

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

FLÁVIO DE OLIVEIRA SILVA D'AMATO

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DE ERITRÓCITOS COM
SISTEMA OPTO-ACUSTOFLUÍDICO**

Maceió – Alagoas

2024

FLÁVIO DE OLIVEIRA SILVA D'AMATO

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DE ERITRÓCITOS COM
SISTEMA OPTO-ACUSTOFLUÍDICO**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Física da Universidade Federal de
Alagoas, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Física.

Orientador: Prof. Dr. Uéslen Rocha

Maceió – Alagoas

2024

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

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

- D999e D'Amato, Flávio de Oliveira Silva.
Estudo das propriedades bioquímicas de eritrócitos com sistema opto-
acustofluídico / Flávio de Oliveira Silva D'Amato. – 2024.
75 f. : il. color.
- Orientador: Uéslen Rocha.
Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto
de Física. Maceió, 2024.
- Bibliografia: f. 67-73.
Anexos: f. 74-75.
1. Dispositivo de acustofluídica. 2. Microscopia Confocal Raman. 3. Análise de
componente principal. I. Título.

CDU: 531.77



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**

**“Estudo das propriedades bioquímicas de eritrócitos com sistema
opto-acustofluídico”**

por

Flavio de Oliveira Silva D’Amato

A Banca Examinadora composta pelos professores Uéslen Rocha Silva, como presidente da banca examinadora e orientador, do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas; Carlos Jacinto da Silva, do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas; e Mário Roberto Meneghetti, do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, consideram o **candidato aprovado com conceito “B”**.

Maceió, 26 de agosto de 2024.

Prof. Dr. Uéslen Rocha Silva

Prof. Dr. Carlos Jacinto da Silva

Prof. Dr. Mário Roberto Meneghetti

Dedico este trabalho aos meus pais, Anielo e Valdelita, e em memória ao meu tio George Manoel Júnior e ao meu avô George Manoel.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, Valdelita de Oliveira Silva e Anielo D'Amato Neto que trabalharam muito para conceder uma educação de qualidade para mim e para meu irmão com muita orientação, dedicação, incentivo, paciência e conselhos.

Ao meu irmão Mikhael O.S. D'Amato por me apoiar e ajudar nos afazeres de casa, nos estudos, no trabalho, nas companhias das noites mal dormidas que passamos estudando para buscar novos aprendizados e tecnologias para nos capacitar.

Aos meus amigos Denisson Gutemberg, Luigui Augusto, Yure Matheus, Guilherme Gomes, Adenilson França. Em especial a minha namorada Alice Gomes e aos meus amigos e companheiros de rotina da Sala 09, Denisson e Luigui, que perduraram até fim dessa etapa acompanhando cada batalha e esforço em horas dedicadas aos estudos e em laboratórios. Aos meus amigos Herbert Duarte, Igor Albuquerque, Vinícius Jatobá, Cleysson Darlysson, Walleon Lourenço e João Jânio que ajudaram, acompanharam e estimularam na rotina de estudos dentro e fora do campus da Universidade Federal de Alagoas.

Ao Prof. Dr. Glauber Silva do Grupo de Acústica Física e Microfluídica (GAFM) e Dr. Giclênio Silva (IntacLab e GAFM) pelos ensinamentos e pela oportunidade de participar de ensaios experimentais sobre confecção de dispositivos microfluídicos e acustofluídicos com suas aplicações.

Ao meu orientador Prof. Dr. Uéslen Rocha Silva pelos ensinamentos, orientações, conselhos e oportunidades concedidas durante a graduação e o mestrado, por proporcionar o ingresso no Grupo de Nanofotônica e Imagem (GNFI), desenvolver atividades e instruções para manuseios de equipamentos, programas e na confecção de algoritmos computacionais comentados neste trabalho.

Aos professores do Instituto de Física da UFAL, familiares, amigos e colegas que não constam aqui, mas foram importantes no decorrer da minha formação acadêmica.

Ao CNPq, CAPES e a FAPEAL pela colaboração e suporte no financiamento de pesquisas e desenvolvimento desta dissertação.

“Penso que chega um momento na vida da gente, em que o único dever é lutar ferozmente por introduzir, no tempo de cada dia, o máximo de eternidade.”

