forças de interação atrativas entre estas partículas, aumentando a taxa de ligação entre Ac e Ag. além de contribuir para os laboratórios clínicos com uma tecnologia inovadora.(ELLIS; SOBANSKI, 2000).

Com o surgimento de uma nova tecnologia, vários estudos estão sendo realizados para fortalecer e aprimorar os testes de aglutinação de partículas. Esses estudos se baseiam em novos métodos de diagnóstico para a aglutinação de partículas(ELLIS; SOBANSKI, 2000),como a manipulação de células por ultrassom (HULTSTRÖM et al., 2007) e o aprimoramento de imunoenaios (WIKLUND et al., 2014), entre outros.

1.2 Acustofluídica

Desde o princípio, conhecemos o som, suas características e o presenciamos no cotidiano. Quando falamos de ultrassom, a maioria das vezes pensamos em algo complexo, mas utilizamos esse conceito em diversos momentos. Dentre eles, podemos citar os sensores de estacionamento dos carros e até mesmo as ultrassonografias (CERQUEIRA, 2006). Devido às suas características, o ultrassom apresenta diversas aplicações na engenharia, medicina e em outras áreas. A acústica é a ciência que estuda essas ondas sonoras, suas características e suas aplicações (PIERCE, 2019).

A microfluídica é uma ciência que estuda sistemas com dimensões da ordem de micrômetros (μm). Essa ciência permite a análise de fluidos suspensos em microcanais e tem sido amplamente estudada nas últimas décadas por meio de sistemas de *Lab-on-a-chip*, cujo objetivo é criar laboratórios na superfície de um *micro-chip* (LAURELL; LENSCHOF, 2014). A microfluídica é uma ciência presente no cotidiano e com diversas aplicações práticas, como nos testes de gravidez disponíveis no comércio e nas impressoras de tinta a jato, tornando-se uma ciência prática e com aplicabilidade viável. (STONE et al., 2004)

Com base nos conceitos apresentados, surgiu a área de acustofluídica, que é a junção da acústica em microcanais com dimensões micrométricas. Essa técnica vem sendo desenvolvida em diversos estudos devido à ação de campos acústicos em microcanais,

possibilitando a sedimentação e o alinhamento celular.(COAKLEY et al., 1989), como também a separação de células e partículas (LAURELL et al., 2007). Além das aplicações mencionadas anteriormente, a técnica de acustofluidica tem sido desenvolvida para ensaios de imunoaglutinação, e vem apresentando resultados promissores ao aumentar a colisão entre partículas através dos campos acústicos. Essa tecnologia pode eliminar as limitações existentes nos sistemas atuais e permitir a detecção mais sensível e específica (LI; HUANG, 2018).

1.3 Ensaios de Imunoaglutinação Assistidos por ultrassom

As técnicas de ultrassom para imunoensaios começaram a ser estudadas por volta de 1993, quando foi desenvolvido um transdutor de anel e realizados diversos ensaios de aglutinação em laboratórios de diagnósticos. Verificou-se que as taxas de sucesso dos testes tiveram um aumento significativo com a aplicação do ultrassom, além de uma redução significativa no tempo de realização dos testes. No entanto, não foram quantificadas as sensibilidades dos testes de imunoaglutinação assistidos por ultrassom.(GRUNDY et al., 1993).

Em 1994, Grundy e colaboradores descreveram estudos voltados aos testes de aglutinação em látex (LATS) utilizando um transdutor piezoelétrico tubular. Essa técnica aumenta a sensibilidade desses testes para os antígenos solúveis e particulados. Em comparação com os procedimentos padrões, eles verificaram que os níveis de detecção para os testes de *Proteína C Reativa* (PCR) e *E. coli 0157* foram melhorados (GRUNDY et al., 1994).

Em 1995, Grundy e colaboradores realizaram estudos visando aumentar a sensibilidade dos testes de aglutinação de látex (LATS) para os antígenos de *Candida* e *Aspergillus* utilizando um transdutor piezoelétrico. O objetivo era melhorar o diagnóstico para candidíase sistêmica e aspergilose invasiva. Os resultados desses testes utilizando o ultrassom mostraram um aumento significativo na sensibilidade em comparação com os testes convencionais.

Diante das técnicas descritas sobre o aumento da sensibilidade dos testes de LATS, em 1996 foi realizado um estudo acerca da análise qualitativa e medições quantitativas do tamanho do aglutinado, visto que o mesmo pode ter dependência com a concentração do

analito. As técnicas de análise de imagem foram utilizadas para caracterizar os tamanhos dos aglutinados e os resultados mostraram que há uma relação quase linear entre o tamanho do aglutinado e a concentração de PCR, ou seja, à medida que a concentração de PCR diminui, o tamanho do aglutinado também diminui.(THOMAS; COAKLEY, 1996).

Após várias pesquisas desenvolvidas utilizando o ultrassom para aprimorar os testes convencionais, foi realizado um estudo de avaliação clínica preliminar da doença meningocócica bacteriana utilizando o ultrassom. Neste estudo, observou-se um aumento considerável no diagnóstico da doença em comparação com os testes convencionais que utilizam kits de aglutinação comerciais.(BARNES et al., 1998).

Em 2000, foi estudada a aplicação do ultrassom nos testes de imunoaglutinação com diversas micropartículas de diagnóstico revestidas com anticorpos comerciais. Foi observado que a aglutinação do látex aprimorada por ultrassom proporciona uma alternativa rápida e econômica em relação aos diagnósticos moleculares.(ELLIS; SOBANSKI, 2000).Neste mesmo ano, foi observado que a aglutinação aprimorada por ultrassom também possibilita um indicador de prognóstico rápido, obtendo uma medição sensível do nível de antígeno sérico (SOBANSKI et al., 2000).

A utilização do ultrassom para o aprimoramento dos testes de imunoaglutinação foi verificada também na detecção de antígenos polissacarídeo capsular de *Neisseria meningitidis* a partir do líquido cefalorraquidiano (LCR) e plasma. (PORRITT et al., 2003). Em 2013, Wiklund e colaboradores desenvolveram pesquisas relacionadas ao uso do ultrassom para o aprimoramento de imunoenaios e sensores de células e partículas.Nesta pesquisa, verificou-se que o IMMUNOSONIC, instrumento ultrassônico utilizado na pesquisa, não é adequado como um teste rápido autônomo para diagnóstico da meningite meningocócica e não agrega melhorias à cultura laboratorial. (WIKLUND et al., 2014)

Após as análises, foi observado que os testes de aglutinação em látex resultaram em um método mais simples e direto para a aplicação das técnicas de ultrassom. Nesses testes, o ultrassom auxilia na melhoria da velocidade e da sensibilidade. Além disso, verificou-se que são necessárias investigações aprofundadas, combinadas com modelagem e posteriormente comprovadas com resultados experimentais, para impulsionar o desenvolvimento da técnica do ultrassom como ferramenta de diagnóstico de imunoenaios.(WIKLUND et al., 2014).

Bystryak e Ossina, estudaram um novo método de teste rápido para detectar anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (HIV) em soro ou plasma humano, utilizando um

método de aglutinação de partículas de ultrassom (UPA). O método UPA utiliza um ultrassom de duplo modo para acelerar o processo de aglutinação de látex e, em seguida, desintegrar os agregados não especificamente ligados. A sensibilidade analítica do novo método UPA foi encontrada para ser significativamente maior do que a de três kits comerciais de teste rápido de anticorpos do HIV. O método UPA tem o potencial de ser utilizado para detectar uma variedade de marcadores clinicamente significativos em configurações de atendimento ao paciente (BYSTRYAK; OSSINA, 2017).

1.4 Apresentação Geral do Trabalho

Este trabalho propõe um estudo sobre a interação entre imunoenaios e o ultrassom, investigando as características das reações entre componentes antigênicos e anticorpos sob a ação da força de radiação acústica. Além disso, apresenta um método tecnológico para o aprimoramento dos testes de imunoaglutinação, assim como uma análise da formação dos imunocomplexos dentro de uma microcavidade acústica.

O trabalho está composto da seguinte maneira: No capítulo 1, trataremos de uma revisão histórica dos fenômenos de imunoaglutinação, destacando suas principais características. Além disso, faremos uma descrição da área de acustoflúidica e seus principais conceitos, e abordaremos os imunoenaios assistidos por ultrassom e suas principais contribuições.

No capítulo 2, serão apresentadas as equações fundamentais que embasam o modelo de microcavidade cilíndrica. Serão abordadas as relações fundamentais da dinâmica do fluido, incluindo a propagação de uma onda em um fluido ideal seguindo o modelo de Helmholtz, bem como o modelo de microcavidade cilíndrica empregado neste estudo.

No capítulo 3, abordaremos os ensaios de imunoaglutinação na interação de antígenos e anticorpos por meio da reação que promove aglutinação. Neste capítulo, destacaremos a importância das partículas solúveis nas reações entre antígenos e anticorpos, além dos efeitos da acustoflúidica nesses ensaios.

No capítulo 4, abordaremos como ocorrem os ensaios de imunoaglutinação no dispositivo. Apresentaremos toda a estrutura do dispositivo, o arranjo experimental utilizado e o teste de aglutinação escolhido para a realização da pesquisa. Por fim, apresentaremos os resultados obtidos, comparando-os com o teste convencional utilizado. No último capítulo, o capítulo 5, apresentaremos as principais conclusões do trabalho e as perspectivas de uso do chip de

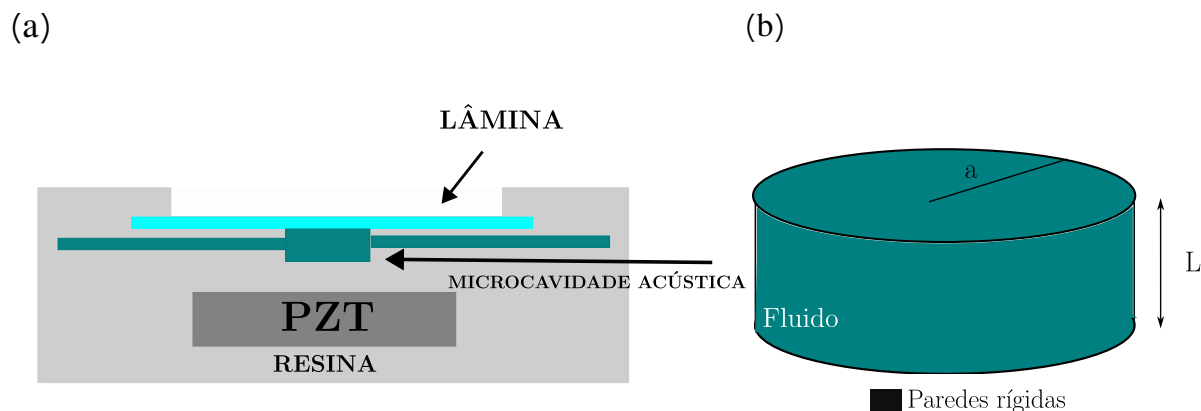
acustofluídica.

Neste capítulo, apresentamos as equações que fundamentam o modelo de microcavidade cilíndrica. Destacamos relações fundamentais da dinâmica de fluidos, como a taxa de variação das densidades de fluxo. Em seguida, realizamos um breve estudo sobre a propagação de uma onda em um fluido ideal seguindo o modelo de Helmholtz. Também apresentamos o modelo de microcavidade cilíndrica utilizado no chip de acustofluídica por meio da ação de campos acústicos, e abordamos a força de radiação acústica que atua neste sistema.

2.1 Dinâmica dos Fluidos

Considere uma microcavidade cilíndrica ideal, cujo volume é fixo e as paredes são perfeitamente isoladas, de modo que não ocorra trocas com o ambiente externo. Este sistema é caracterizado como adiabático. A microcavidade está preenchida com um fluido de densidade e pressão constantes, está acoplada em um chip de acustofluídica, cuja seção transversal está ilustrada conforme a figura 2.1(a), já em 2.1(b) temos a ilustração da microcavidade cilíndrica composta por paredes rígidas preenchida por fluido cujas dimensões correspondem a altura L e raio a .

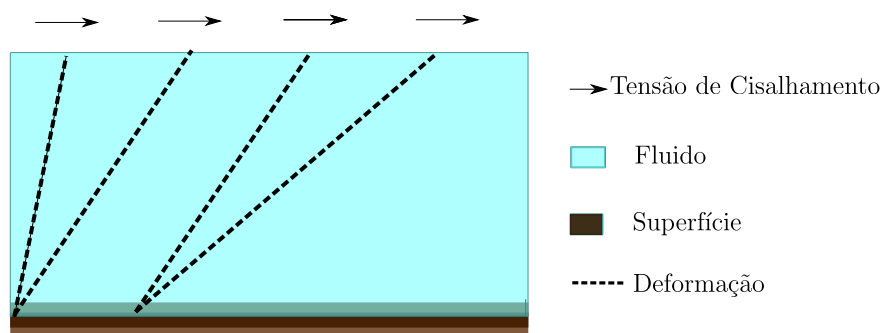
Figura 2.1: Microcavidade cilíndrica ideal: (a) Acoplada em uma chip de acustofluídica ilustrada através da seção transversal. (b) Microcavidade cilíndrica com paredes rígidas de altura L e raio a preenchida com fluido.



Fonte: Autora, 2023.

O fluido (líquido ou gás) pode ser definido como uma substância que, quando submetida a uma tensão de cisalhamento, se deforma continuamente (NGUYEN et al., 2019), figura 2.2. Neste modelo, o fluido contém as mesmas quantidades físicas macroscópicas possuindo uma estrutura contínua, ao invés de uma estrutura composta por moléculas (LANDAU et al., 2021).

Figura 2.2: Fluido submetido a uma tensão de cisalhamento que se deforma continuamente.



Fonte: Autora, 2023.

2.1.1 Equações de Conservação

As equações governantes que regem os sistemas microfluídicos são derivadas das equações fundamentais da taxa de densidade de fluxo. Com intuito de definir as equações de conservação da massa e momento em um sistema cujo volume V_0 seja fixo é conveniente a aplicação das leis físicas.

A conservação da massa é uma ferramenta crucial em sistemas microfluídicos, pois é aplicável ao fluxo de fluidos em canais microfluídicos e pode ser utilizada para compreender a dinâmica dos fluidos nesses sistemas, como descrito em (BRUUS, 2007).

A equação de conservação da massa é escrita como:

$$\partial_t \rho + \nabla \cdot (\rho \mathbf{v}) = 0. \quad (2.1)$$

A conservação do momento em sistemas microfluídicos é descrita utilizando as equações de Navier-Stokes. Essas equações governam o movimento dos fluidos e levam em consideração as forças viscosas e inerciais que agem sobre o fluido. A equação é expressa pela segunda equação de Navier-Stokes, que descreve como a velocidade do fluido muda em resposta às forças que atuam sobre ele. Essa equação relaciona a taxa de variação do momento com as forças que agem sobre o fluido, incluindo a pressão, a viscosidade e quaisquer forças externas que possam estar presentes e é definido por (BRUUS, 2007):

$$\partial_t(\rho \mathbf{v}) + \nabla p - \eta \nabla^2 \mathbf{v} - \beta \eta \nabla(\nabla \cdot \mathbf{v}) - (\partial_t p) \mathbf{v} + \rho \mathbf{v} \cdot \nabla \mathbf{v} = 0. \quad (2.2)$$

2.1.2 Equação de Helmholtz

Nesta seção, demonstraremos a equação de Helmholtz, seguindo a referência de (BRUUS, 2007), para os campos acústicos de pressão, densidade e velocidade, cuja variação temporal harmônica possui frequência angular $\omega = 2\pi f$. Esses fenômenos estão relacionados com a força de radiação acústica (primária e secundária), responsável pela levitação e aglomeração de partículas.

Neste caso, consideraremos um fluido homogêneo no qual a densidade ambiente é descrita por ρ_0 e a pressão ambiente por p_0 , ambos constantes, seguindo os passos descritos em (NETO et al., 2015). Utilizaremos a série de Taylor escrita em torno de ρ_0 e expandiremos a pressão em função da densidade,

$$p - p_0 = \sum_{n=1}^{\infty} (\rho - \rho_0)^n \frac{(\partial_{\rho}^n p)_{\rho_0}}{n!}. \quad (2.3)$$

Pela equação 2.3, observa-se que ∂_{ρ} corresponde às variações de pressão em função da densidade do fluido, o que caracteriza o som, já que essas variações representam as ondas de pressão. Sendo assim, a velocidade do som é definida pela derivada parcial da pressão

em relação à densidade do fluido, representada pela equação 2.4,

$$c_0^2 = (\partial_\rho p)_{\rho_0}. \quad (2.4)$$

Para este sistema, utilizaremos o método de aproximações sucessivas. Com isso, a análise se limita apenas aos fluidos que se movem numa velocidade baixa em comparação com a velocidade do som, o que é descrito através do número Mach (M) (BRUUS, 2007),

$$M = \frac{v_0}{c_0} \ll 1. \quad (2.5)$$

De modo que, tanto a pressão quanto a velocidade são expandidas em potências do parâmetro (M), conforme descrito a seguir:

$$p - p_0 = \sum_{n=1}^{\infty} M^n p^{(n)}, \quad (2.6)$$

$$\rho - \rho_0 = \sum_{n=1}^{\infty} M^n \rho^{(n)}, \quad (2.7)$$

$$\mathbf{v} = \sum_{n=1}^{\infty} M^n \mathbf{v}^{(n)}. \quad (2.8)$$

É importante ressaltar que para as pequenas perturbações acústicas serão utilizadas aproximações lineares tanto para os campos de pressão quanto para a densidade e a velocidade, com $n = 1$.

Feito isso, vamos reescrever a expansão da pressão em função da densidade utilizando a aproximação linear e a expansão de Taylor, descrita na equação 2.3,

$$p^{(1)} = c_0^2 \rho^{(1)}. \quad (2.9)$$

Inicialmente, vamos reescrever os termos correspondentes à pressão em função da densidade, bem como as equações de conservação de massa e momento,

$$p = p(\rho), \quad (2.10)$$

$$\partial_t \rho = -\nabla \cdot (\rho \mathbf{v}), \quad (2.11)$$

$$\rho \partial_t \mathbf{v} = -\nabla p - \rho(\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v} + \eta \nabla^2 \mathbf{v} + \beta \eta \nabla(\nabla \cdot \mathbf{v}). \quad (2.12)$$

Através da teoria de perturbação, podemos definir os campos de densidade, pressão e velocidade com pequena perturbação e substituir as equações de conservação de massa 2.11 e momento 2.12, de modo que,

$$\partial_t \rho^{(1)} = -\nabla \cdot (\rho_0 \mathbf{v}^{(1)}), \quad (2.13)$$

$$\rho_0 \partial_t \mathbf{v}^{(1)} = -c_0^2 \nabla \rho^{(1)} + \eta \nabla^2 \mathbf{v}^{(1)} + \beta \eta \nabla (\nabla \cdot \mathbf{v}^{(1)}). \quad (2.14)$$

Além disso, vamos reescrever as equações 2.13 e 2.14 com o objetivo de uni-las em termos da densidade. Para isso, utilizaremos manipulações matemáticas, aplicando ∂_t em ambos os lados da equação 2.13 e, em seguida, substituindo a equação 2.14,

$$\partial_t^2 \rho^{(1)} = c_0^2 \left[1 + \frac{(1 + \beta)\eta}{\rho_0 c_0^2} \partial_t \right] \nabla^2 \rho^{(1)} \quad (2.15)$$

Substituindo a equação 2.9 na equação 2.15, obtemos:

$$\partial_t^2 p^{(1)} = c_0^2 \left[1 + \frac{(1 + \beta)\eta}{\rho_0 c_0^2} \partial_t \right] \nabla^2 p^{(1)} \quad (2.16)$$

Feito isso, vamos reescrever os campos acústicos com uma dependência temporal harmônica. Para facilitar os cálculos, consideraremos a fase complexa $e^{-i\omega t}$, onde ω é a frequência angular.