Guimarães Rosa

RESUMO

O estudo de novas tecnologias para diagnósticos é vital para o avanço da ciência e da medicina. Um diagnóstico efetivo de doenças deve oferecer informações clínicas sobre a saúde dos pacientes em tempos curtos, sem a necessidade de longas baterias de exames, como também auxiliar em decisões no tratamento. Este trabalho tem como objetivo estudar e desenvolver novas tecnologias com capacidades para diagnósticos, minimamente invasivas, baseadas em Espectroscopia Raman (ER) em conjunto com um dispositivo acustofluídico impresso em 3D. O dispositivo acustofluídico é capaz de capturar e levitar eritrócitos (Erys) através da força de radiação acústica produzida por ondas ultrassônicas em uma cavidade microfluídica. Quando combinado com ER, permite a investigação das propriedades bioquímicas de Erys, seja em aglomerados ou como Erys único, em tempo real, sem contato com paredes ou substratos. Em nossa aplicação, o sistema opto-acustofluídico foi utilizado para obter o espectro de Erys saudável e pré-aquecido utilizando um laser de 532 nm. Em seguida, aplicamos análise multivariada aos principais componentes dos espectros Raman médios para revelar diferenças espectrais associadas ao processo de aquecimento. Esta análise identificou pequenas variações nas proteínas seguidas de alterações significativas nas contribuições lipídicas, permitindo-nos distinguir entre os grupos.

Palavras-chave: Dispositivo de Acustofluídica, Microscopia Confocal Raman, Análise das Componentes Principais.

ABSTRACT

The study of new diagnostic technologies is vital for the advancement of science and medicine. An effective diagnosis of diseases must offer clinical information about the health of patients in short, accurate times, without the need for long batteries of exams, as well as assisting in treatment decisions. This work aims to study and develop new technologies with minimally invasive diagnostic capabilities based on Raman Spectroscopy (RS) in conjunction with a 3D printed acoustofluidic device. The acoustofluidic device is capable of capturing and levitating erythrocytes (Erys) through the acoustic radiation force produced by ultrasonic waves in a microfluidic cavity. When combined with RS, it allows investigation of the biochemical properties of Erys, whether in clusters or as single Erys, in real time, without contact with walls or substrates. In our application, the opto-acoustofluidic system was used to obtain the spectrum of healthy, pre-heated Erys using a 532 nm laser. We then applied multivariate analysis to the principal components of the averaged Raman spectra to reveal spectral differences associated with the heating process. This analysis identified small variations in proteins followed by significant changes in lipid contributions, allowing us to distinguish between groups.

Keywords: Acoustofluidics Device, Confocal Raman Microscopy, Principal Component Analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 - Espalhamento da luz monocromática em tecido	15
Figura 1.2 - Interação da luz monocromática com a matéria, carregando a informação vibracional da amostra.....	16
Figura 1.3 - Diagrama de níveis de energia.....	17
Figura 2.1 - Representa de um corte seccional da geometria de distribuição dos materiais utilizados na confecção do dispositivo de acustofluídica. A figura detalha a entrada (Inlet) e saída (Outlet) do canal microfluídico conectados à uma microcavidade no centro do dispositivo.	41
Figura 2.2 - Processo de diferenciação dos grupos para análise no sistema de opto-acustofluídica.....	42
Figura 2.3 – Configuração experimental do dispositivo de opto-acustofluídica para ensaios de espectroscopia Raman em Erys.	43
Figura 2.4– a) Ilustração do dispositivo acustofluídico desligado, com uma concentração de Erys em sua microcavidade. b) Quando o dispositivo é ligado, o PZT gera ondas ultrassons que são refletidas na lamínula e aprisionam as células em um plano preferencial de levitação.	44
Figura 2.5 – Figura do dispositivo acustofluídico atuando, com micrografia óptica de uma objetiva de 40X dentro da microcavidade com Erys, onde podemos visualizar o foco do laser Raman em uma única célula.....	45
Figura 2.6 - (a) Variação da temperatura dentro da cavidade em função da tensão pico-a-pico aplicada (b) Espectros Raman normalizados de uma mesma Ery em um mesmo plano de aprisionamento para diferentes tensões pico-a-pico (4 e 8Vpp), a inserção mostra a diferença entre os espectros.....	46
Figura 3.1 –Micrografia digital de Erys agregados em tempo real para análise microscópica confocal Raman. (a) Agregado de células controle na microcavidade do dispositivo acustofluídico, a seta preta indica o uma ampliação de 2x na imagem. (b) Agregado das células aquecidas, a seta vermelha indica as regiões de alterações na morfologia que pode ser visualizada pela imagem digital e suas alterações bioquímicas através da espectroscopia Raman.....	47
Figura 3.2 – Comparação entre os espectros Raman adquiridos no plano de levitação com o dispositivo ligado (ON) e com o dispositivo desligado (OFF).....	48
Figura 3.3 – (a) Aquisição do espectro Raman com ponto laser focalizado em uma única Ery controle, b) Aquisição do espectro Raman com ponto laser focalizado em uma única Ery	