Os campos acústicos agora, são definidos como:

$$\rho^{(1)}(\mathbf{r}, t) = \rho^{(1)}(\mathbf{r}) e^{-i\omega t}, \quad (2.17)$$

$$p^{(1)}(\mathbf{r}, t) = p^{(1)}(\mathbf{r}) e^{-i\omega t}, \quad (2.18)$$

$$\mathbf{v}^{(1)}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{v}^{(1)}(\mathbf{r}) e^{-i\omega t}. \quad (2.19)$$

Resolvendo as derivadas e substituindo o campo de pressão descrito na equação 2.18, na equação 2.16, temos:

$$\nabla^2 p^{(1)} = - \left[1 - \frac{i(1 + \beta)\eta\omega}{\rho_0 c_0^2} \right]^{-1} \frac{\omega^2}{c_0^2} p^{(1)}. \quad (2.20)$$

Aqui, iremos definir o fator de amortecimento acústico λ , de modo que, na água, este

fator, em termos de frequência em MHz , corresponde a $\lambda \approx 10^{-5}$,

$$\lambda = \frac{(1 + \beta)\eta\omega}{2\rho_0 c_0^2}, \quad (2.21)$$

$$k = k_0 \sqrt{\frac{1}{1 - 2i\lambda}}, \quad (2.22)$$

neste caso, k é o número de ondas complexo, onde $k_0 = \frac{\omega}{c_0}$.

Podemos ainda, reescrever este número de onda complexo em termos do fator de amortecimento acústico, utilizando a expansão de *Maclaurin*, para o fator de amortecimento pequeno,

$$k = k_0(1 + i\lambda). \quad (2.23)$$

Por fim, chegamos na equação de Helmholtz para o número de onda complexo,

$$\nabla^2 p^{(1)} = -k^2 p^{(1)}, \quad (2.24)$$

$$(\nabla^2 + k^2)p^{(1)}(\mathbf{r}) = 0. \quad (2.25)$$

2.1.3 Solução da Equação de Helmholtz

Para solucionar a equação acima, utilizaremos o método de separação de variáveis, descrito em (KINSLER et al., 2000). Neste caso, utilizaremos o sistema de coordenadas cilíndricas (r, θ, z) . Consideraremos que a parede da microcavidade é rígida e possui simetria axial, de modo que a equação de Helmholtz torna-se:

$$\frac{\partial^2 P}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial P}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 P}{\partial \theta^2} + \frac{\partial^2 P}{\partial Z^2} + k^2 P = 0 \quad (2.26)$$

Esta microcavidade possui raio a e altura L . Pelas condições de contorno da parede rígida, obtemos que :

$$\left(\frac{\partial P}{\partial Z} \right)_{z=0} = \left(\frac{\partial P}{\partial Z} \right)_{z=L} = \left(\frac{\partial P}{\partial r} \right)_{r=a} = 0. \quad (2.27)$$

Pelo método de separação de variável obtemos a solução expressa como:

$$P(r, \theta, Z) = R(r)\Theta(\theta)Z(z)e^{i\omega t}, \quad (2.28)$$

onde $R(r)$, $\Theta(\theta)$ e $(\theta)Z(z)$ representa funções arbitrárias radial, polar e azimutal. Substituindo a equação 2.28 na equação 2.26 e efetuando a divisão por $R(r)\Theta(\theta)Z(z)$, obtemos:

$$\frac{d^2 Z}{dz^2} = -k_z^2 Z, \quad (2.29)$$

$$\frac{d^2 \Theta}{d\theta^2} = -m^2 \Theta, \quad (2.30)$$

$$r^2 \frac{d^2 R}{dr^2} + r \frac{dR}{dr} + (k_r^2 r^2 - m^2) R = 0, \quad (2.31)$$

onde a equação 2.31 é conhecida como equação de Bessel.

Por outro lado, a variável k , possui a seguinte relação:

$$k^2 = k_r^2 + k_z^2. \quad (2.32)$$

De modo que:

$$Z = \cos k_z z, \quad (2.33)$$

$$\Theta = \cos(m\theta), \quad (2.34)$$

$$R = J_r(k_r r). \quad (2.35)$$

Assim, a solução geral é escrita como:

$$P = p_0 J_r(k_r r) \cos(m\theta) \cos k_z z, \quad (2.36)$$

onde, p_0 corresponde a amplitude da onda.

Neste caso, m pode assumir valores inteiros, $m = 0, 1, 2, \dots$, pois Θ deve ter um valor único, para θ constante, $m = 0$. Para componente z, temos que $k_z z = \frac{\pi}{L} z$. Além disso, desprezamos o termo $J_r(K_r r)$ para $r=a$, pois J_r é a constante de Bessel, já que este sistema possui apenas simetria axial, esta constante relaciona sistema que contém simetria radial e p_0 é uma constante. Assim, a solução geral para a microcavidade cilíndrica apresentada será:

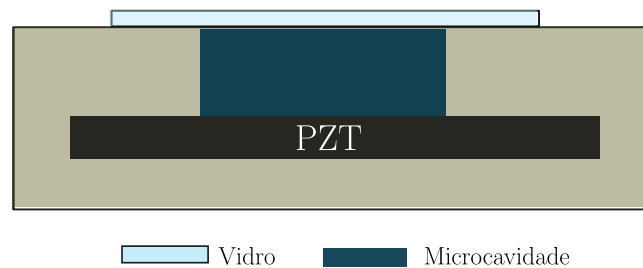
$$P = p_0 \cos\left(\frac{\pi}{L}z\right). \quad (2.37)$$

2.2 Microcavidade Cilíndrica no Chip de Acustofluídica

Neste trabalho, usaremos uma microcavidade cilíndrica similar a de (SANTOS et al., 2021), denominada como câmara acústica. Nesta câmara, iremos assumir que o fluido possui densidade ρ_0 , velocidade v_f , compressibilidade adiabática β_0 e pressão acústica p .

A câmara foi adaptada dentro de um disco cilíndrico fabricado por impressão 3D, com um piezocerâmico de titanato zirconato de chumbo (PZT-8) fixado no fundo e uma lamínula de vidro na parte superior, que funciona como refletor acústico. As paredes da cavidade são rígidas devido à resina utilizada, e ela possui simetria axial e isolamento térmico. Na Figura 2.3, é possível observar a estrutura da microcavidade acoplada ao disco cilíndrico. Essa estrutura foi desenvolvida pelo doutorando Giclênio C. Silva, orientado pelo Prof. Dr. Glauber T. Silva.

Figura 2.3: Plano transversal do chip de acustofluídica com uma microcavidade ilustrada pela cor azul. Na parte superior uma lâmina de vidro e na parte inferior um atuador piezocerâmico (PZT).



Fonte: Autora, 2023. Adaptado de (SANTOS et al., 2021).

2.2.1 Força de Radiação Acústica Primária

Agora iremos calcular a força de radiação acústica no interior desta microcavidade cilíndrica. Para isso, vamos considerar partículas esféricas imersas no fluido e que, através da ação dos campos acústicos, são suspensas. A força de radiação acústica já está definida na literatura em relação ao gradiente do potencial acústico U^{rad} . (BARMATZ; COLLAS,

1985; BARMATZ; COLLAS, 2016; BRUUS, 2012; SANTOS et al., 2021; SETTNES; BRUUS, 2012). Assim,

$$\mathbf{F}_{\text{rad}} = -\nabla U^{\text{rad}}. \quad (2.38)$$

O potencial acústico foi introduzido por Gor'kov (GOR'KOV, 1962). Para a microcavidade cilíndrica utilizada, vamos escrever este potencial em termos do raio da partícula esférica a , da densidade ρ e da compressibilidade adiabática β_0 (SILVA; BRUUS, 2014),

$$U^{\text{rad}} = \frac{4\pi}{3} a^3 \left(\frac{f_0}{2} \beta_0 |p|^2 - \frac{3}{4} f_1 \rho_0 |\mathbf{v}|^2 \right), \quad (2.39)$$

Aqui, f_0 e f_1 correspondem aos coeficientes que representam os fatores de compressão e contraste entre o fluido e o objeto. Além disso, consideramos que o raio da partícula a é muito menor que o comprimento de onda acústica, $a \ll \lambda$ (SANTOS et al., 2021).

Podemos ainda demonstrar o potencial para o sistema utilizado. Para isso, vamos determinar $|p|^2$ e $|\mathbf{v}|^2$, aplicando as condições estabelecidas no sistema, logo,

$$U^{\text{rad}} = \frac{p_0^2 \pi a^3}{\rho_0 c_0^2} \left[\frac{1}{3} f_0 \cos^2 \left(\frac{\pi}{L} z \right) - \frac{1}{2} f_1 \sin^2 \left(\frac{\pi}{L} z \right) \right].$$

Após determinar o potencial no interior da microcavidade, podemos então demonstrar a força de radiação primária para a microcavidade estabelecida no sistema. Esta força é escrita como:

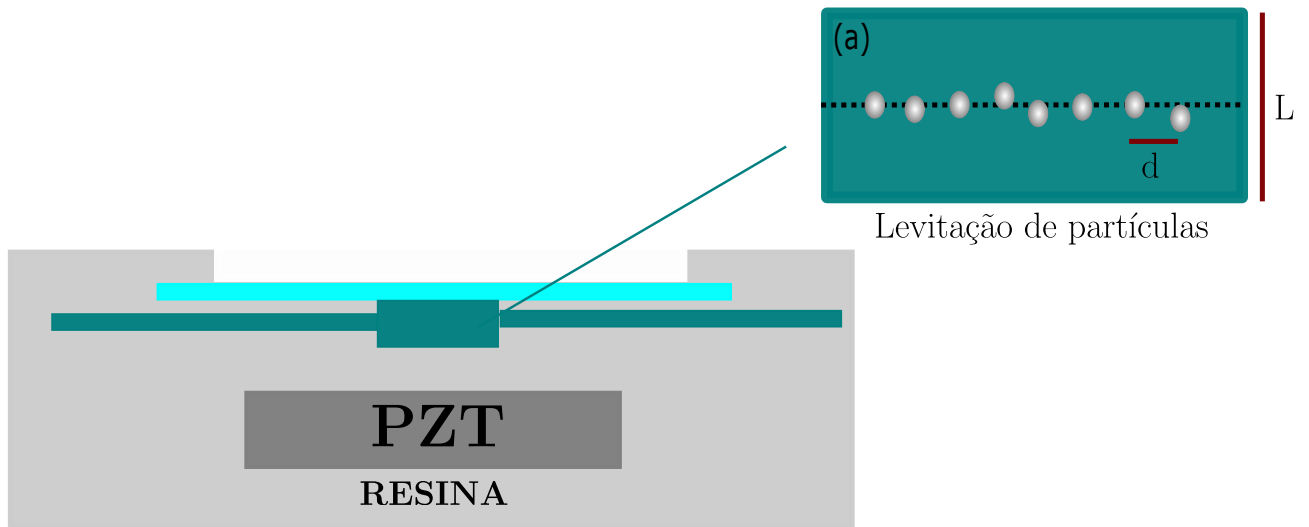
$$F^{\text{rad}} = \frac{p_0^2 \pi^2 a^3}{6 \rho_0 c_0^2 L} \sin \left(\frac{2\pi}{L} z \right) (2f_0 + 3f_1).$$

Observamos ainda que esta força promove a levitação dos objetos no interior da microcavidade, sendo que o plano de levitação ocorre em:

$$z = \frac{L}{2} \quad (\text{nó de pressão}) \Rightarrow F^{\text{rad}} = 0.$$

Na figura 2.4 ilustramos o plano transversal do chip de acustofluídica cuja microcavidade cilíndrica esta acoplada ao chip e preenchida por fluido composto por partículas. A força de radiação acústica primária é propagada no interior da microcavidade fazendo com que as partículas levitem ficando aprisionadas no nó ou anti-nó de pressão, cuja distância inter-partícula é representada por d .

Figura 2.4: Plano transversal do chip de acustofluídica com uma microcavidade ilustrada pela cor azul. A microcavidade contém fluido composto por partículas que sofrem a ação da força de radiação acústica primária ocorrendo assim a levitação.

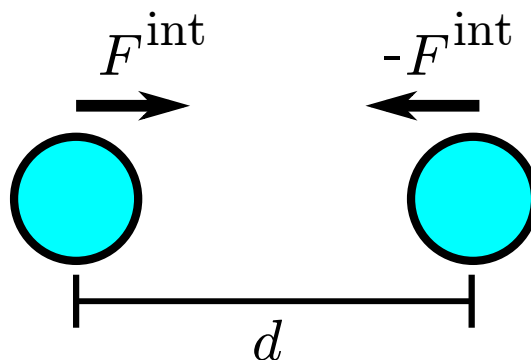


Fonte: Autora, 2023.

2.2.2 Força de Radiação Acústica Secundária

A força de radiação acústica secundária (SANTOS et al., 2021) é responsável pelo mecanismo de aglutinação neste sistema. Essa força define a interação acústica entre as partículas devido ao reespalhamento quando duas ou mais partículas estão próximas no plano nodal (LOPES et al., 2015; SILVA; BRUUS, 2014). Trata-se de uma força atrativa e responsável pelo mecanismo de aglutinação na microcavidade, esta interação está ilustrada na figura 2.5.

Figura 2.5: Representação da força de radiação acústica secundária através da interação de duas partículas com distância d .



Fonte: Autora, 2023.

A força de radiação acústica secundária é escrita com relação ao gradiente transversal ∇_{\perp} (SILVA; BRUUS, 2014),

$$\mathbf{F}^{\text{int}} = -\nabla_{\perp} U^{\text{int}}. \quad (2.40)$$

Já o potencial é descrito em termos do raio da partícula a , do coeficiente f_1 e da parte real de uma determinada função complexa do produto escalar entre a velocidade do fluido na microcavidade \mathbf{v}_f e a velocidade da onda espalhada \mathbf{v}_e (SILVA; BRUUS, 2014; SANTOS et al., 2021). Logo:

$$U^{\text{int}} = -\pi a^3 f_1 \rho_0 \text{Re}[\mathbf{v}_f \cdot \mathbf{v}_e]. \quad (2.41)$$

Vamos considerar a velocidade $\mathbf{v}_e \sim \frac{a^3 f_1 |\mathbf{v}_f|^2}{r^3}$ (PIERCE, 2019) e (SANTOS et al., 2021). Como as variações transversais são as únicas contribuições dos determinados campos acústicos e estas são da ordem do raio da microcavidade. Assim, a força de radiação acústica secundária é definida por (SANTOS et al., 2021):

$$\mathbf{F}^{\text{int}} = |\nabla_{\perp} U^{\text{int}}|_{r=d}, \quad (2.42)$$

$$\mathbf{F}^{\text{int}} \sim \pi a^6 f_1^2 \rho_0 |\mathbf{v}|^2 / d^4, \quad (2.43)$$

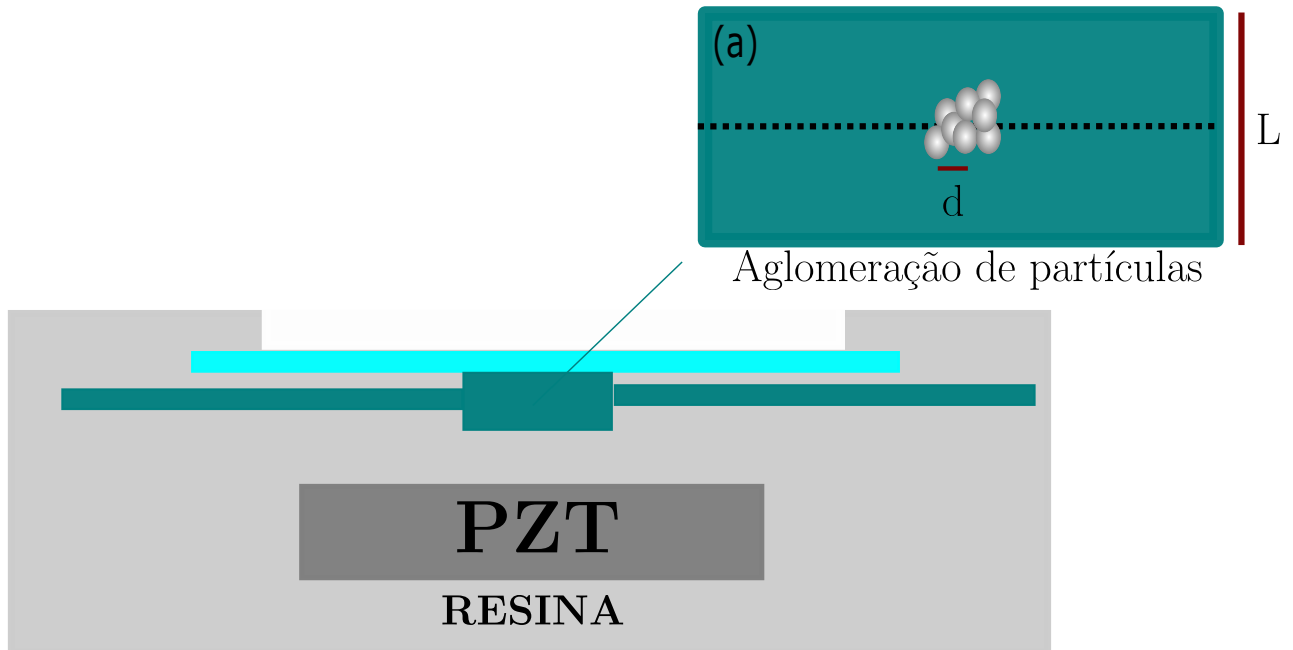
sendo d é a distância inter-partícula.

Para microcavidade utilizada neste sistema, a força de radiação acústica secundária no plano de levitação em $z = L/2$ é descrita pela equação 2.44.

$$\mathbf{F}^{\text{int}} = -\frac{p_0^2 \pi a^6 f_1}{2 \rho_0 c_0^2 d^4}. \quad (2.44)$$

Esta força está ilustrada na figura . Observa-se que após a ação da força de radiação primária que promove a levitação das partículas, a onda é espalhada gerando uma força de radiação secundária, sendo uma força atrativa, considerada forte, gerando aglomeração das partículas no plano de levitação, de modo que, a distância enter- partícula seja cada vez menor.

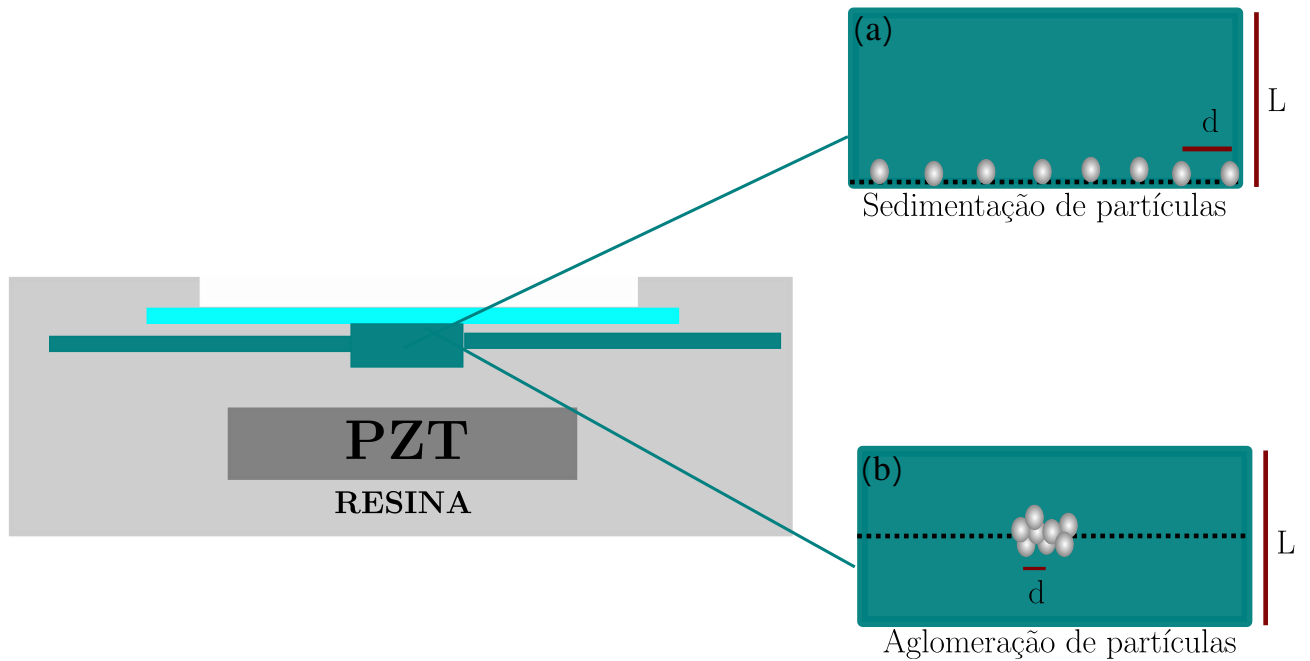
Figura 2.6: Plano transversal do chip de acustofluídica com uma microcavidade ilustrada pela cor azul. A microcavidade contém fluido composto por partículas que sofrem a ação da força de radiação acústica secundária ocorrendo assim a aglomeração.