aquecida c) Espectros Raman médios normalizados dos grupos controle e aquecidas, a inserção mostra a diferença entre os espectros.	49
Figura 3.4 - (a) Os gráficos de PCA mostram a discriminação de dados com base em células de controle (pontos azuis) e células tratadas termicamente (pontos vermelhos). A variação percentual capturada por cada PC é mostrada entre parênteses ao longo de cada eixo. (b) Loadings do gráfico PC1 para os grupos controle e aquecidas.	50
Figura 3.5 – Espectros Raman médios dos grupos de Erys controles e aquecidas com as marcações referentes as regiões: i) a região de baixo número de onda (600-1.200 cm ⁻¹); (ii) a região de deformação C-H da metina (1.300-1.200 cm ⁻¹); (iii) a região de estiramento do anel pirrol (1.300-1.400 cm ⁻¹); (iv) a região da banda do marcador do spin core (1.500-1.650 cm ⁻¹).	51
Figura 3.6 – Absorção de oxigênio de cada população de Erys.	54
Figure 3.7 – (a) Espectros Raman médios normalizados dos grupos controles e pescadores, (b) diferença entre os espectros Raman médios dos grupos controles e pescadores.	59
Figure 3.8 - (a) PCA representando a discriminação de dados com base em células de controle (pontos pretos) e células de pescadores (pontos vermelhos). A variação percentual capturada por cada PC é mostrada entre parênteses ao longo de cada eixo. (b) Loadings do gráfico PC1 para os grupos controle e pescadores.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Posição da banda, atribuição e coordenada local para Erys controle e aquecidas, obtidos usando uma excitação Raman de 532 nm. A identificação dos modos vibracionais está de acordo com a referência Rusciano e De Luca em 2008.....	52
Tabela 2 - Posição da banda, média, desvio padrão e variância de intensidades das Erys controle e pescadores.....	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.3 Discussão sobre o estado atual da pesquisa em análises de células sanguíneas e suas limitações.....	13
1.2 Princípios da espectroscopia Raman e suas aplicações em biomedicina.....	15
1.2.1 Interpretação clássica do espalhamento Raman	19
1.2.2 Interpretação quântica do espalhamento Raman	21
1.3 Princípios da acustoflúidica e suas aplicações	26
1.3.1. Fundamentos de transporte e fluídos	26
1.3.2. Conservação da massa	27
1.3.3. Conservação do momento linear	28
1.3.4. Teoria da Perturbação	31
1.3.5. Força de radiação acústica.....	33
1.3.6. Fabricação e aplicações	35
1.4 Princípios e Fundamentos da Análise dos Componentes Principais	37
2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS.....	40
2.1 Descrição do design e fabricação do dispositivo opto-acustoflúidico 3D impresso	40
2.2 Coleta e manipulação de Erys	42
2.3 Condições experimentais e aquisição de espectros	43
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
3.1 Análise da formação de agregados de Erys dentro do dispositivo opto-acustoflúidico	47
3.2 Demonstração da aquisição bem-sucedida de espectros Raman de Erys saudáveis e aquecidas	48
3.3 Análise estatística: Aplicação da análise de componentes principais (PCA) para identificação de grupos de Erys.....	49

3.4 Interpretação dos resultados à luz dos objetivos da pesquisa e da revisão da literatura.....	51
3.5 Análise do comportamento mecânico dos eritrócitos.....	55
3.6 Validação: Pescadores do Complexo Lagunar Mundaú-Manguaba.....	58
4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	62
REFERÊNCIAS	65
ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO

A mecânica dos fluídos estuda o comportamento físico de variados fluídos e as leis que os regem. Quando focamos em pequenos volumes averiguamos comportamentos diferentes dos fluídos em relação a teoria tradicional. A microfluídica surgiu na década de 1990. Nessa época, os dispositivos eram fabricados com materiais de silício e vidro como base, para estudos experimentais do comportamento dos fluidos em pequenos volumes (MANZ, A. et al., 1990). A confecção de canais fluídicos cada vez menores tornou-se um desafio para o escoamento e preservação da massa deslocada. Com o avanço tecnológico, novas tecnologias laboratoriais em menores tamanhos começaram a ganhar espaço de produção no mercado, sendo uma das principais foram os dispositivos em escalas micrométricas com finalidade de realizar análises clínicas e laboratoriais em pequenos chips. No final do século XX, os materiais para confecção dos dispositivos mudaram para polímeros que tem custo menor, maior resolução e é menos perigoso na confecção de estruturas (BECKER, H.; LOCASCIO, L.E., 2002).

O fluxo de fluídos de um canal micrométrico possibilita a idealização de sistemas laboratoriais em pequenas estruturas. Ao inserirmos uma cavidade ressonante dentro desses canais, proporcionamos um campo acústico com ondas mecânicas que ao refletirem em um material de alto grau de dureza gera nós de pressão devido à onda estacionária. Assim, surge uma força de radiação acústica que possibilita o armadilhamento e a manipulação de objetos sem contato (TORR, G.R., 1984). A acustofluídica utiliza as técnicas de campos acústicos junto a microfabricação em consonância com microfluídica para possibilitar a manipulação de compostos químicos moleculares e células possibilitando novas tecnologias lab-on-a-chip (LOC) (T. LAURELL, F.P.; NILSSON, A., 2007).

Desde 1930, quando Raman recebeu o prêmio Nobel pela descoberta do efeito Raman, surgiram variadas aplicações propostas em diagnósticos, dentre elas a aplicação em células humanas. O sangue, por exemplo, pode ser descrito como um conjunto de partículas viscoelásticas que ficam contidas no aparelho circulatório. Elas mantêm um movimento regular e unidirecional, devido as contrações do coração. O sangue coletado, separado por punção venosa, tratado com anticoagulantes e em seguida centrifugado, separa-se em várias camadas que mostram sua heterogeneidade (JUNQUEIRA. L.C; CARNEIRO. J., 2007).

Os primeiros estudos da espectroscopia Raman sobre as propriedades estruturais e vibracionais de hemoglobinas (Hb) datam da década de 1970 (apud ATKINS. C. G. et al., 2003)

e são dedicados a investigar as diferenças de sinais entre os estados de oxigenação e de desoxigenação. Toda informação adquirida nesses estados e na forma das membranas celulares fornece importantes parâmetros sobre o envelhecimento ou danos celulares (EFREMOV, E.V. et al., 2008). A espectroscopia Raman possibilita um diagnóstico óptico não invasivo e rápido. Com ela investigamos os componentes moleculares e estruturais das amostras e permite a detecção de alterações nas intensidades espectrais que ocorrem na presença de doenças, como tumores hepáticos, malária, diabetes, doenças celulares, entre outros (DYBAS, J. et al., 2022). O desenvolvimento de novos estudos e técnicas de biópsia óptica promove uma alternativa mais barata à biópsia convencional sem a necessidade de custear grandes laboratórios.

A análise de tecidos e células apresenta algumas restrições clínicas, pois a biópsia tradicional tem natureza invasiva em seu procedimento, a quantidade de amostra é limitada, há custos e tempo envolvidos de mão de obra especializada, uma vez que a lâmina de extensão sanguínea necessita de revisões (PETERSOM, P. et al., 2012). Na biópsia convencional não há uma delimitação completa da área-alvo, pois a amostragem coletada pode não representar a condição real do quadro clínico do paciente. Os exames iniciais para o diagnóstico são de fundamental importância para a evolução clínica positiva do paciente, auxiliando a equipe envolvida a detectar lesões de menor grau ou doenças em estágios iniciais. No entanto, são necessários procedimentos mais sensíveis para diminuir a reincidência ou recorrência das lesões identificadas (D. PEREZ-GUAITA, K.M. et al., 2018; CHAKRABORTY et al., 2020).

1.3 Discussão sobre o estado atual da pesquisa em análises de células sanguíneas e suas limitações.

O sangue é uma solução heterogênea composta por plasma, leucócitos e eritrócitos. Os eritrócitos, também conhecido como hemácias ou glóbulos vermelhos, são células fundamentais de transporte de oxigênio para o corpo e qualquer desordem em seu comportamento pode ser um indicativo de alguma enfermidade (JUNQUEIRA, L.C., 2008).