Fonte: Autora, 2023.

Na figura 2.7 observa-se a ação das forças de radiação (primária e secundária) no interior da microcavidade. Em 2.7(a), não existem ação de nenhuma força de radiação, de modo que as partículas ficam sedimentadas no fundo da microcavidade. Já em 2.7(b), a força de radiação acústica primária age sobre as partículas, ocorrendo assim a levitação e devido ao reespalhamento da onda em função da interação entre as partículas, a força de radiação acústica secundária promove a aglomeração no plano de levitação aprisionando-as na microcavidade.

Figura 2.7: Plano transversal da microcavidade cilíndrica (a) Partículas sedimentadas sem ação dos campos acústicos. (b) Partículas aprisionadas pela interação dos campos acústicos, levitação por força primária e aglomeração por força secundária.



Fonte: Autora, 2023.

No próximo capítulo, abordaremos a reação que ocorre nos ensaios de imunoadglutinação por meio das ligações não covalentes entre antígenos e anticorpos no chip de acustofluídica, enfatizando a influência da força de radiação acústica na microcavidade cilíndrica nesses componentes.

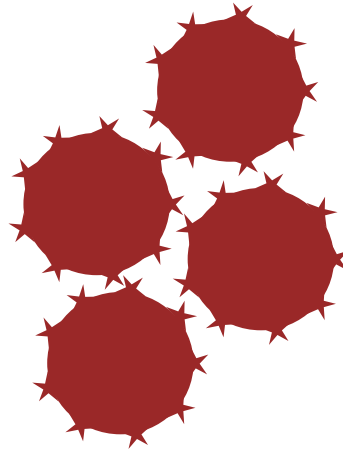
Ensaio de imunoaglutinação são baseados na interação molecular entre antígenos e anticorpos (Ag-Ac). A reação promovida pela interação é denominada aglutinação, que ocorre através da formação de agregados visíveis de componentes antigênicos e partículas insolúveis compostas por anticorpos.

A seguir, abordaremos as características dos anticorpos e antígenos e a reação que ocorre entre ambos. Também trataremos dos ensaios de imunoaglutinação, destacando a utilização de partículas insolúveis. Por fim, discutiremos os efeitos da acustofluidica nesses ensaios.

3.1 Interação Antígeno-Anticorpo (Ag–Ac)

Para estudar a interação entre antígeno e anticorpo, é necessário definir as características dos componentes dessa interação. Esses componentes estão relacionados com a resposta imunológica do corpo humano.

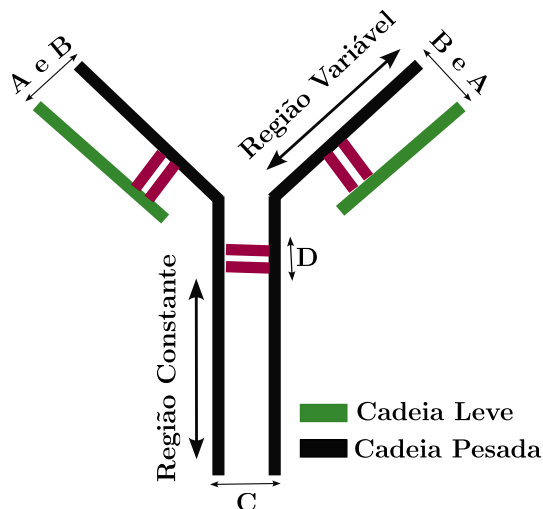
Denominamos antígenos (Ag) toda estrutura celular, substância solúvel ou particulada que pode ser especificamente ligada por um anticorpo (MOLINARO, 2009). Os antígenos possuem características de ligação através do componente antigênico, induzindo a criação de anticorpos e ativando ou não o sistema imune (VAZ et al., 2014). São representados por vírus, parasitas, fungos e bactérias (RODRIGUES, 2012). A figura 3.1 apresenta uma representação ilustrativa de um antígeno.

Figura 3.1: Representação ilustrativa de componentes antigênicos.

Fonte: Autora, 2023.

Os anticorpos, por sua vez, têm a representação de uma molécula em formato de Y e são produzidos como resposta imune aos antígenos (VAZ et al., 2014). Dentre os cinco principais tipos de anticorpos, destacam-se as imunoglobulinas G (IgG) (ABBAS et al., 2015).

Os anticorpos do tipo IgG possuem uma estrutura composta por duas regiões, sendo a primeira considerada variável e a segunda constante. Além disso, possuem braços idênticos que constituem as regiões de ligação com os componentes antigênicos, chamados de A e B, e uma base C (MOLINARO, 2009). A molécula é composta por dois eixos de simetria, chamados na literatura de cadeias leves e pesadas, que contribuem para a especificidade de ligação entre antígenos e anticorpos. Essas cadeias são interligadas por uma região chamada de dobradiça (D) (MURPHY, 2014). A Figura 3.2 ilustra a estrutura do anticorpo do tipo IgG.

Figura 3.2: Estrutura do anticorpo do tipo imunoglobulina (IgG).

Fonte: Autora, 2023.

As cadeias leves e pesadas, denominadas por A e B, respectivamente, são regiões de ligação com

antígenos. A região D possibilita a rotação de uma parte da estrutura em relação a outra, sendo uma região flexível. A estrutura do anticorpo é propícia para interação com componentes antigênicos, desde que este favoreça a complementaridade com o anticorpo. (MURPHY, 2014; ABBAS et al., 2014)

Sendo assim, as interações entre os antígenos e anticorpos são consideradas multivalentes, ou seja, os componentes antigênicos têm a capacidade de se ligarem com anticorpos, gerando uma reação no sistema imune e a formação de imunocomplexos (ABBAS ABUL K E LICHTMAN, 2019). Esses imunocomplexos não são visíveis e sua interação é considerada reversível e não covalente, ou seja, uma reação fraca (RODRIGUES, 2012).

Considerando uma reação reversível, podemos escrever a interação Ac- Ag através de uma constante intrínseca de associação k_A . Para isto iremos seguir o modelo descrito em (VAZ et al., 2014; WIKLUND, 2004).

A ligação Ac-Ag é definida como:



sendo, $[A_G]$ e $[A_C]$ concentrações de antígenos e anticorpos livres, respectivamente, e k_A constante intrínseca de associação.

No modelo citado, a constante intrínseca de associação (k_A) é utilizada para descrever a afinidade de ligação entre o anticorpo (Ac) e o antígeno (Ag), ou seja, é uma medida da força com que o anticorpo se liga ao antígeno. Quanto maior o valor de k_A , maior é a afinidade de ligação e, portanto, menor é a concentração necessária de anticorpo para se ligar a uma determinada quantidade de antígeno. Essa constante é fundamental para entender e quantificar as interações entre anticorpos e antígenos, o que é essencial em diversas aplicações na área da imunologia e diagnóstico (KLOTZ, 1997).

k_A é representada por:

$$k_A = \frac{[A_G - A_C]}{[A_G] + [A_C]}, \quad (3.2)$$

aqui, $[A_G - A_C]$ representa a concentração de imunocomplexos formado.

Nota-se que a concentração de antígenos aumenta na mesma proporção que a concentração de anticorpos diminui e que k_A é diretamente proporcional à concentração de imunocomplexos formados, de modo que quanto maior for essa constante, maior será a concentração de complexos formados.

Nessa interação, também iremos considerar a constante intrínseca de dissociação k_D , definida como:

$$k_D = \frac{[A_G][A_C]}{[A_G - A_C]}. \quad (3.3)$$

A constante intrínseca de dissociação, k_D , é o valor numérico da concentração de antígeno que faz com que metade dos sítios de ligação dos anticorpos estejam ocupados. Em outras palavras, representa a medida da afinidade entre um anticorpo e um antígeno. Quanto menor o valor de k_D , maior a afinidade do anticorpo pelo antígeno. A equação 3.3 relaciona a constante de dissociação com as concentrações de antígeno, anticorpo e imunocomplexo formado. Quanto menor o valor de k_D , maior a estabilidade do complexo formado entre o anticorpo e o antígeno (BERG, 2021; NELSON; COX, 2022; SHEEHAN, 2013).

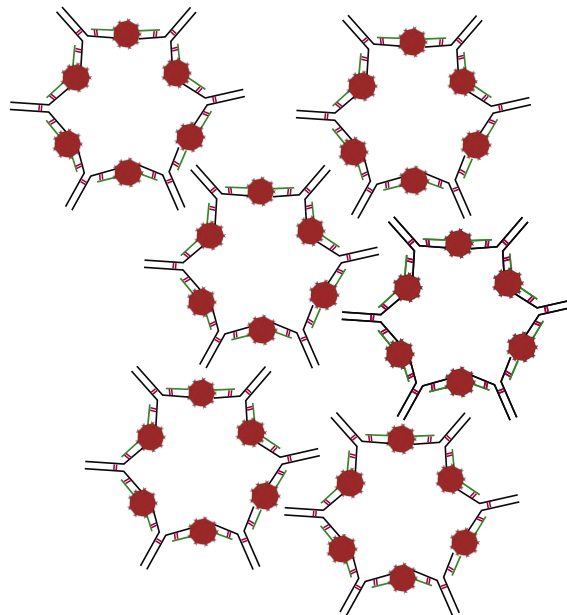
Onde:

$$[A_G] \rightarrow \frac{1}{[A_C]}. \quad (3.4)$$

Quando a concentração de antígenos livres for igual à constante intrínseca de dissociação, metade dos antígenos estarão ligados aos anticorpos. Esse evento está relacionado ao grau de afinidade na ligação Ag-Ac.

Considerando a interação Ag-Ac, podemos analisar três situações pertinentes relacionadas à reação de ligação e formação de imunocomplexos (VAZ et al., 2014). A primeira situação é conhecida como zona de equivalência e está relacionada a uma rede estável formada pela ligação de antígenos e anticorpos. Esta rede está ilustrada na figura 3.3. Nela, observa-se que todos os antígenos estão ligados aos anticorpos, formando imunocomplexos (JANEWAY C. A., 2001).

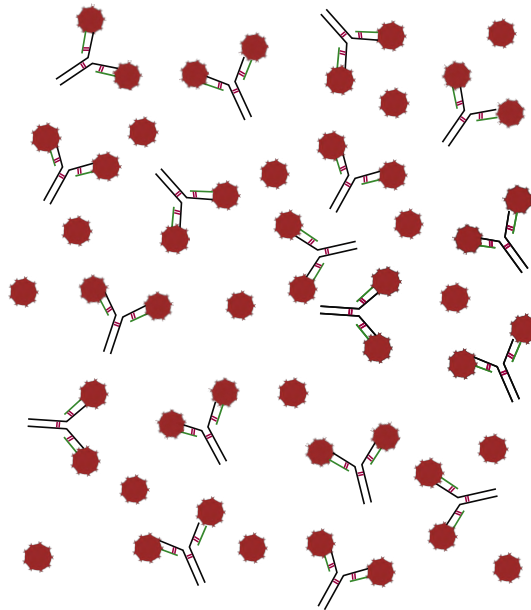
Figura 3.3: Imunocomplexos de ligação Ag- Ac, denominado por zona de Equivalência.



Fonte: Autora, 2023.

Agora, vamos considerar uma região em que o antígeno esteja em excesso. Nessa situação, os anticorpos estarão livres para se conectarem aos antígenos, e a formação de imunocomplexos estará comprometida, sendo possível apenas a ligação de um anticorpo com dois componentes antigênicos, conforme ilustrado na figura 3.4.

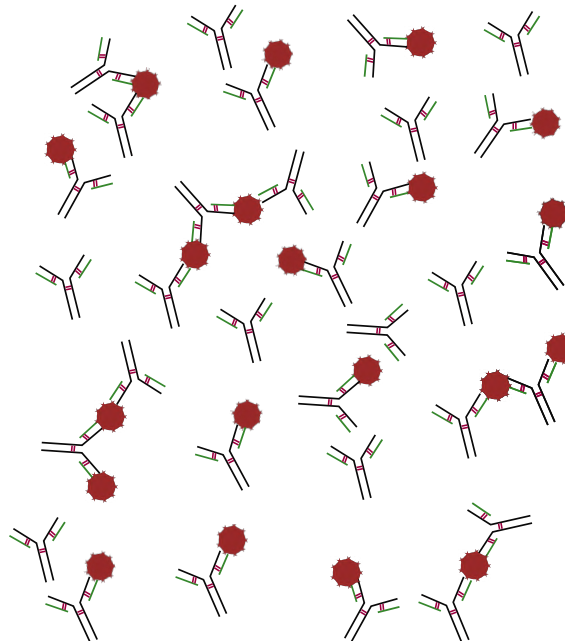
Figura 3.4: Região com excesso de antígenos, comprometendo a formação de imunocomplexos.



Fonte: Autora, 2023.

A última situação que deve ser considerada é quando a quantidade de anticorpos for maior do que a de antígenos. Nessa situação, haverá uma diminuição na formação de imunocomplexos, e os antígenos estarão ligados aos anticorpos, mas ainda haverá anticorpos livres, como ilustrado na figura 3.5.

Figura 3.5: Região com excesso de anticorpos, ausência da formação de imunocomplexos.



Fonte: Autora, 2023.

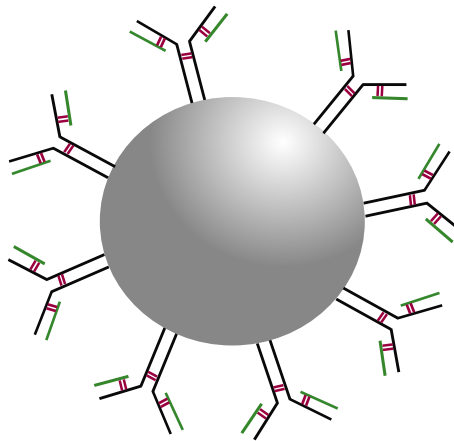
A reação estabelecida entre Ag-Ac está relacionada a alguns fatores determinantes, dentre eles destacamos o pH, temperatura e tipo de solvente, todos podem interferir nesta interação, de maneira que

devem ser mantidos constantes. A seguir, daremos continuidade ao estudo desta reação, porém agora consideraremos partículas que auxiliam na interação Ag-Ac, tornando a reação visível(PUNT, 2018).

3.2 Ensaios de Imunoaglutinação

Os ensaios de imunoaglutinação são caracterizados pela presença da reação Ac-Ag por intermédio de partículas insolúveis (VAZ et al., 2014; HERMANSON, 2013). Nessa técnica, anticorpos ou antígenos são aderidos à superfície da micropartícula, possibilitando melhores resultados em relação à leitura visual. Para este trabalho, consideraremos que os anticorpos são artificialmente absorvidos pelas micropartículas, aderindo à sua superfície, como ilustrado na figura 3.6.

Figura 3.6: Micropartícula composta por anticorpos aderidos à sua superfície.

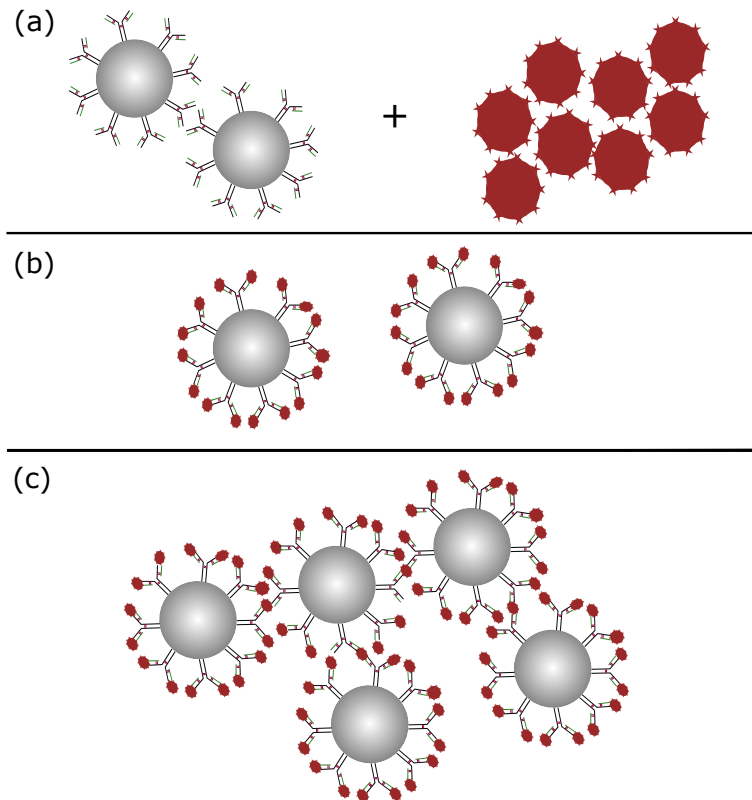


Fonte: Autora, 2023.

Nestes ensaios, as micropartículas são de extrema importância e são utilizadas desde a década de 1950 com a criação do teste de aglutinação (SINGER; PLOTZ, 1956). As micropartículas de látex e/ou poliestireno são as mais usadas para este ensaio, isso ocorre devido às características relacionadas à uniformidade, densidade, propriedades hidrofóbicas, pH, entre outras(WIKLUND, 2004).

Diante das características citadas, os ensaios de imunoaglutinação procedem através das técnicas de aglutinação, que são estabelecidas pela formação de imunocomplexos formados pela ligação entre partícula, anticorpo e antígeno. Esse é o princípio dos testes de aglutinação (VAZ et al., 2014).

O formato deste teste é caracterizado pela formação de aglomerados, sendo possível visualizá-los a olho nu devido à utilização de micropartículas. Estas aumentam a relação superfície-volume, o que possibilita maior concentração do componente e conseqüentemente melhora a visualização (WIKLUND, 2004).Na figura 3.7, é possível observar as três etapas que caracterizam a técnica de aglutinação: (a) anticorpos conjugados à superfície da micropartícula e antígenos; (b) antígenos ligados a anticorpos na superfície da micropartícula; (c) complexos (Ac-Ag) mediados micropartículas, formando aglomerados visíveis.

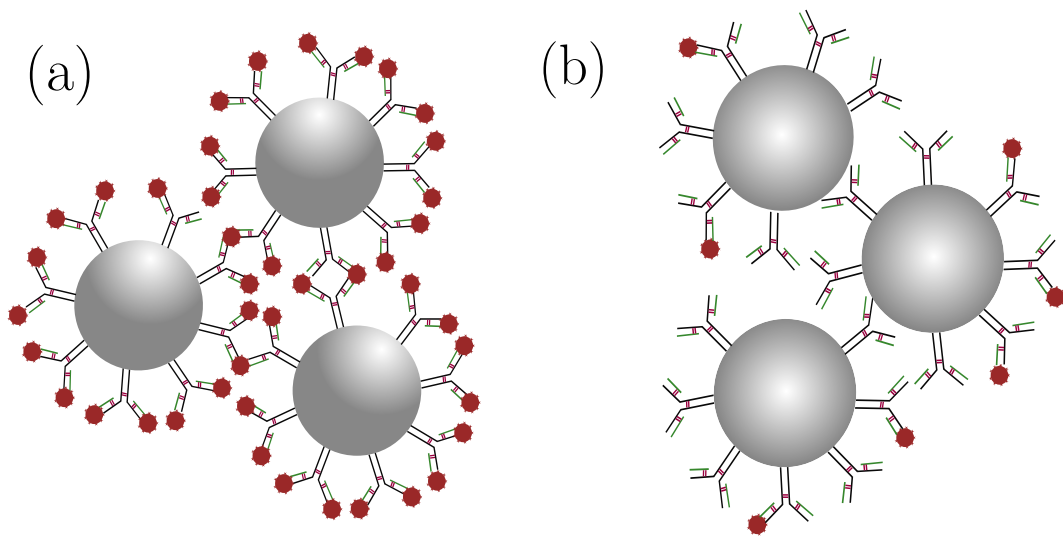
Figura 3.7: Representação ilustrativa do processo de aglutinação.

Fonte: Autora, 2023.

Nos testes de imunoaglutinação, é necessário avaliar alguns fatores que influenciam a formação dos complexos, como a temperatura, o tempo, a quantidade de anticorpos presentes nas micropartículas, sua natureza e a presença de macromoléculas que interferem nos eventos de ligação (VAZ et al., 2014). Portanto, essa técnica é considerada de baixo custo, possui execução fácil e é acessível para o diagnóstico laboratorial. Porém, sua sensibilidade é baixa.

Nesses testes, as aglutinações podem ocorrer de duas formas: aglutinação específica (A_E) e aglutinação não específica (A_{NE}). A aglutinação específica ocorre quando os anticorpos específicos se ligam aos antígenos correspondentes, o que é uma reação esperada no processo de aglutinação. Já a aglutinação não específica é caracterizada pela ligação indesejada, ou seja, ocorrem eventos de ligação do tipo partícula-partícula, devido às propriedades hidrofóbicas das partículas em soluções aquosas, e como consequência, a sensibilidade dos testes diminui. Na figura 3.8, ilustramos (a) aglutinação específica e (b) aglutinação não específica.

Figura 3.8: Representação ilustrativa de aglutinação (a) Aglutinação específica. (b) Aglutinação não específica.

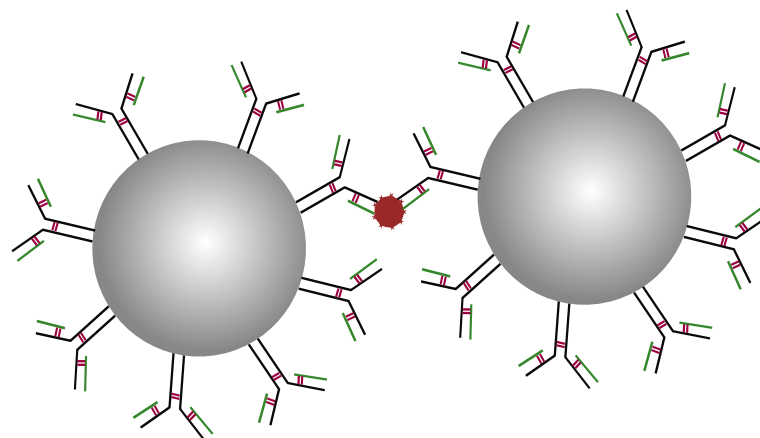


Fonte: Autora, 2023.

Na seção anterior, discutimos a reação Ac-Ag. Aqui, vamos abordar as reações de ligação entre anticorpos na superfície das partículas (L_i) conectados com antígenos que também estão ligados a anticorpos de outra partícula (L_j). Este modelo corresponde à fase inicial da imunoaglutinação e é descrito por (WIKLUND, 2004).

Vamos considerar um caso discreto em que a partícula L_i está conjugada ao anticorpo e se liga ao antígeno. Por outro lado, a partícula L_j possui anticorpos em sua superfície, de modo que L_i e L_j são conectadas através da ligação Ag (L_i)-Ac (L_j). Esse processo é considerado irreversível e é ilustrado na figura 3.9.

Figura 3.9: Representação ilustrativa do estágio inicial de imunoaglutinação. Micropartículas conjugadas com anticorpos interagindo através da ligação Ac-Ag.



Fonte: Autora, 2023.

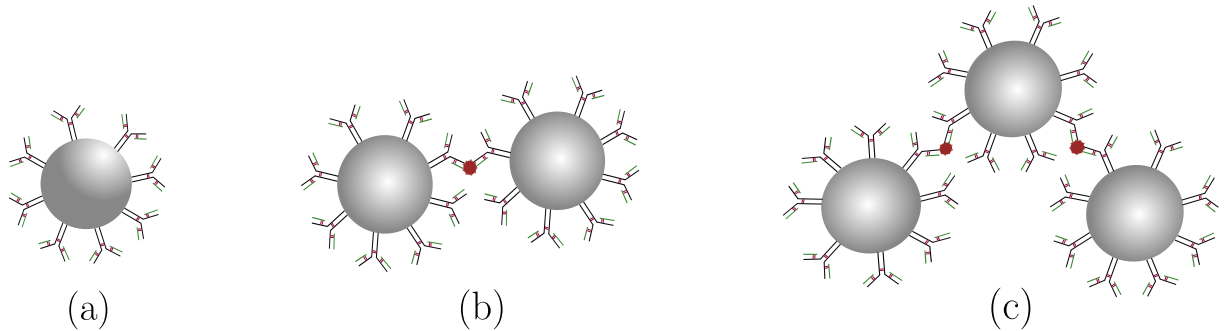
O estágio inicial de imunoaglutinação é escrito através da ligação entre as partículas (L_i) e (L_j), sendo,

i e j o número de interações Ac-Ag em cada partícula. Assim, esta reação é definida como:



A imunoaglutinação de partículas, no caso discreto, pode ser representado pelo ensaio de dupletos, figura 3.10(b), relacionando pares de partículas e baixas concentrações de antígenos, com isso, este formato possibilita alta sensibilidade. O processo de imunoaglutinação inicia através da partícula simples no formato singleto, figura 3.10(a), interagindo com outra partícula, ensaio duplo do tipo duplete, figura 3.10(b) e assim consequentemente, gerando ensaios do tipo tripleto, figura 3.10(c) (WIKLUND, 2004). Estes ensaios tem um grande potencial uma vez que possibilita o estudo de pequenas concentrações do analito, ou seja, o alvo (antígeno ou anticorpo) num ensaio de imunoaglutinação.

Figura 3.10: Representação ilustrativa do estágio inicial de imunoaglutinação com baixa concentração de antígenos. Ensaios do tipo (a) singleto, (b) duplete e (c) tripleto.



Fonte: Autora, 2023.

Nesse contexto, assumiremos que a ligação entre Ac-Ag, discutida na seção anterior através da equação 3.1, é mais forte do que a ligação entre partícula-partícula ($L_i - L_j$) e que está em equilíbrio. Dessa forma, a quantidade de complexos Ac-Ag na superfície da partícula pode ser representada por:

$$N_{AcAg} = \frac{A_G N_A}{k_D}, \quad (3.6)$$

onde, A_G , corresponde a quantidade de antígeno livre, N_A , a quantidade de anticorpos livres na superfície da partícula e k_D a constante de dissociação. Quanto menor for a constante de dissociação, maior será a afinidade entre Ac e Ag, o que leva a uma maior quantidade de complexos formados para uma dada concentração de Ac e Ag.

Ainda é possível definir a quantidade máxima de complexos Ac - Ag na superfície da partícula (I_0) através da concentração inicial de anticorpos na superfície da partícula conectados ao antígeno ($n_{0_{Ac-Ag}}$) e a capacidade máxima de ligação das partículas (N_{max}),

$$I_0 = n_{0_{Ac-Ag}} N_{max}, \quad (3.7)$$

sendo, N_{max} definido como:

$$N_{max} = N_{Ac} + N_{Ac-Ag}. \quad (3.8)$$

Para processos considerados irreversíveis, como a ligação entre partícula- partícula, ilustrada na figura 3.8 - (b), o modelo é descrito através da cinética de coagulação de Smoluchowski, equação 3.9 (COSTA, 2009; SMOLUCHOWSKI, 1918),

$$\frac{dn_i}{dt} = - \sum_{j=1}^{\infty} k(i,j)n_i n_j + \frac{1}{2} \sum_{j=1}^{i-1} k(j,i-j)n_j n_{i-j}. \quad (3.9)$$

Para o caso representado na figura 3.10, o estágio inicial de imunoaglutinação do tipo singlete, duplete e triplete, a equação 3.9 é descrita como:

$$\frac{dn_1}{dt} = -k(1,1)n_1^2 - k(1,2)n_1 n_2 - k(1,3)n_1 n_3, \quad (3.10)$$

$$\frac{dn_2}{dt} = \frac{1}{2}k(1,1)n_1^2 - k(1,2)n_1 n_2 - k(2,2)n_2^2 - k(2,3)n_2 n_3, \quad (3.11)$$

$$\frac{dn_3}{dt} = k(1,2)n_1 n_2 - k(1,3)n_1 n_3 - k(2,3)n_2^2 - k(3,3)n_3^2, \quad (3.12)$$

onde n_i é a concentração de aglomerados contendo i partículas, neste caso, $i = 1$ para o tipo singlete, $i = 2$ para duplete e $i = 3$ para triplete.

A equação que descreve a probabilidade de colisões de partículas (L_i) e (L_j) por unidade de tempo e unidade de concentração é representada por k_{ij} . No caso das aglutinações específicas o modelo é escrito através da constante $k(i,j)$ (SUROVTSEV et al., 2003),

$$k(i,j) = \left(\frac{1}{ijc_h(i,j)\beta} + 1 \right) k_D(1,1), \quad (3.13)$$

onde, $k_D(1,1)$ corresponde a uma constante de taxa por difusão(para pequenos aglomerados),

$$k_{(D)} = \frac{8k_B T}{3\eta}. \quad (3.14)$$

Através da constante $k(i,j)$, podemos observar que a formação de aglomerados depende da temperatura e da viscosidade do meio. Em um sistema de pequenas partículas que é afetado por variações de temperatura, a constante de velocidade $k(i,j)$ aumenta devido às colisões entre as partículas. Por outro lado, quando analisamos a viscosidade do meio, observa-se que a constante de velocidade tende a ser menor em meios mais viscosos, demonstrando que $k(i,j)$ é inversamente proporcional à viscosidade.

A probabilidade aglutinação em cada colisão de partícula é representada por β (SUROVTSEV et al., 2003), como:

$$\beta = (N_{Ac}N_{Ac-Ag}) \frac{b^3}{8R^3}. \quad (3.15)$$

Considerando que b é o raio do sítio de ligação e R é o raio da partícula, observa-se que a probabilidade de aglutinação específica depende dos sítios de ligação formados pela interação entre Ac e Ag . Caso

a superfície da partícula seja grande, essa probabilidade diminui. Por outro lado, se a quantidade de partículas com anticorpos livres e a concentração inicial de anticorpos na superfície da partícula conectados ao antígeno for máxima, a probabilidade de aglutinação também será máxima.

Agora, considerando que a aglutinação não específica é independente da quantidade de complexos Ac-Ag formados na superfície das partículas, $k(i,j)$ em cada colisão de partículas relaciona as aglutinações específicas e não específicas (WIKLUND, 2004),

$$k(i,j) = \left(\frac{1}{\alpha + ij c_h(i,j)\beta} + 1 \right) k_D(1,1), \quad (3.16)$$

sendo α a probabilidade não específica, esta equação fornece informações sobre a sensibilidade de um ensaio de imunoaglutinação. Por sua vez, o limite de detecção pode ser estabelecido quando α e β forem iguais (WIKLUND, 2004). Na próxima seção, abordaremos os efeitos da acustofluídica em ensaios de imunoaglutinação, destacando os conceitos relacionados à microfluídica e como esta nova tecnologia contribui para esses ensaios.

3.3 Efeitos da acustofluídica em ensaios de imunoaglutinação

Os efeitos da acustofluídica em ensaios de imunoaglutinação estão relacionados com conceitos estabelecidos na acústica e na microfluídica. Nesta seção, iremos analisar como esses micro-sistemas podem contribuir para os ensaios de imunoaglutinação e quais são os efeitos nas ligações entre partículas, anticorpos e antígenos.

3.3.1 Microfluídica

A microfluídica é uma área que estuda o comportamento de fluidos em pequena escala. A utilização de leis de escala em dimensões reduzidas possibilita novos efeitos e pode proporcionar um melhor desempenho. (NGUYEN et al., 2019).

Quando adentramos em sistemas microfluídicos, devemos caracterizá-los através das dimensões em variáveis conhecidas. Aqui, vamos caracterizar esses sistemas através do comprimento e do volume. Esses sistemas possuem canais que variam de dezenas a centenas de micrômetros, e com isso, as forças predominantes são as de superfície e volume. As forças de superfície são proporcionais à área, enquanto as forças de volume são proporcionais ao volume. Em microsistemas, as forças de superfície tendem a se sobreporem as forças de volume (BERTHIER; SILBERZAN, 2010). Os efeitos de superfície ligados a essa força estão relacionados à viscosidade e às forças eletrostáticas, sendo condições importantes ao considerarmos escalas de canais cada vez menores (KARNIADAKIS et al., 2006).

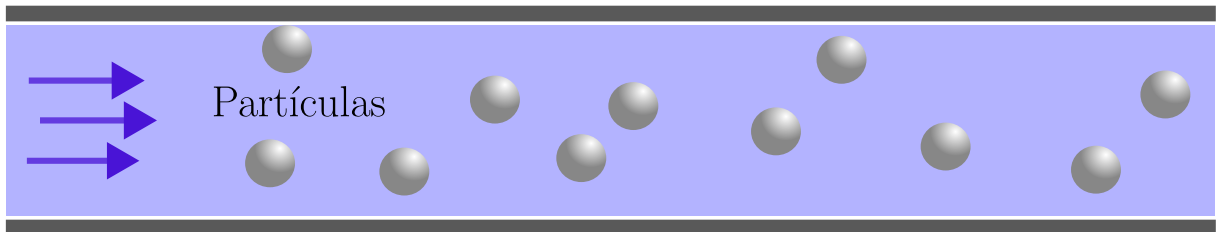
Sistemas microfluídicos possuem características importantes quando relacionados a aplicações analíticas. Dentre estas, podemos citar a quantidade reduzida de reagente/amostras, tempo de reação mais rápido, devido a um processo conhecido como difusão, e a relação superfície-volume (GIJS, 2004).

3.3. EFEITOS DA ACUSTOFLUÍDICA EM ENSAIOS DE IMUNOAGLUTINAÇÃO

Ao analisarmos os ensaios de imunoaglutinação em regiões da ordem de dezenas de micrômetros, devemos considerar algumas condições pertinentes. Para iniciar esta análise, consideramos um microcanal, onde será injetado um fluido que contém micropartículas. Este fluido possui um fluxo laminar com o mínimo de agitações possíveis, conhecido na literatura como escoamento de Poiseuille. Neste escoamento, o fluxo é conduzido através do microcanal rígido, fazendo com que haja uma diferença de pressão entre as extremidades do canal, conforme ilustrado na figura 3.11 (BRUUS, 2007).

Além disso, o fluido se desloca através do fenômeno de capilaridade, que é uma das características da microfluídica. Nesse domínio, os efeitos de superfície são mais importantes devido à grande relação entre superfície e volume na escala micrométrica, resultante da tensão superficial e das forças de superfície presentes nesse sistema (BRUUS, 2007).

Figura 3.11: Representação ilustrativa de um microcanal preenchido por um fluido que transporta micropartículas cujo fluxo é laminar.

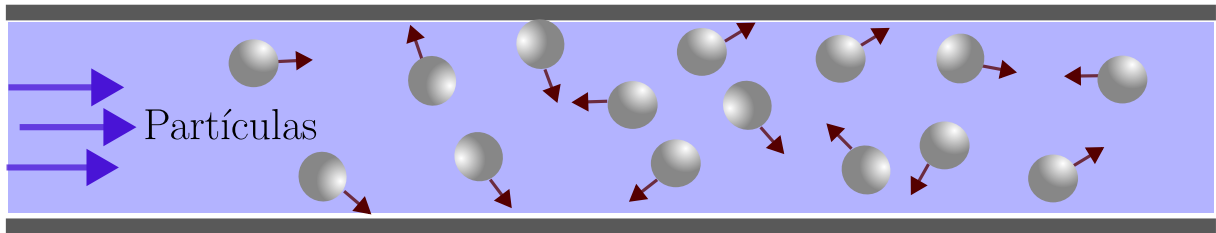


Fonte: Autora, 2023.

Neste microcanal, ocorre uma interação entre as micropartículas devido a algumas condições. Primeiro, o fluido transporta as micropartículas com uma velocidade v . Neste transporte, as micropartículas estão suspensas e possuem um movimento aleatório, conhecido como movimento Browniano. Além disso, este movimento promove colisões, já que o deslocamento das micropartículas é de forma caótica, o que por sua vez altera a sua velocidade (SALINAS, 2005; SILVA et al., 2022). Na figura 3.12, ilustramos o movimento das micropartículas no microcanal.

Quando as micropartículas são transportadas pelo fluido, ocorre também o efeito conhecido como difusão. O efeito difusivo surge quando partículas submersas ao fluido promovem um movimento aleatório sobre as regiões de baixa para altas concentrações. Este efeito é induzido pela temperatura, que é gerado através do movimento Browniano (BRUUS, 2007).

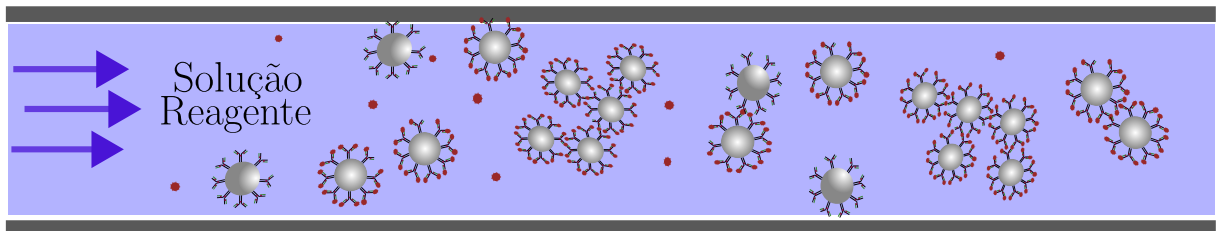
Figura 3.12: Representação ilustrativa de um microcanal preenchido por um fluido com micropartículas que possuem movimento Browniano.



Fonte: Autora, 2023.

Agora, ao analisarmos este sistema para ensaios de imunoaglutinação, onde o fluido é composto por um reagente contendo micropartículas conjugadas com anticorpos e amostras contendo antígenos, a probabilidade de ocorrer ligações que promovem a aglutinação aumenta. Uma vez que essas interações aumentam, as micropartículas colidem umas com as outras e também com os antígenos, formando assim agregados conhecidos como aglutinação específica e não específica, discutidos neste capítulo. A formação desses agregados é observada na figura 3.13 (CERQUEIRA, 2015).

Figura 3.13: Representação ilustrativa de um microcanal preenchido por um fluido com solução reagente composta por micropartículas conjugadas com anticorpos e componentes antigênicos que possuem movimento Browniano gerando contato entre anticorpos e antígenos proporcionando a formação de complexos.



Fonte: Autora, 2023.

Nesses sistemas, observa-se que parâmetros como a temperatura provocam um aumento nas vibrações das micropartículas. Essa vibração está relacionada à viscosidade do fluido, de modo que em fluidos mais viscosos as micropartículas vibram lentamente, reduzindo as colisões.

Os sistemas microfluídicos são úteis nos ensaios de imunoaglutinação, pois auxiliam na ligação anticorpo-antígeno, potencializando essa reação. Além disso, a quantidade de reagentes e amostras é reduzida e os tempos de reação são mais rápidos (GIJS, 2004).

3.3.2 Acustofluídica

A acustofluídica é uma área que aborda conceitos relacionados à acústica em sistemas microfluídicos. Essa área possibilita a manipulação de partículas transportadas por fluidos em microescala (FRIEND;

3.3. EFEITOS DA ACUSTOFLUÍDICA EM ENSAIOS DE IMUNOAGLUTINAÇÃO

YEO, 2011). Nos sistemas acústofluidicos, campos acústicos denominados força de radiação são gerados por meio de ondas ultrassônicas (WIKLUND, 2004) e (SANTOS et al., 2021). Fenômenos de armadilha ou captura de partículas, levitação e separação tornaram-se grandes aplicações da acústica devido à força de radiação gerada pelas ondas estacionárias. Diversas aplicações surgiram utilizando sistemas acustofluidicos, e dentre essas aplicações podemos citar o aprisionamento de partículas devido à presença de forças acústicas (WIKLUND et al., 2012).

Consideramos um sistema acustofluidico descrito no capítulo 2. Este sistema agora está conectado a dois microcanais. Nele será inserido um fluido com micropartículas. Quando estamos em um sistema apenas em condições microfluidicas, as micropartículas ficam sedimentadas no fundo da microcavidade. Já com o efeito das ondas ultrassônicas, essas micropartículas levitam e formam aglomerados na região central da microcavidade.