Os glóbulos vermelhos possuem duas fases de transporte, a primeira é a de fornecer oxigênio aos tecidos do corpo. O oxigênio se transforma em energia e os tecidos liberam dióxido de carbono, que também é transportado de volta aos pulmões pelos glóbulos vermelhos para serem exalados (BAIN, BARBARA J., 2006).

Os eritrócitos não tem organelas, tem formato de disco bicôncavo plano, sua composição é de proteínas, lipídeos e enzimas. São células ricas em hemoglobina. Através da ER pode-se averiguar alterações na hemoglobina, o que pode dificultar a ligação com o oxigênio, determinar um grau de anemia ou diabetes (GROTTO, H. Z. W. O., 2009).

No estudo da saúde dos eritrócitos com espectroscopia Raman, podemos identificar alguns desafios que prejudicam a qualidade do espectro adquirido. As lentes microscópicas padrões têm componentes fluorescentes em sua matriz, uma alternativa viável são as placas de calibração de silício que não são identificadas pelo equipamento. Uma técnica amplamente utilizada é o gotejamento das células na placa, seguido de um tempo longo de espera próximo a uma hora. Em seguida a aquisição do espectro Raman perde intensidade devido ao baixo sinal retroespalhado.

Assim, como solução para o problema temos a área de microfluídica. Desde a década de 90 a microfluídica se tornou uma área de interesse devido à capacidade de processamento e manipulação de pequenas quantidades de amostras ou reagentes com alta resolução espacial (WHITESIDES, G., 2006). Com o desenvolvimento contínuo da nanoengenharia e da nanotecnologia, técnicas de análise ópticas, como a Espectroscopia Raman (ER), possibilitam a obtenção de informações estruturais e químicas dessas amostras em microlitros. O desenvolvimento de dispositivos microfluídicos podem melhorar a sensibilidade, reprodutibilidade e limitar a área de análise, ou seja, a ER aliada a microfluídica tem potencial para uma relação mutualística (PANNEERSELVAM, R., et al., 2022).

A integração do sistema ER com o LOC permite o entendimento do sistema celular, pode-se realizar o encapsulamento de uma única célula de câncer de próstata para realizar investigações microscópicas (WILLNER M.R. et al., 2018). A acustofluídica permite o estudo da eficácia de fármacos em micropoços com testes de suscetibilidade antimicrobiana podendo substituir o uso de reagentes dentro do chip devido ao uso da ER (LIAO, C. C et al., 2021). Em aplicações biomédicas a citometria de fluxo Raman permite a caracterização de células cancerígenas para detecção e vigilância *in vivo* do câncer (XU et al., 2024).

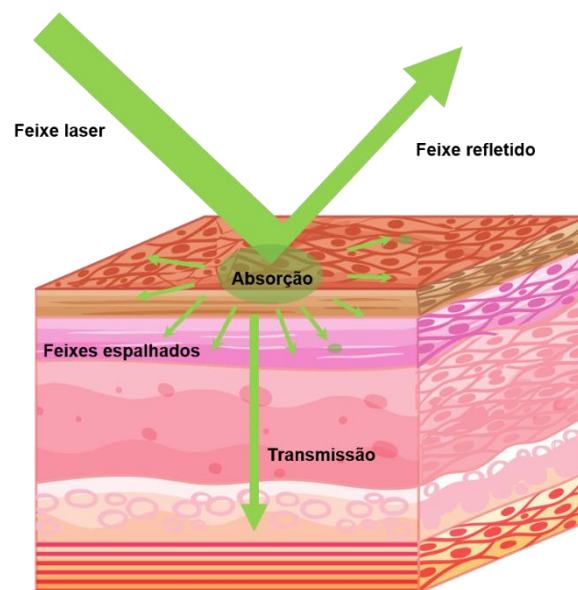
Podemos, portanto, potencializar as informações adquiridas, através dos processos de manufatura aditiva combinando a espectroscopia Raman com as técnicas de acustofluídica. Assim, temos informações bioquímicas e estruturais com alta resolução espacial que nos permite uma análise mais precisa e menos invasiva de tecidos e células, incluindo célula única, em microlitros. Essa abordagem tem o potencial de fornecer uma alternativa viável de

diagnósticos precisos, rápidos, com baixo risco e custo, permite auxiliar a biópsia convencional no diagnóstico e tratamento com medicamentos.