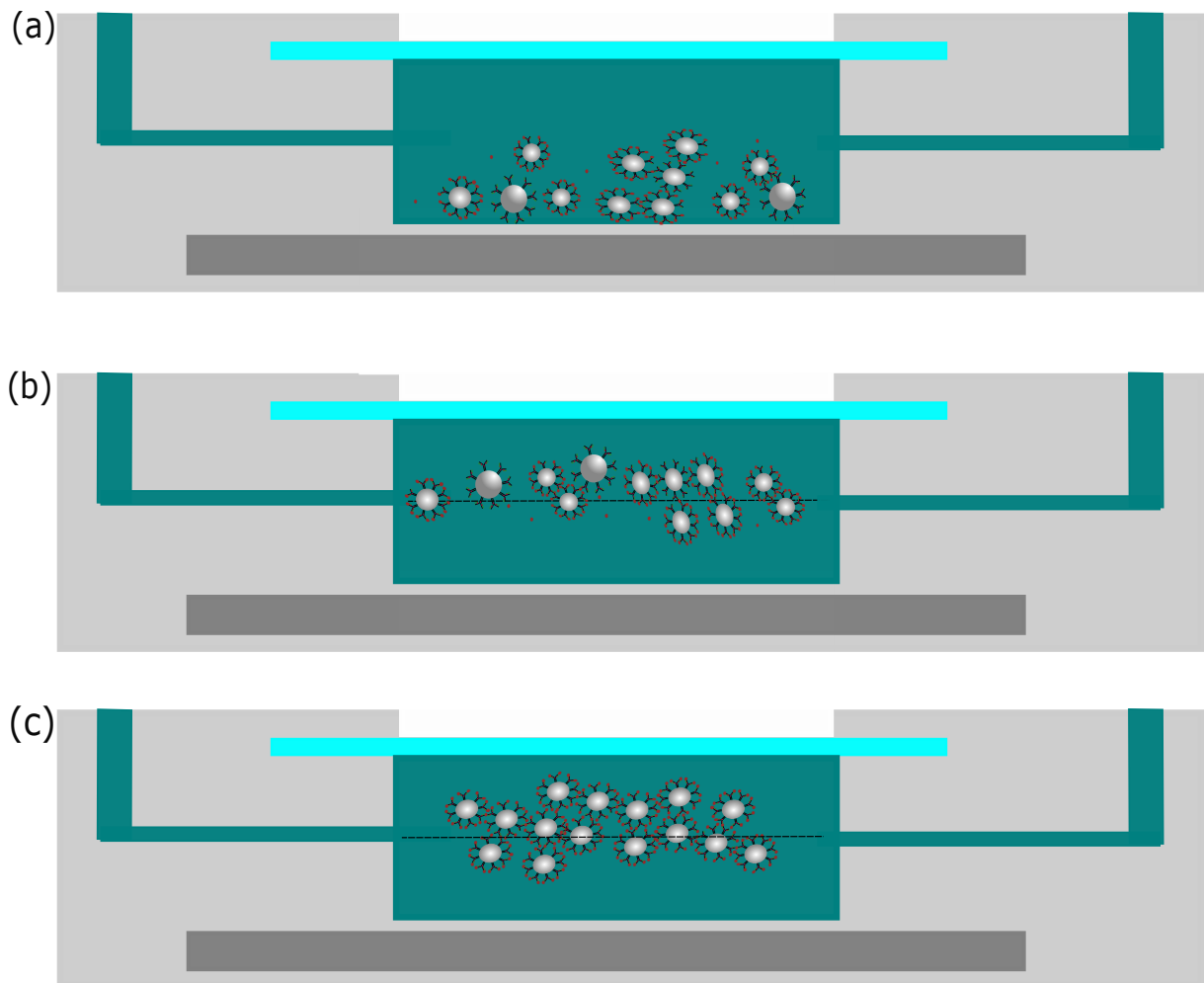
Santos e colaboradores utilizaram partículas de poliestireno para a caracterização do chip de acustofluidica. Essa análise foi realizada através da espectroscopia Raman. Observou-se a formação de agregados após a levitação dessas partículas. Além disso, através de uma força de radiação secundária, foi possível observar a formação de uma rede de favo de mel metaestável que possibilitou a investigação de células individualmente. Nesse mesmo sistema, também foram apresentadas aplicações de bio-deteção através da análise de macrófagos murinos vivos J774.A1, que são usados no ensaio de infecção da doença de leishmaniose (SANTOS et al., 2021).

Agora, vamos analisar o uso dos sistemas acustofluidicos em ensaios de imunoaglutinação. Para isso, iremos injetar nos microcanais a mistura de reagente, composta por micropartículas e anticorpos conjugados, e a amostra, que contém os antígenos. Devemos fazer duas análises. Primeiro, ao ser injetada no microcanal, a mistura sofre os efeitos descritos na seção 1.3.1, o que resulta na formação de agregados. Segundo, ao entrar na microcavidade, esses agregados são levitados devido à força de radiação acústica primária e se juntam para formar uma rede de aglomerados, devido à ação da força de radiação secundária.

Na figura 3.14, ilustramos a rede de aglomerados na microcavidade acústica: (a) os agregados saindo do microcanal, (b) a levitação dos agregados devido à ação da força de radiação acústica primária e (c) a formação da rede de aglomerados devido à ação da força de radiação secundária.

3.3. EFEITOS DA ACUSTOFLUÍDICA EM ENSAIOS DE IMUNOAGLUTINAÇÃO

Figura 3.14: Representação ilustrativa dos ensaios de imunoaglutinação em uma microcavidade acustofluídica. (a) Agregados de micropartículas conjugadas com anticorpos e antígenos saindo do microcanal (sedimentação). (b) Levitação dos agregados devido à ação de forças de radiação acústica primária. (c) Rede de agregados (aglomeração) devido à ação da força de radiação acústica secundária.



Fonte: Autora, 2023.

Observa-se que há uma maior probabilidade de ocorrer as reações de imunoaglutinação, com uma redução de tempo nas reações por meio da aplicação das técnicas de acustofluídica (GRUNDY et al., 1993). Além disso, ocorre um aumento na sensibilidade desses ensaios em relação aos procedimentos padrões (GRUNDY et al., 1994). No entanto, algumas condições devem ser analisadas. Primeiro, é necessário considerar a quantidade de micropartículas conjugadas com anticorpos em relação aos antígenos, pois pode haver um excesso de antígenos ou de anticorpos, comprometendo a reação. Segundo, deve-se observar as aglutinações não específicas que ocorrem nesse processo, considerando tanto o material das micropartículas quanto os efeitos do ultrassom, que podem acelerar essas reações.

3.3. EFEITOS DA ACUSTOFLUÍDICA EM ENSAIOS DE IMUNOAGLUTINAÇÃO

No próximo capítulo, iremos demonstrar o que foi discutido até agora. Utilizamos chips de acustofluídica, mencionado anteriormente, e testes convencionais de imunoaglutinação para analisar as reações entre antígenos e anticorpos intermediadas por micropartículas solúveis (látex) em um microsistema acústico.

ENSAIOS DE IMUNOAGLUTINAÇÃO EM CHIPS DE ACUSTOFLUÍDICA

Neste capítulo, abordaremos os ensaios de imunoaglutinação em chips de acustofluídica, apresentando toda a estrutura do chip de acustofluídica e o arranjo experimental utilizado para realizar os experimentos. Além disso, serão descritos o teste de imunoaglutinação utilizado e os procedimentos adequados para a pesquisa. Por fim, discutiremos os resultados obtidos e as conclusões decorrentes da pesquisa.

4.1 Chips de acustofluídicas

O chip de acustofluídica é fruto de uma pesquisa de doutorado desenvolvida pelo aluno Giclênio Cavalcante, com orientação do professor Glauber T. Silva. Ele é caracterizado como um chip simples, barato, devido a tecnologia de fabricação que é acessível em comparação a outras técnicas, como por exemplo .

Este chip é composto por dois microcanais (entrada e saída) acoplados a uma microcavidade acústica, cuja função corresponde ao ressonador acústico, já que o chip contém uma cavidade e sua estrutura permite a reflexão da onda mecânica, convertendo em uma onda plana estacionária. A microcavidade acústica foi moldada dentro de um disco com geometria cilíndrica, fabricado via tecnologia 3D através da impressora 3D (Moonray D75) da empresa Sprintray, que utiliza processamento digital de luz para fabricação. No fundo da microcavidade acústica, foi acoplado um atuador piezoelétrico, titanato zirconato de chumbo (PZT-4), responsável pelo desenvolvimento de ondas ultrassônicas. Na parte superior, foi colocado um refletor acústico, na forma de uma lâmina de vidro de 150 mm. A Figura 4.1 representa o chip de acustofluídica, mostrando uma fotografia da parte superior do chip acoplado ao suporte (a) e uma seção transversal do chip (b).

Figura 4.1: A representação do chip de acustofluídica, mostrando a fotografia da parte superior do chip acoplado ao suporte (a) e uma seção transversal do chip (b), com a microcavidade acústica representada pela cor verde-água, a lâmina e o atuador piezoelétrico localizados no topo e no fundo, respectivamente.



Fonte: Autora, 2023.

4.1.1 Instrumentação acústica

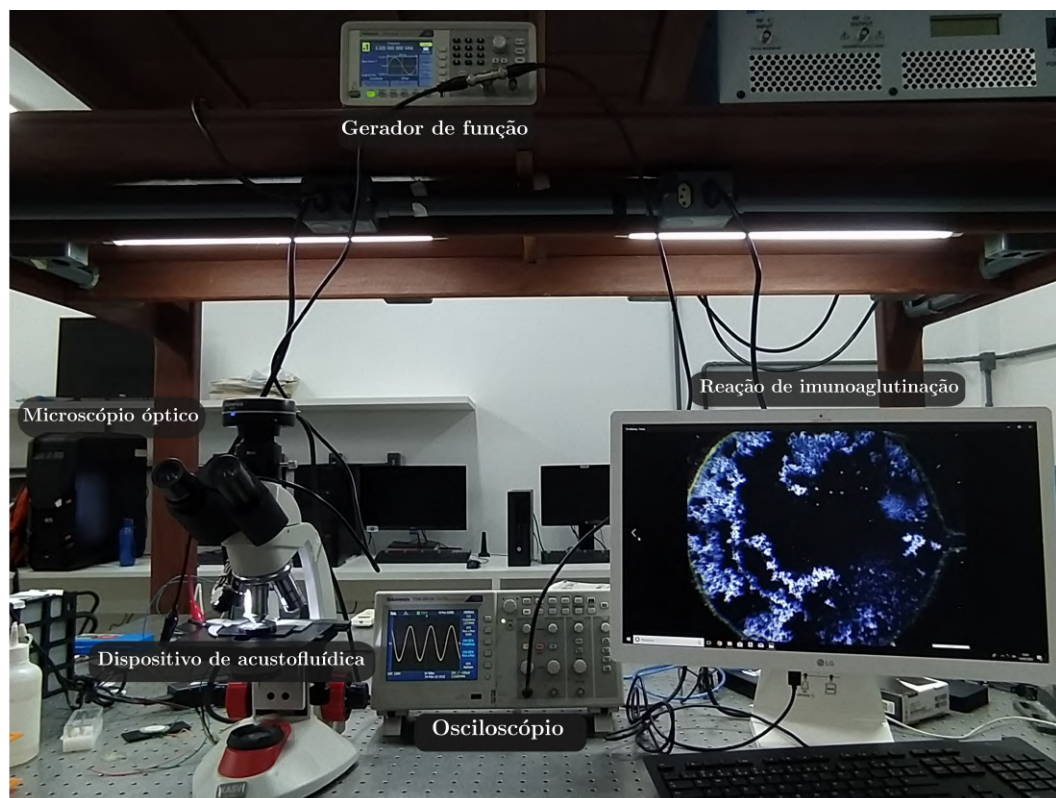
A instrumentação acústica consiste em um gerador de funções (AFG1022), fabricado pela Tektronix, utilizado para excitar o atuador piezoelétrico e converter energia elétrica em energia mecânica na faixa de frequência ultrassônica, gerando ondas senoidais com frequência de 3 a 4 MHz. A frequência no chip é bem definida, tanto experimental quanto em simulação, porém o chip está em processo de patente, de modo que, alguns informações serão restrita neste trabalho. Os sinais emitidos pelo gerador de funções foram monitorados por meio do osciloscópio para garantir que os sinais emitidos pelo gerador de função estejam equivalentes ao esperado, além disso, verificamos a funcionalidade do chip através da amplitude gerada no oscilador de dois canais (TDS 2012C), também da Tektronix. As imagens foram capturadas utilizando um microscópio binocular da Kasvi, ao qual foi acoplada uma câmera (OLYMPUS). Devido à natureza física do dispositivo, que possui um fundo opaco, foi necessário utilizar uma iluminação adicional. Por isso, um LED de luz branca foi inserido junto ao microscópio. O software Cellsens foi utilizado para capturar as imagens a partir dessa reflexão. Na figura 4.2, ilustramos o esquema experimental utilizado para realização dos testes e na figura 4.3 visualizamos a imagem no laboratório de acústica física com a instrumentação acústica utilizada.

Figura 4.2: Configuração instrumental acústica utilizada nos ensaios de imunoaglutinação no chip de acustofluídica.



Fonte: Autora, 2023.

Figura 4.3: Configuração instrumental acústica utilizada nos ensaios de imunoaglutinação no chip de acustofluídica no laboratório de acústica física.



Fonte: Autora, 2023.

4.2 Teste de Aglutinação (Biolátex PCR)

Para realização desta pesquisa, foi utilizado o teste de aglutinação da marca Bioclin. A Bioclin é uma indústria responsável pela fabricação/produção de kits de diagnósticos para laboratórios de análises clínicas. O kit analisado é o Biolátex PCR, cuja finalidade é determinar a proteína C reativa de forma qualitativa e semiquantitativa por meio da reação de aglutinação utilizando partículas de látex.

As partículas de látex foram recobertas com gama-globulina anti-PCR, o anticorpo específico para os componentes antigênicos do PCR, fazendo com que as aglutinações não específicas sejam evitadas. Este kit é composto por um reagente - Látex PCR (2 mL), sendo ele composto por partículas de látex sensibilizadas com o anticorpo anti-PCR, um controle positivo (1 mL) que possui soluções aglutinantes, componentes antigênicos com salina e um controle negativo (1 mL) composto apenas com salina. Já em relação aos equipamentos e insumos operacionais, o kit é acompanhado apenas por um cartão para testes. Na figura 4.4, observamos o kit com seus respectivos componentes.

Figura 4.4: Teste de aglutinação Biolátex PCR da empresa Bioclin constituído por reagente látex PCR (tampa branca) composto por partículas de látex sensibilizadas com anti-PCR, controle positivo (tampa vermelha) composto por solução aglutinante, controle negativo (tampa azul) composto por salina e placa de teste.



Fonte: Autora, 2023.

Sobre o desempenho do produto e, conseqüentemente, o padrão de qualidade, o mesmo possui valores de referência estabelecidos pelos padrões internacionais da Organização Mundial da Saúde (OMS) que apresentam uma aglutinação visível com concentração de até 6 mg/L . O kit apresenta boa especificidade metodológica, e sua sensibilidade analítica corresponde a 6 UI/mL .

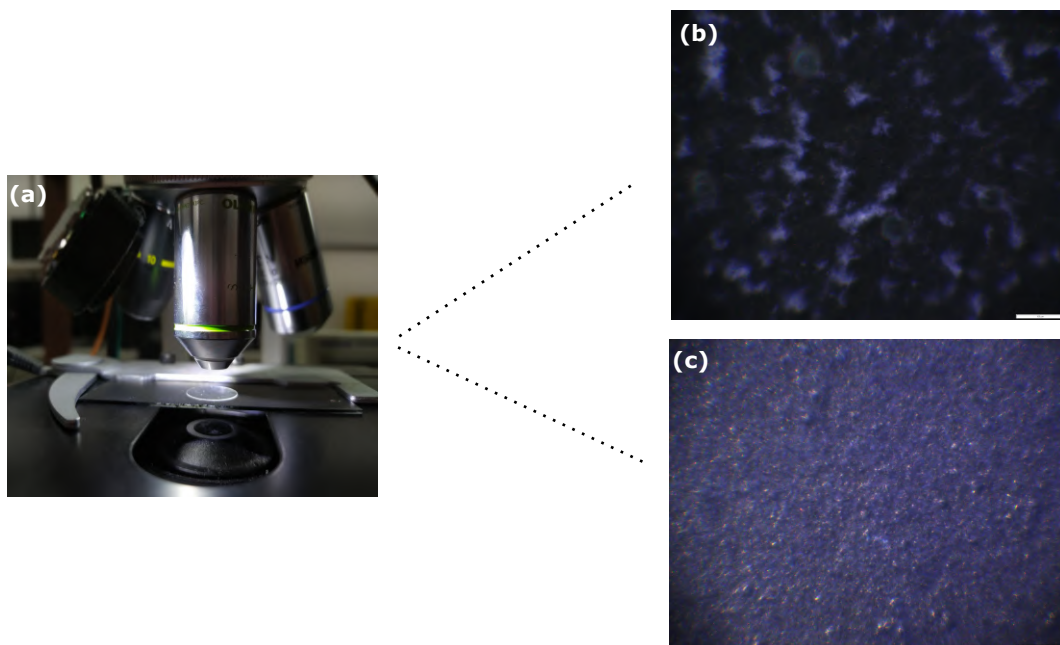
Em relação ao diagnóstico, a proteína C reativa indica algum processo inflamatório no organismo, sendo ele de origem infecciosa, como pneumonia, tuberculose, ou de origem não infecciosa, como febre reumática em atividade, artrite reumatóide, lupus eritematoso. Além disso, pode estar presente em condições patológicas, como no infarto agudo do miocárdio, doenças neoplásicas, trauma intenso, viroses e queimaduras (QUIBASA-BIOCLIN, 2023; MEDICINA, 2022).

4.3 Resultados e Discussões

Neste trabalho, apresentamos ensaios de imunoaglutinação analisados por um chip de acustofluídica. Fornecemos considerações importantes acerca da caracterização do teste Biolátex PCR por meio da ação da força de radiação dentro do microsistema. Utilizamos o kit látex detalhado na seção 2.2 e explicamos as reações para formação de aglutinados nos microcanais e no interior da microcavidade. O protocolo utilizado para realização dessas análises está descrito em (QUIBASA-BIOCLIN, 2023) e foi adaptado para o sistema utilizado.

Inicialmente, realizamos o teste com o controle negativo e o controle positivo em uma lâmina com fundo preto. Essa lâmina foi utilizada para analisar os testes, já que estamos usando um sistema de microscopia óptica e para assemelhar-se ao cartão de teste do próprio kit, que tem como característica o fundo preto, melhorando assim a visibilidade. O principal objetivo foi caracterizar essas imagens no microscópio para comparar com o sistema que será utilizado. Na figura 4.5, exibimos as imagens que caracterizam a reação Ac-Ag do controle positivo e também mostramos quando essa reação não ocorre, no controle negativo, em uma lâmina montada no microscópio óptico mostrada através da lente objetiva de 20x com abertura numérica (NA) de 0,40 mm: (a) Painel experimental, (b) controle positivo e (c) controle negativo.

Figura 4.5: Teste mediante a aglutinação de partículas de látex para determinação da proteína C reativa em lente objetiva de 20x. (a) Painel experimental - Lâmina de fundo preto acoplada ao microscópio óptico. (b) Controle positivo, aglutinação visível caracterizando a reação Ac-Ag mediante a partículas de látex. (c) Controle negativo, ausência de aglutinação, não houve reação Ac-Ag.



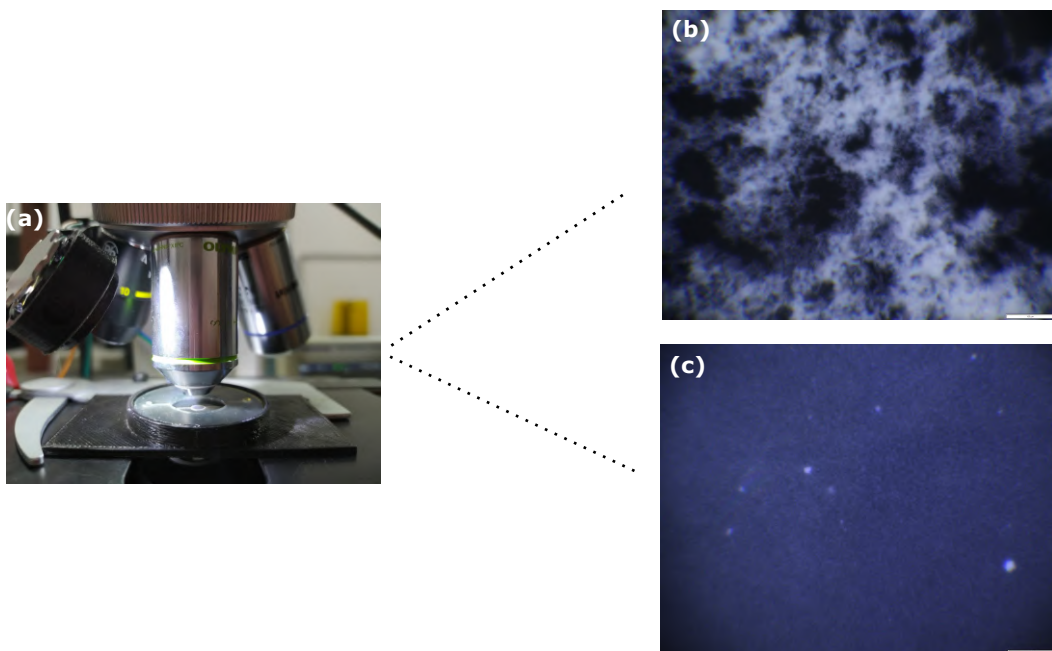
Fonte: Autora, 2023.

Na figura 4.5(b), observamos aglutinados nítidos, evidenciando a reação Ac-Ag. Já na figura 4.5(c), não

se observa a presença de aglutinados e a textura caracteriza a ausência de aglutinação. Para diagnósticos clínicos, os padrões estabelecidos em (b) e (c) são referenciados como resultados positivos e resultados negativos, respectivamente, em relação ao teste que está sendo realizado.

Após a realização desta análise, seguindo o mesmo protocolo, observamos como esses aglutinados se comportam dentro do chip de acustofluídica. Agora, a mistura entre o reagente e os respectivos controles é pipetada dentro da entrada do microcanal até chegar à microcavidade e, assim, ser analisada através de um microscópio óptico. Na figura 4.6, observamos o teste de aglutinação através de imagens que caracterizam a reação Ac-Ag dos respectivos controles (positivo e negativo) no interior da microcavidade cilíndrica acústica com uma lente objetiva de 20x.

Figura 4.6: Teste mediante a aglutinação de partículas de látex para determinação da proteína C reativa em lente objetivo de 20x. (a) Painel experimental - Chip de acustofluídica de fundo preto acoplada ao microscópio óptico. (b) Controle positivo, aglutinação visível caracterizando a reação Ac-Ag mediante a partículas de látex. (c) Controle negativo, ausência de aglutinação, não houve reação Ac-Ag.



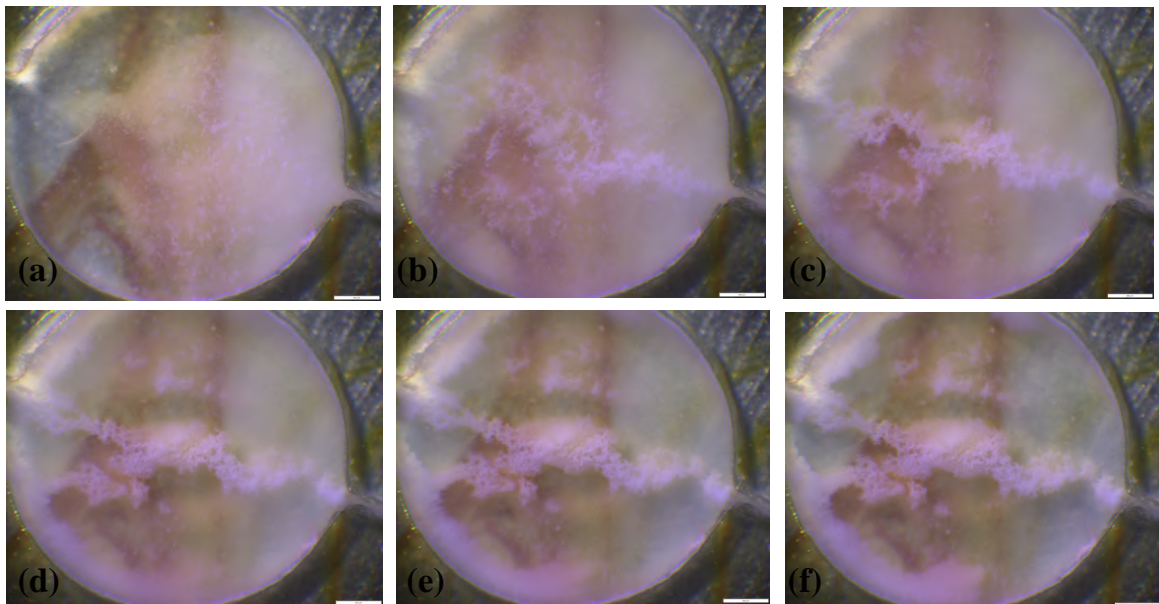
Fonte: Autora, 2023.

Em relação aos aglutinados formados na microcavidade acústica (4.6(b)), observa-se uma visualização clara caracterizando a reação Ag-Ac. Neste sistema, a ação estabelecida no microcanal através dos efeitos do movimento Browniano e difusão e também a ação da microcavidade acústica através da força de radiação acústica secundária que auxiliam na interação, formando uma grande rede de aglutinados, caracterizando, aqui denominados aglomerados. Observa-se ainda que o tempo de reação diminui, podendo ser observado instantaneamente ao entrar na microcavidade, em segundos. Quando comparados com a lâmina, esse tempo de reação ocorre entre 1 e 2 minutos. Além disso, nota-se que o padrão exibido na 4.6(c) não apresenta aglutinação visível, visto os pontos luminosos são reflexão da luz na lâmina de vidro, de modo

que, não houve interação Ac-Ag, um padrão característico de um teste negativo, representado pelo controle negativo neste caso.

Para verificar a reprodutibilidade dos padrões estabelecidos nos testes de imunoaglutinação no chip de acustoflúidica, foram realizados novos testes em um novo chip com parâmetros iguais aos do anterior. A diferença entre eles é apenas a cor, sendo que um possui fundo preto e o outro possui um fundo mais claro. Outro parâmetro analisado foi o tempo, em que observamos como as reações de aglutinação se comportavam dentro da microcavidade em 15 minutos. Na figura 4.7, apresentamos os padrões formados na microcavidade com a lente objetiva de 4x em tempos diferentes.

Figura 4.7: Teste mediante a aglutinação de partículas de látex para determinação da proteína C reativa em lente objetiva de 4x- Controle positivo em respectivos tempo. (a) 30 s, amostra entrando na microcavidade; (b) 1 min; (c) 2 min; (d) 5 min; (e) 9 min; (f) 15 min.

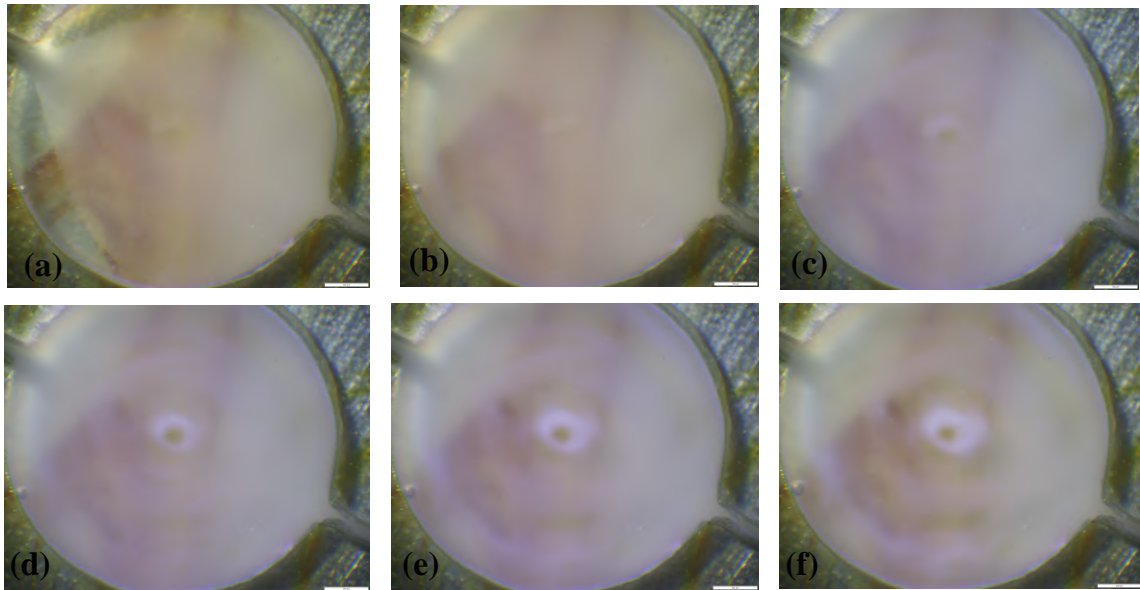


Fonte: Autora, 2023.

Em relação aos aglomerados formados na figura 4.7, observamos que, ao entrarem na microcavidade, os aglutinados estão dispersos. Em torno de 1 minuto, nota-se a formação de uma rede de aglutinados no centro da microcavidade, devido à força central no plano de levitação. Observa-se que esta rede de aglutinados, aglomerados, permanece estável ao longo do tempo, aumentando a interação Ac-Ag. Ao comparar com a lâmina, o tempo de análise é maior, o que possibilita ao analisador verificar os padrões em diferentes momentos. Na lâmina, este tempo está limitado a um pouco mais de 2 minuto, sendo um sistema aberto e, portanto, possibilitando a evaporação da amostra com mais facilidade em comparação com a microcavidade. Quando tratamos da visibilidade da aglutinação, nota-se que o tempo da reação na microcavidade é visível em menos de 1 minuto, comparado à lâmina. Seguindo os protocolos da bula do próprio kit, as recomendações indicam visibilidade de aglutinação após 2 minuto, sendo possível verificar antes desse tempo.

Na figura 4.8, investigamos como o controle negativo, que representa a ausência de aglutinação, se comportava sob a ação das forças de radiação acústica, apresentando como é formado o padrão na microcavidade acústica na lente objetiva de 4x em tempos distintos.

Figura 4.8: Teste Biolátex PCR- controle negativo em respectivos tempo com lente objetiva de 4x. (a) 30 s, amostra entrando na microcavidade; (b) 1 min; (c) 2 min; (d) 5 min; (e) 9 min; (f) 15 min.

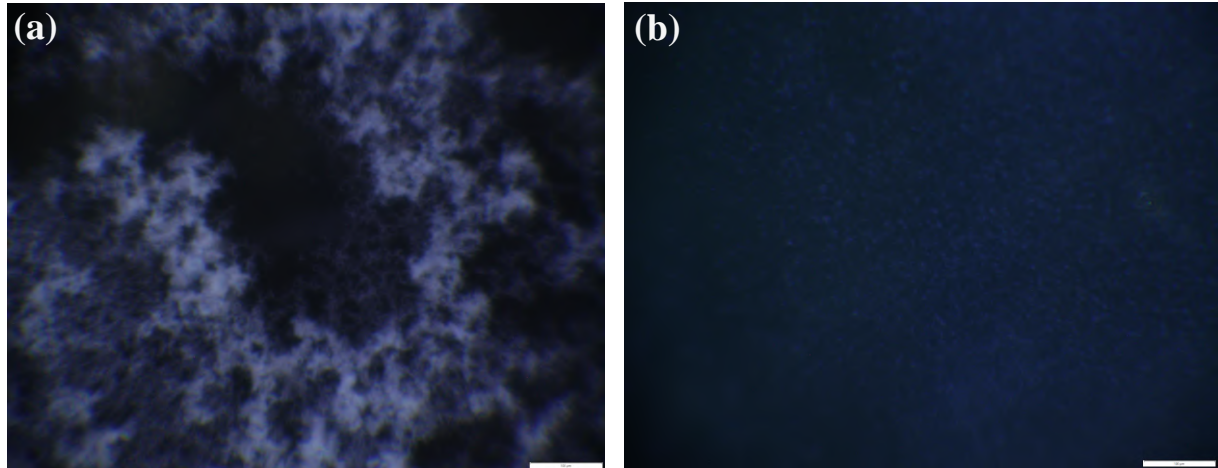


Fonte: Autora, 2023.

O comportamento observado é característico do controle negativo, apresentando um aspecto leitoso, sem a presença de aglutinação. Nota-se que em 2 minutos (figura 4.8(c)), a força de radiação acústica secundária é responsável pela aglomeração de partículas no interior da microcavidade, visto que é uma força atrativa e ela é responsável pelo mecanismo de aglutinação cuja ação faz com que a amostra fique compactada no centro da microcavidade, diferentemente da força de radiação acústica primária que é responsável apenas pela levitação das partículas na microcavidade. Observa-se ainda a formação de anéis (figura 4.8(e)-(f)), representando os pontos de aprisionamento na microcavidade. Esses pontos correspondem a locais de nós ou antinós de ondas estacionárias formadas no interior da microcavidade.

No capítulo 3, abordamos teoricamente as condições de aglutinação em relação à reação Ac-Ag. Na figura 4.9, apresentamos as condições em que o antígeno está em excesso. Para isso, realizamos diluições seriadas utilizando o reagente e mantivemos o controle positivo sem diluição. Vale ressaltar que, para esta pesquisa, o reagente é composto por partículas de látex recobertas por anti-PCR, considerado anticorpo. A diluição do reagente foi de 1:4, junto com a solução salina, mantendo um volume fixo de 20 μL , analisado através da lente objetiva de 20x.

Figura 4.9: Teste mediante a aglutinação de partículas de látex para determinação da proteína C reativa em lente objetiva de 20x. (a) Zona de equivalência, reagente e controle positivo, ambos sem diluição; (b) Excesso de antígenos - Reagente com diluição 1:4 e controle positivo sem diluição.

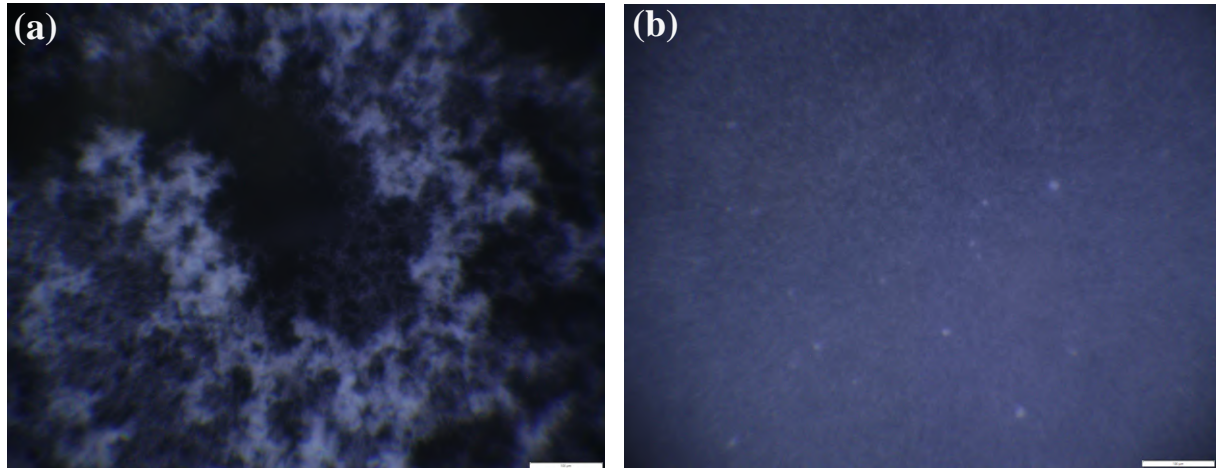


Fonte: Autora, 2023.

Na figura 4.9(a), observa-se a zona de equivalência e a formação de aglutinação devido à reação Ac-Ag. Além disso, por meio da ação das forças acústicas, nota-se a rede de aglutinados, ou seja, aglomerados. Porém, ao analisarmos a figura 4.9(b), percebe-se uma ausência de aglutinação, indicando que os antígenos estão livres para se conectarem aos anticorpos. Em virtude disso, a formação de aglutinação estará comprometida, já que os antígenos estão em excesso, sendo possível apenas a ligação de anticorpo com antígenos e não a aglutinação. Essas condições são de extrema importância na caracterização de um teste por uma nova tecnologia, visto que, sob condições fora da zona de equivalência, existe a probabilidade de obter um falso negativo devido à ausência de aglutinação.

Outra condição discutida é quando este sistema apresenta excesso de anticorpos, ou seja, um padrão que se forma sob uma nova condição, diferente da zona de equivalência. Para isso, avaliamos esse padrão. Primeiramente, diluímos o controle positivo na mesma proporção da figura 4.9(b), ou seja, 1:4 com a solução salina, mantendo o reagente sem diluição, proporcionando um sistema com anticorpos em excesso. Esse padrão pode ser observado na figura 4.10 com a lente objetiva de 20x, em comparação com a zona de equivalência.

Figura 4.10: Teste mediante a aglutinação de partículas de látex para determinação da proteína C reativa em lente objetiva de 20x. (a) Zona de equivalência - controle positivo e reagente, ambos sem diluição; (b) Excesso de anticorpos - Controle positivo com diluição de 1:4 e reagente sem diluição.

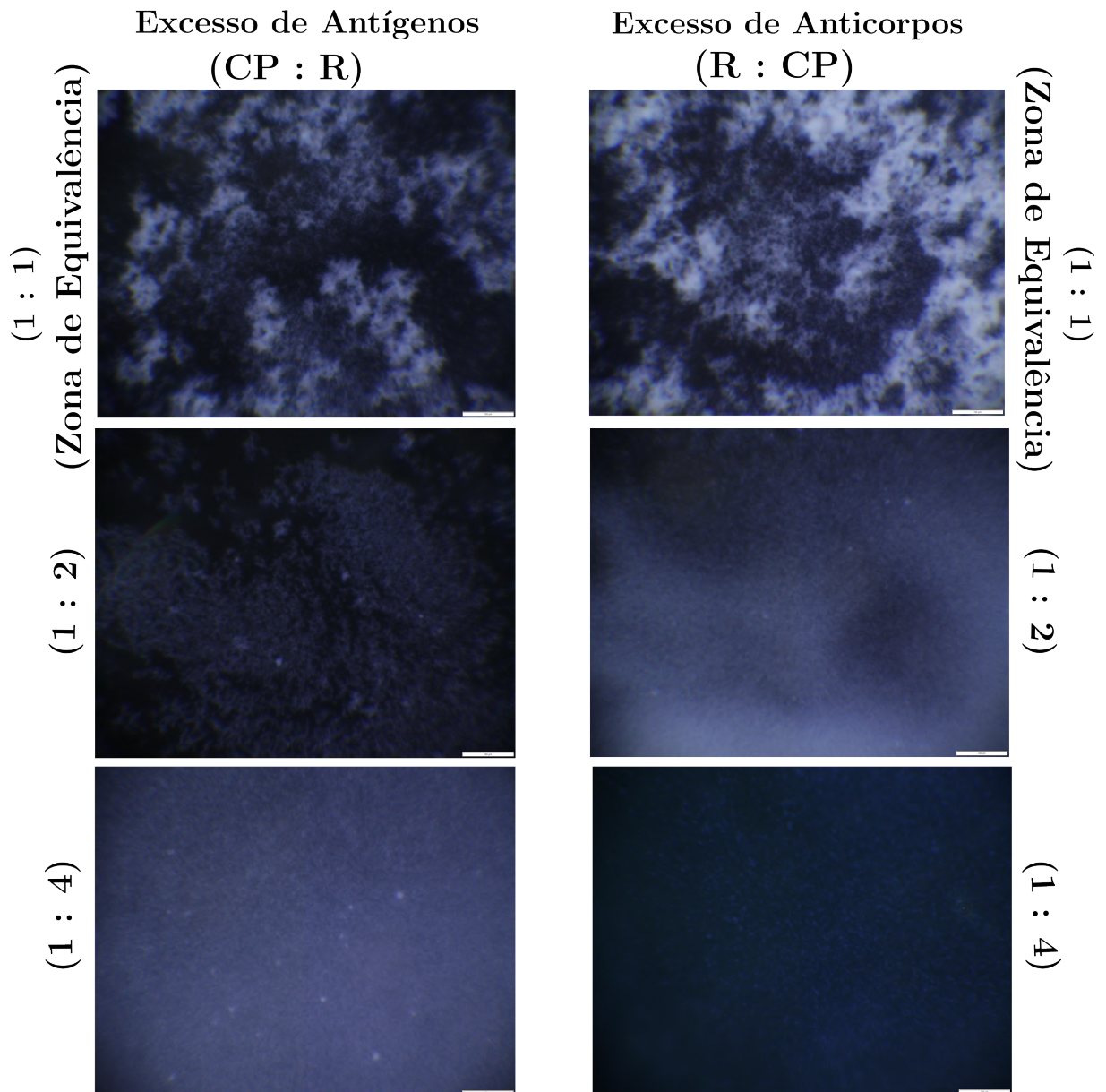


Fonte: Autora, 2023.

O comportamento apresentado na figura 4.10 é típico de uma reação caracterizada como controle negativo. Para esta análise, utilizamos o controle positivo devido à quantidade excessiva de anticorpos no interior da microcavidade. Os anticorpos estão livres para se conectarem aos antígenos, mas a formação de aglutinação não ocorre, o que pode levar a um falso negativo.

Para o kit BIOLÁTEX PCR, identificamos a zona de equivalência na reação Ac-Ag. Realizamos diluições seriadas alterando a concentração entre anticorpos e antígenos, com o intuito de identificar até qual diluição existe a presença de aglutinação na microcavidade acústica. Na figura 4.11, observamos essas diluições, caracterizando o sistema para as duas condições abordadas: excesso de anticorpos e excesso de antígenos. Mostramos a zona de equivalência, quando a quantidade de controle positivo e reagente são proporcionais, havendo padrões de imagens diferentes com aglutinação mais visível, bem como a ausência de aglutinação. Esta análise foi realizada através da lente objetiva de 20x.

Figura 4.11: Teste mediante a aglutinação de partículas de látex para determinação da proteína C reativa em lente objetiva de 20x. Diluição seriada 1:1, 1:2 e 1:4, promovendo excesso de antígenos (CP:R) e excesso de anticorpos (R:CP).



Fonte: Autora, 2023.

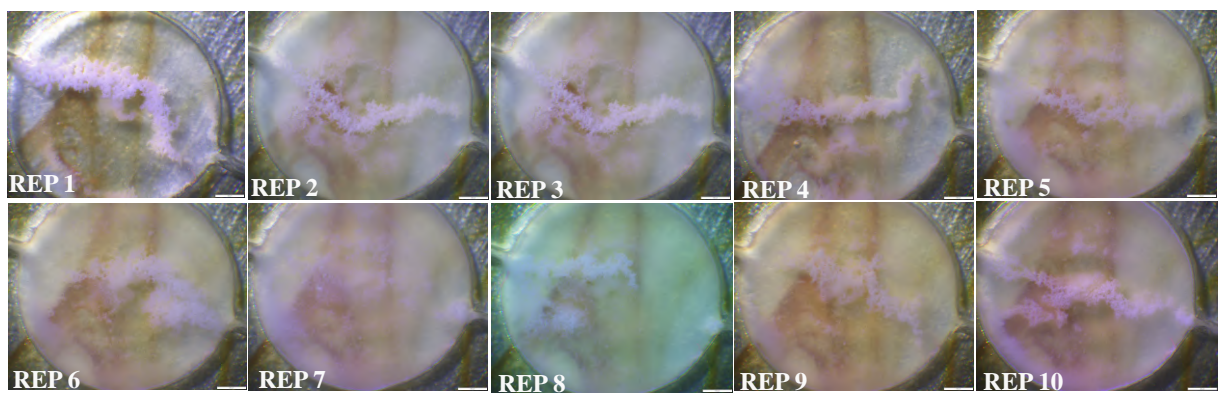
Observamos que a zona de equivalência para o kit PCR na microcavidade acústica é definida nos intervalos de 1:2 (diluição relacionada a excesso de antígenos) a 1:1 (diluição relacionada a excesso de anticorpos). Quando observamos a diluição 1:2, com condições em que os antígenos estão em excesso, nota-se a formação da aglutinação, sendo menor quando comparada à diluição 1:1. Se avaliarmos a mesma diluição, mas agora em condições em que os anticorpos estão em excesso, observa-se um aspecto leitoso, mostrando que a quantidade de reagente está mais concentrada em relação à quantidade de antígenos, assim como na diluição 1:4 (excesso de Ag). Em suma, nota-se que as proporções entre antígenos e

anticorpos em um ensaio de imunoaglutinação são de extrema importância, havendo a possibilidade de um falso negativo para situações fora da zona de equivalência.

Para validar os métodos utilizados por meio da técnica de acustofluídica, observamos as evidências qualitativas e semiquantitativas do Kit PCR látex. Avaliamos os padrões de qualidade do teste por meio dos parâmetros de repetibilidade, reprodutibilidade e limite de detecção nesse novo sistema.

Os parâmetros de repetibilidade foram calculados a partir de 10 ensaios sucessivos, utilizando o mesmo operador e o mesmo chip, com tempo de reação de 5 minutos. Realizamos a mistura dos componentes de látex PCR e controle positivo, obtendo os resultados expostos na figura 4.12

Figura 4.12: Teste mediante a aglutinação de partículas de látex com lente objetiva de 4x para a validação da técnica de acustofluídica através do parâmetro de repetibilidade .

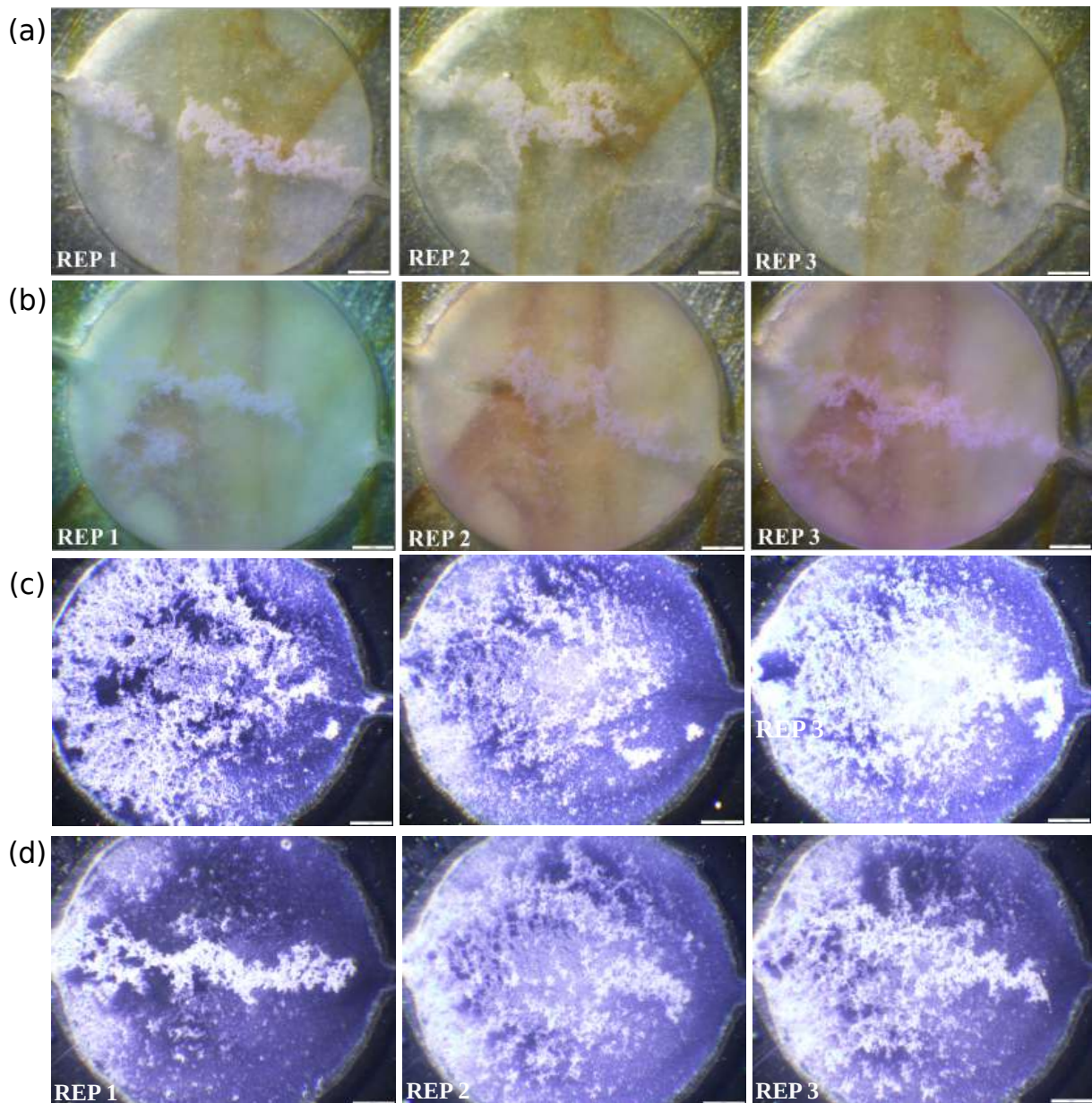


Fonte: Autora, 2023.

Na Figura 4.12, pode-se observar que o padrão se repete sob as mesmas condições, nota-se que o padrão correspondem a uma estrutura fractal da solução injetada na amostra. Através disso, o parâmetro de repetibilidade correspondente a 100%, esse resultado indica a variabilidade analítica do método, ou seja, a precisão e a confiabilidade dos resultados obtidos.

Os parâmetros de reprodutibilidade foram calculados a partir de 10 ensaios realizados em três dias consecutivos, utilizando dois operadores distintos designados por 1 e 2, bem como dois chips diferentes descritos por 1 e 2, e com um tempo de reação de 2 minutos. Os resultados obtidos foram apresentados na figura 4.13.

Figura 4.13: Teste mediante a aglutinação de partículas de látex com lente objetiva de 4x para a validação da técnica de acustofluídica através do parâmetro de reprodutibilidade.(a) Operador 1 e chip 1; (b) Operador 2 e chip 1; (c) Operador 1 e chip 2 e (d) Operador 2 e chip 2.



Fonte: Autora, 2023.

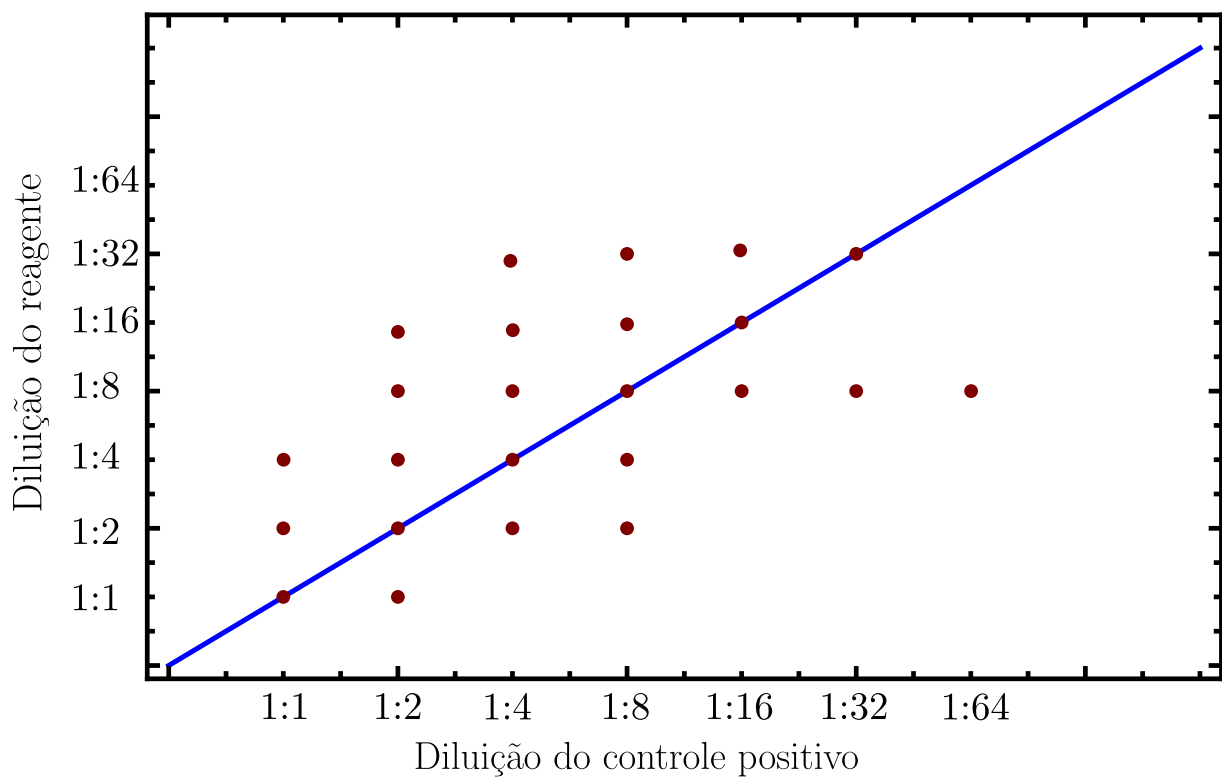
Na figura 4.13, avaliamos a capacidade do sistema acustofluídico em relação à reprodutibilidade, ou seja, sua capacidade de fornecer resultados consistentes e replicáveis em diferentes ocasiões, mesmo em condições variáveis. O sistema acustofluídico apresentou uma reprodutibilidade correspondente a 100%, o que é uma característica importante para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos. Se um sistema não for reproduzível, os resultados podem ser questionados e a validade dos mesmos pode ser comprometida.

Avaliamos ainda qual é o limite de detecção que o sistema é capaz de atingir. Esse limite é calculado

com base na menor concentração que pode ser detectada pelo sistema. Para isso, realizamos diluições seriadas com salina (PBS) do controle positivo, que corresponde ao antígeno e o reagente composto por Anti-PCR (anticorpos), a partir da amostra inicial (1:1 (puro - sem diluição), 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256). O processo de diluição corresponde à redução da concentração de uma solução por meio da adição de um solvente. Dessa forma, é possível obter resultados que correspondem à zona de equivalência que o dispositivo detecta, ou seja, as concentrações que favorecem a interação entre Ac e Ag.

Para a visualização do limite de detecção, plotamos um gráfico, figura 4.14 em relação a concentração de antígenos e anticorpos.

Figura 4.14: Validação da técnica de acustofluidica através das diluições do reagente Anti-PCR e diluições do controle positivo para o estudo do limite de detecção do sistema .



Fonte: Autora, 2023.

A figura 4.14 ilustra os resultados obtidos por meio de diferentes diluições de anticorpos e antígenos. Neste gráfico, a concentração de antígenos (diluição do controle positivo) é plotada no eixo x e a concentração de anticorpos (diluição do reagente Anti-PCR) é plotada no eixo y. A linha diagonal representa a região onde a probabilidade de interação entre antígenos e anticorpos é maior, uma vez que a quantidade de cada componente está proporcional ou equivalente.

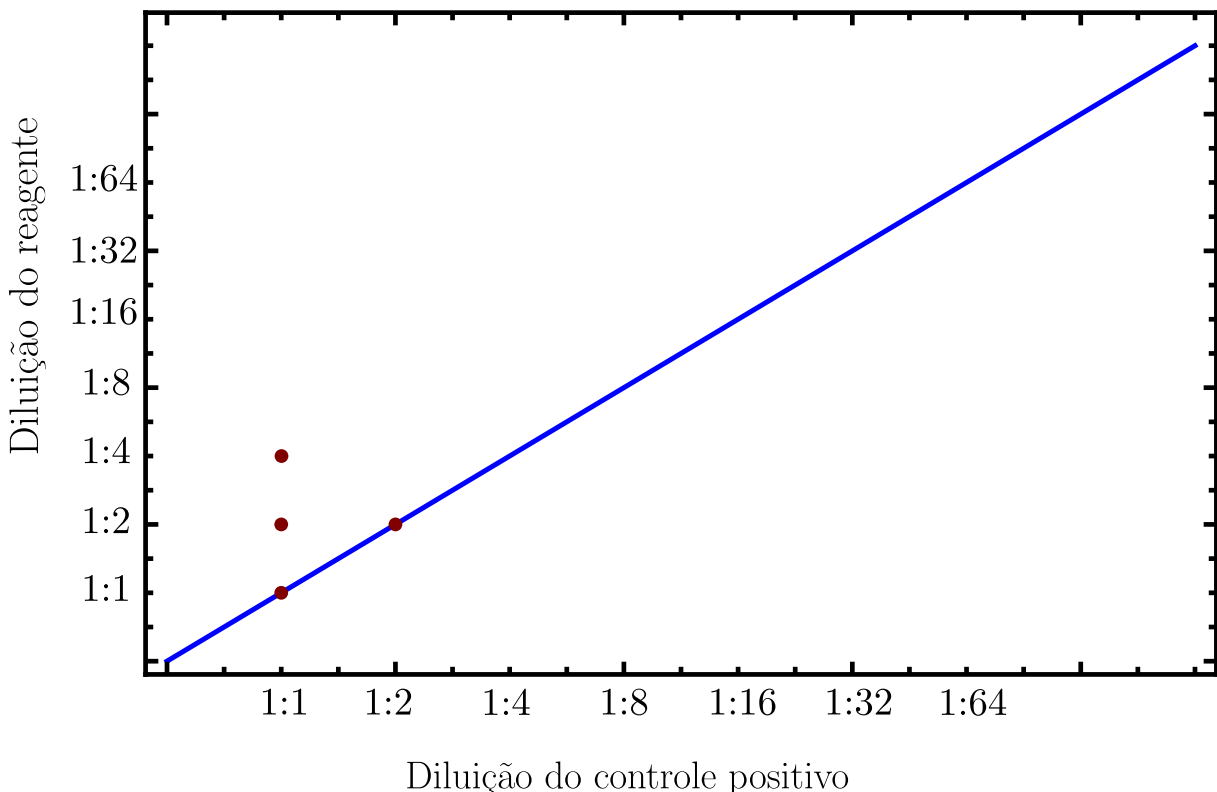
Neste gráfico, cada ponto representa uma diluição específica de ambos os componentes, onde a concentração da solução é reduzida em relação à diluição anterior. Como ambas soluções estão sendo diluídas, a menor concentração detectada no sistema corresponde a 1:64 (concentração de antígenos - Controle positivo).

Através dos dados fornecidos por (QUIBASA-BIOCLIN, 2023), a concentração de PCR apresenta uma aglutinação visível em até 6 mg/L, o que corresponde a 6 ng/ μL . Dessa forma, foi possível observar que para concentrações correspondentes à diluição 1:64, no chip de acustofluídica foi obtida uma aglutinação visível de até 0,1875 ng/ μL , que equivale a um limite de detecção de 187,5 pg/ μL , que é 32 vezes melhor que o teste convencional utilizado.

Os resultados obtidos neste estudo foram comparados com os dados existentes na literatura. Foi observado que o limite de detecção na literatura é da ordem de 10^{-14}M (WIKLUND, 2004) e de 10fmol l^{-1} , (DEGRE et al., 2005). Além disso, a sensibilidade do teste de aglutinação obtido neste trabalho, com equipamentos simples e de baixo custo, mostrou-se inovadora e obteve resultados promissores.

Após repetir o protocolo de diluições e concentrações diferentes para antígenos e anticorpos utilizando o sistema convencional de microscopia óptica com lâmina (figura 4.15), foi observado que a aglutinação foi visualizada até a diluição 1:2 (Controle positivo), o que corresponde a uma concentração de 3000 pg/ μL . No entanto, para análises de maiores limites de detecção, é necessário ampliar a faixa de concentração da substância, ao contrário do que ocorre para um limite de detecção menor, onde as concentrações da substância podem assumir valores mais baixos, tornando o teste mais sensível.

Figura 4.15: Diluição do reagente Anti-PCR e diluição do controle positivo em um sistema de microscopia óptica composto por lâmina.



Fonte: Autora, 2023.

Ao comparar os resultados obtidos nos dois sistemas discutidos (chip de acustofluídica e lâmina), observa-se uma diferença significativa no limite de detecção. Enquanto o sistema convencional de lâminas

apresentou um limite de detecção maior, o que significa que para concentrações superiores à estabelecida pelo limite de detecção o sistema não visualiza, resultando em falsos negativos, o sistema acustofluídico apresentou um limite de detecção menor, possibilitando resultados mais precisos e sensíveis para concentrações menores.

Embora existam diferenças em relação aos métodos e condições experimentais utilizadas em cada estudo, os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram com a eficácia e sensibilidade dos sistemas de detecção e aglutinação baseados em antígenos e anticorpos. É importante destacar que o desenvolvimento de novas metodologias e aprimoramento dos sistemas de detecção são essenciais para o diagnóstico e monitoramento de diversas doenças infecciosas e imunológicas. Nesse sentido, este estudo contribui com a validação e aprimoramento dessas técnicas, abrindo caminho para novas pesquisas na área.

Os resultados obtidos indicam que o chip de acustofluídica apresenta maior eficiência na reação Ac-Ag, possibilitando uma interação mais efetiva entre os componentes desde o microcanal, por meio dos efeitos do movimento browniano e da difusão, até a microcavidade acústica, por meio da força de radiação presente no sistema. As etapas de análise permitem a caracterização do teste BIOLÁTEX-PCR no chip de acustofluídica, com parâmetros de imagem que determinam a aglutinação mais rapidamente e com menor quantidade de amostra. Além disso, a identificação da zona de equivalência evita falsos negativos. Esses resultados demonstram que o chip de acustofluídica apresenta um menor limite de detecção comparado com o teste convencional que possibilita uma sensibilidade maior e apresenta grande potencial para a realização de testes em análises clínicas na saúde brasileira.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, foi realizado o estudo das reações entre anticorpos e antígenos em um chip de acustofluidica. Essas reações ocorrem devido às características dos componentes Ac-Ag, que possui interação fraca, não covalentes e reversíveis. Com isso, propôs-se a caracterização de ensaios de imunoglutinação em uma microcavidade acústica. Para tanto, realizou-se a análise de um teste de aglutinação de partículas de látex, conhecido como BIOLÁTEX PCR, para a determinação da proteína C reativa. Durante o teste, foram realizadas análises com um controle positivo, que contém solução aglutinante de látex associado ao antígeno, e um controle negativo, composto por solução salina e látex PCR contendo partículas de látex em suspensão sensibilizadas com anticorpo anti-PCR, associado a partículas recobertas por anticorpos.

Inicialmente, foram caracterizados padrões de aglutinação em uma lâmina por meio da microscopia óptica. Após essa caracterização, foram avaliados padrões de imagem para o controle positivo e negativo no chip, evidenciando a presença ou ausência de aglutinação, respectivamente. Em seguida, avaliamos as condições referentes à zona de equivalência, ao excesso de antígeno e ao excesso de anticorpos, fornecendo padrões que evitam falsos negativos e tornam o teste mais preciso. Além disso, observamos que, além da aglutinação, há a formação de uma rede de aglutinados estáveis, caracterizando um grande aglomerado na região central da microcavidade. Isso ocorre em virtude da ação da força de radiação acústica secundária, com duração superior a 30 minutos. No entanto, nos testes convencionais realizados em um sistema aberto, como placa de teste, essa reação tem tempo limitado devido à evaporação.

Avaliamos parâmetros de reprodutibilidade e repetibilidade, obtendo resultados equivalentes a 100%. Posteriormente, identificamos o limite de detecção do sistema constituído pelo chip de acustofluidica e o comparamos com o limite de detecção do sistema convencional. A análise do limite de detecção de uma técnica analítica é de extrema importância, pois fornece informações sobre a menor quantidade do analito (alvo) que pode ser detectada pelo método. Neste contexto, calculamos o limite de detecção de 187,5 pg/uL para o sistema do chip de acustofluidica e o limite de detecção de 6000 pg/uL para o sistema convencional. Essas diferenças podem indicar informações significativas na sensibilidade e seletividade do método utilizado.

O limite de detecção de 187,5 pg/uL indica que o chip de acustofluídica é 32 vezes melhor que o teste convencional e que a técnica analítica é altamente sensível e pode detectar quantidades muito pequenas do analito em estudo, o que é importante em aplicações que exigem uma detecção precisa em amostras com concentrações muito baixas. Por outro lado, o limite de detecção de 6000 pg/uL indica que a técnica analítica tem uma menor sensibilidade e só pode detectar concentrações maiores do analito.

Utilizamos um sistema acustofluídico em um chip impresso em 3D de baixo custo, fácil fabricação e robusto, devido à técnica apresentar diversas aplicações tanto em análises clínicas quanto em ensaios biológicos. Essa configuração possibilita a agregação e levitação de partículas com respostas rápidas, baixo consumo de amostras e resultados mais eficientes.

Em resumo, demonstrou-se que os ensaios de imunoaglutinação podem ser realizados em sistemas acustofluídicos. A reação Ac-Ag, devido às características únicas do chip, possui um notável potencial para a realização de testes em análises clínicas, uma vez que oferece resultados eficazes tanto em termos de visualização quanto de rapidez na reação, requer pouca quantidade de amostra e possivelmente é mais sensível.

Por fim, esperamos que o presente trabalho tenha contribuído para o estudo de ensaios de imunoaglutinação em sistemas acustofluídicos, especialmente para os testes de aglutinação. Como perspectiva de trabalhos futuros, pretendemos continuar a análise, verificando novos kits e elaborando protocolos para a realização de testes em amostras biológicas em colaboração com a startup de P&D, IntacLab. Para dar continuidade ao trabalho, investigaremos novos métodos de diagnóstico da doença de leishmaniose. Além disso, realizaremos novos ensaios com conjugações de partículas com outros materiais poliméricos através da nanotecnologia, com o intuito de investigar nanopartículas biocompatíveis para testes de aglutinação em doenças que ainda não foram exploradas por esta técnica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology E-book**. [S.l.]: Elsevier Health Sciences, 2014.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8ª edição. **Saunders Elsevier**, 2015.
- ABBAS ABUL K E LICHTMAN, A. H. e. P. S. e. o. **Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico, 6e: Sae-E-Book**. [S.l.]: Elsevier Índia, 2019.
- BARMATZ, M.; COLLAS, P. Acoustic radiation potential on a sphere in plane, cylindrical, and spherical standing wave fields. **The Journal of the Acoustical Society of America**, Acoustical Society of America, v. 77, n. 3, p. 928–945, 1985.
- BARMATZ, M. B.; COLLAS, P. Erratum: Acoustic radiation potential on a sphere in plane, cylindrical, and spherical standing waves [j. acoust. soc. am. 77 (3), 928–945 (1985)]. **The Journal of the Acoustical Society of America**, Acoustical Society of America, v. 140, n. 5, p. 3519–3519, 2016.
- BARNES, R. A.; JENKINS, P.; COAKLEY, W. T. Preliminary clinical evaluation of meningococcal disease and bacterial meningitis by ultrasonic enhancement. **Archives of disease in childhood**, BMJ Publishing Group Ltd, v. 78, n. 1, p. 58–60, 1998.
- BERG, e. a. J. **Bioquímica**. ninth. [S.l.]: Guanabara Koogan, 2021.
- BERTHIER, J.; SILBERZAN, P. **Microfluidics for biotechnology**. [S.l.]: Artech House, 2010.
- BRUUS, H. **Theoretical microfluidics**. [S.l.]: Oxford university press, 2007. v. 18.
- BRUUS, H. Acoustofluidics 7: The acoustic radiation force on small particles. **Lab on a Chip**, Royal Society of Chemistry, v. 12, n. 6, p. 1014–1021, 2012.
- BYSTRYAK, S.; OSSINA, N. A rapid ultrasound particle agglutination method for hiv antibody detection: Comparison with conventional rapid hiv tests. **Journal of virological methods**, Elsevier, v. 249, p. 38–47, 2017.
- CERQUEIRA, A. A. **Detector de distância automotivo**. 2006.
- CERQUEIRA, W. O. **Análise do comportamento de sedimentação de um agregado de partículas em um fluido viscoso**. 2015.
- COAKLEY, W. T.; BARDSLEY, D. W.; GRUNDY, M. A.; ZAMANI, F.; CLARKE, D. J. Cell manipulation in ultrasonic standing wave fields. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Wiley Online Library, v. 44, n. 1, p. 43–62, 1989.
- COSTA, F. P. d. **Alguns aspectos da análise matemática de equações de coagulação-fragmentação**. 2009.
- DEGRE, G.; BRUNET, E.; DODGE, A.; TABELING, P. Improving agglutination tests by working in microfluidic channels. **Lab on a Chip**, Royal Society of Chemistry, v. 5, n. 6, p. 691–694, 2005.
- ELLIS, R. W.; SOBANSKI, M. A. Diagnostic particle agglutination using ultrasound: a new technology to rejuvenate old microbiological methods. **Journal of medical microbiology**, Microbiology Society, v. 49, n. 10, p. 853–859, 2000.

- FRIEND, J.; YEO, L. Y. Microscale acoustofluidics: Microfluidics driven via acoustics and ultrasonics. **Reviews of Modern Physics**, APS, v. 83, n. 2, p. 647, 2011.
- GIJS, M. A. Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications. **Microfluidics and nanofluidics**, Springer, v. 1, p. 22–40, 2004.
- GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. et al. **Kuby immunology**. [S.l.]: Garland Science, 2000.
- GOR'KOV, L. On the force acting on a small particle in an acoustic field in an ideal liquid. In: **Sov. Phys.-Dokl.** [S.l.: s.n.], 1962. v. 6, n. 6, p. 315–317.
- GRIBNAU, T.; LEUVERING, J.; HELL, H. V. Particle-labelled immunoassays: a review. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, Elsevier, v. 376, p. 175–189, 1986.
- GRUNDY, M.; BOLEK, W.; COAKLEY, W.; BENES, E. Rapid agglutination testing in an ultrasonic standing wave. **Journal of immunological methods**, Elsevier, v. 165, n. 1, p. 47–57, 1993.
- GRUNDY, M.; MOORE, K.; COAKLEY, W. Increased sensitivity of diagnostic latex agglutination tests in an ultrasonic standing wave field. **Journal of immunological methods**, Elsevier, v. 176, n. 2, p. 169–177, 1994.
- GUO, F.; LI, P.; FRENCH, J. B.; MAO, Z.; ZHAO, H.; LI, S.; NAMA, N.; FICK, J. R.; BENKOVIC, S. J.; HUANG, T. J. Controlling cell–cell interactions using surface acoustic waves. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 112, n. 1, p. 43–48, 2015.
- HERMANSON, G. T. **Bioconjugate techniques**. [S.l.]: Academic press, 2013.
- HULTSTRÖM, J.; MANNEBERG, O.; DOPF, K.; HERTZ, H. M.; BRISMAR, H.; WIKLUND, M. Proliferation and viability of adherent cells manipulated by standing-wave ultrasound in a microfluidic chip. **Ultrasound in medicine & biology**, Elsevier, v. 33, n. 1, p. 145–151, 2007.
- JANEWAY C. A., T. P. W. M. . S. M. J. **Immunobiology: The immune system in health and disease**. [S.l.]: Garland Science, 2001.
- KARNIADAKIS, G.; BESKOK, A.; ALURU, N. **Microflows and nanoflows: fundamentals and simulation**. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2006. v. 29.
- KINSLER, L. E.; FREY, A. R.; COPPENS, A. B.; SANDERS, J. V. **Fundamentals of acoustics**. [S.l.]: John Wiley & sons, 2000.
- KLOTZ, I. M. **Ligand-receptor energetics: a guide for the perplexed**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 1997.
- LANDAU, L. D.; LIFSHITZ, E. M.; BERESTETSKII, V.; PITAEVSKII, L. **Mecánica de fluidos**. [S.l.]: Reverté, 2021.
- LAURELL, T.; LENSCHOF, A. **Microscale acoustofluidics**. [S.l.]: Royal Society of Chemistry, 2014.
- LAURELL, T.; PETERSSON, F.; NILSSON, A. Chip integrated strategies for acoustic separation and manipulation of cells and particles. **Chemical Society Reviews**, Royal Society of Chemistry, v. 36, n. 3, p. 492–506, 2007.
- LENSHOF, A.; LAURELL, T. Continuous separation of cells and particles in microfluidic systems. **Chemical Society Reviews**, Royal Society of Chemistry, v. 39, n. 3, p. 1203–1217, 2010.
- LI, P.; HUANG, T. J. Applications of acoustofluidics in bioanalytical chemistry. **Analytical chemistry**, ACS Publications, v. 91, n. 1, p. 757–767, 2018.
- LOPES, J. H.; AZARPEYVAND, M.; SILVA, G. T. Acoustic interaction forces and torques acting on suspended spheres in an ideal fluid. **IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control**, IEEE, v. 63, n. 1, p. 186–197, 2015.
- MEDICINA, B. N. de. **Teste de Proteína C Reativa (PCR)**. 2022. Disponível em: <<https://medlineplus.gov/lab-tests/c-reactive-protein-crp-test/>>.
- MOLINA-BOLÍVAR, J.; GALISTEO-GONZÁLEZ, F. Latex immunoagglutination assays. **Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews**, Taylor & Francis, v. 45, n. 1, p. 59–98, 2005.
-

- MOLINARO, L. F. G. C. e. M. R. R. A. E. M. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 1.** [S.l.]: EPSJV; IOC, 2009.
- MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway-8.** [S.l.]: Artmed Editora, 2014.
- MURPHY, K.; WEAVER, C. *Janeway's immunobiology* (new york, london: Gs garland science taylor & francis group). 2017.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** [S.l.]: Artmed Editora, 2022.
- NETO, J. P. L. et al. Força e torque de radiação sobre uma partícula viscoelástica em um fluido ideal. Universidade Federal de Alagoas, 2015.
- NGUYEN, N.-T.; WERELEY, S. T.; SHAEGH, S. A. M. **Fundamentals and applications of microfluidics.** [S.l.]: Artech house, 2019.
- ORTEGA-VINUESA, J.; BASTOS-GONZÁLEZ, D. A review of factors affecting the performances of latex agglutination tests. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, Taylor & Francis, v. 12, n. 4, p. 379–408, 2001.
- PIERCE, A. D. **Acoustics: an introduction to its physical principles and applications.** [S.l.]: Springer, 2019.
- PORRITT, R. J.; MERCER, J. L.; MUNRO, R. Ultrasound-enhanced latex immunoagglutination test (uselat) for detection of capsular polysaccharide antigen of neisseria meningitidis from csf and plasma. **Pathology**, Elsevier, v. 35, n. 1, p. 61–64, 2003.
- PUNT, e. a. J. **Kuby Immunology.** [S.l.]: W.H.Freeman & Co Ltd, 2018.
- QUIBASA-BIOCLIN. **BIOLATEX PCR.** 2023.
https://quibasa.bioclin.com.br/anexos/INSTRUcoes_BIO_LATEX_PCR.pdf.
- RODRIGUES, C. Imunologia básica: Uma revisão aplicada a. **Annual Review Of Immunology**, v. 30, p. 459–489, 2012.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Immunology 6th eds. **USA, Mosby**, p. 323–383, 2001.
- SALINAS, S. R. Einstein and the theory of the brownian movement. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, SciELO Brasil, v. 27, p. 263–269, 2005.
- SANTOS, H. D.; SILVA, A. E.; SILVA, G. C.; LIMA, E. B.; MARQUES, A. S.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; QUEIROZ, A. C.; JACINTO, C.; LOPES, J. H.; ROCHA, U. et al. 3d-printed acoustofluidic devices for raman spectroscopy of cells. **Advanced Engineering Materials**, Wiley Online Library, v. 23, n. 10, p. 2100552, 2021.
- SETTNES, M.; BRUUS, H. Forces acting on a small particle in an acoustical field in a viscous fluid. **Physical Review E**, APS, v. 85, n. 1, p. 016327, 2012.
- SHEEHAN, D. **Physical biochemistry: principles and applications.** [S.l.]: John Wiley & Sons, 2013.
- SILVA, A. S. da; BRITTO, A. L. M.; FERREIRA, R. M. da S. Aplicação da teoria do livre caminho médio no estudo da difusão. **Revista Eletrônica de Ciências Exatas e Tecnológicas**, n. 3, 2022.
- SILVA, G. T.; BRUUS, H. Acoustic interaction forces between small particles in an ideal fluid. **Physical Review E**, APS, v. 90, n. 6, p. 063007, 2014.
- SILVEIRA, W. d. C. et al. **Desenvolvimento de teste rápido para detecção de rotavírus: imunoensaio de captura e aglutinação em látex.** Tese (Doutorado) — Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, 2005.
- SILVERSTEIN, A. M. **A history of immunology.** [S.l.]: Academic Press, 2009.
- SINGER, J. M.; PLOTZ, C. M. The latex fixation test: I. application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. **The American journal of medicine**, Elsevier, v. 21, n. 6, p. 888–892, 1956.
- SMOLUCHOWSKI, M. v. Versuch einer mathematischen theorie der koagulationskinetik kolloider lösungen. **Zeitschrift für physikalische Chemie**, Oldenbourg Wissenschaftsverlag, v. 92, n. 1, p. 129–168, 1918.
-

SOBANSKI, M.; BARNES, R. A.; GRAY, S.; CARR, A.; KACZMARSKI, E.; O'ROURKE, A.; MURPHY, K.; CAFFERKEY, M.; ELLIS, R.; PIDCOCK, K. et al. Measurement of serum antigen concentration by ultrasound-enhanced immunoassay and correlation with clinical outcome in meningococcal disease. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Springer, v. 19, p. 260–266, 2000.

STONE, H. A.; STROOCK, A. D.; AJDARI, A. Engineering flows in small devices: microfluidics toward a lab-on-a-chip. **Annu. Rev. Fluid Mech.**, Annual Reviews, v. 36, p. 381–411, 2004.

SUROVTSEV, I. V.; YURKIN, M. A.; SHVALOV, A. N.; NEKRASOV, V. M.; SIVOLOBOVA, G. F.; GRAZHDANTSEVA, A. A.; MALTSEV, V. P.; CHERNYSHEV, A. V. Kinetics of the initial stage of immunoagglutination studied with the scanning flow cytometer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Elsevier, v. 32, n. 3, p. 245–255, 2003.

THOMAS, N. E.; COAKLEY, W. T. Measurement of antigen concentration by an ultrasound-enhanced latex immunoagglutination assay. **Ultrasound in medicine & biology**, Elsevier, v. 22, n. 9, p. 1277–1284, 1996.

TIJSSEN, P.; ADAM, A. Enzyme-linked immunosorbent assays and developments in techniques using latex beads. **Current Opinion in Immunology**, Elsevier, v. 3, n. 2, p. 233–237, 1991.

VAZ, A. J.; TAKEI, K.; BUENO, E. C. Imunoensaios: fundamentos e aplicações. In: **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. [S.l.: s.n.], 2014. p. 372–372.

WEEMEN, B. V.; SCHUURS, A. Immunoassay using antigen—enzyme conjugates. **FEBS letters**, No longer published by Elsevier, v. 15, n. 3, p. 232–236, 1971.

WIKLUND, M. **Ultrasonic enrichment of microparticles in bioaffinity assays**. Tese (Doutorado) — Fysik, 2004.

WIKLUND, M.; GREEN, R.; OHLIN, M. Acoustofluidics 14: Applications of acoustic streaming in microfluidic devices. **Lab on a Chip**, Royal Society of Chemistry, v. 12, n. 14, p. 2438–2451, 2012.

WIKLUND, M.; HERTZ, H. M. Ultrasonic enhancement of bead-based bioaffinity assays. **Lab on a Chip**, Royal Society of Chemistry, v. 6, n. 10, p. 1279–1292, 2006.

WIKLUND, M.; RADEL, S.; HAWKES, J. Ultrasound-enhanced immunoassays and particle sensors. **Microscale Acoustofluidics**, Royal Society of Chemistry, v. 13, p. 420–451, 2014.