1.2 Princípios da espectroscopia Raman e suas aplicações em biomedicina

A interação das ondas eletromagnéticas com a matéria promoveu diversas aplicações na área da espectroscopia. Considere uma luz monocromática de frequência definida ν_0 . Essa radiação pode interagir com a matéria de diferentes formas. Como podemos observar na Figura 1, ao interagir com um material biológico, um feixe laser pode ser parcialmente transmitido, refletido, absorvido pelas moléculas do material ou ainda espalhado em diversas direções.

Figura 1.1 - Espalhamento da luz monocromática em tecido



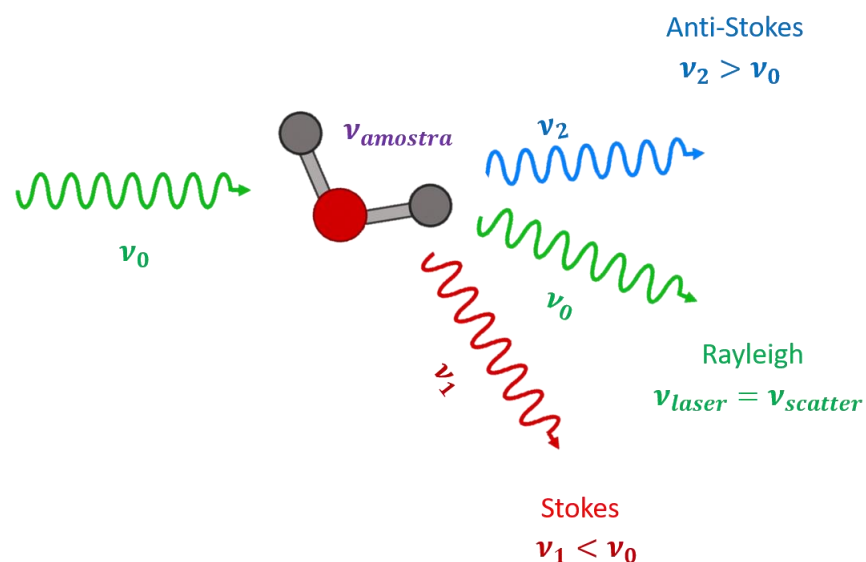
Fonte: Autor 2024.

Dentre os quatro fenômenos observados na Figura 1 – transmissão, reflexão, absorção e espalhamento – este último tem sido objeto de estudo por diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo, com aplicações significativas nas últimas décadas. O espalhamento da luz pode ser classificado em diferentes tipos, sendo os principais: (i) Rayleigh, (ii) Raman Stokes e (iii) Raman anti-Stokes. O espalhamento (i) Rayleigh, ocorre quando a luz incidente interage com o material e é espalhada sem alteração em sua frequência. Nesse caso, a energia dos fótons permanece inalterada, configurando um espalhamento elástico. No entanto, em eventos menos frequentes, os fótons podem ganhar ou perder energia durante a interação com o material,

resultando em um espalhamento inelástico, conhecido como espalhamento Raman. O espalhamento Raman pode ser dividido em dois tipos: (ii) Raman Stokes, quando os fótons incidentes perdem energia para o material, e (iii) Raman anti-Stokes, quando os fótons ganham energia do material.

O espalhamento Raman foi previsto em 1923, quando o físico austríaco Adolf G.S. Smekal postulou teoricamente o comportamento inelástico da luz espalhada, alterando sua frequência em relação ao fóton incidente (SMEKAL, A., 1923 apud SMITH, E., 2005). Esse fenômeno foi observado primeiramente em 1928, quando Chandrasekhara V. Raman e Kariamanikkam S. Krishnan focaram a luz do sol sobre uma amostra através de uma lente telescópica e colocaram uma lente próxima a amostra para coletar a radiação espalhada (RAMAN, C.V. AND KRISHNAN, K.S., 1928 apud SMITH, E., 2005). O experimento tinha um filtro óptico que comprovou que a luz espalhada tinha desvios nas frequências em relação ao feixe incidente. Portanto, o espalhamento Raman é o espalhamento inelástico da luz com frequências deslocadas em relação ao laser da fonte ($\nu_0 \pm \omega$), onde ω é um modo vibracional que carrega informações estruturais do material na região em que o fóton incidiu.

Figura 1.2 - Interação da luz monocromática com a matéria, carregando a informação vibracional da amostra.

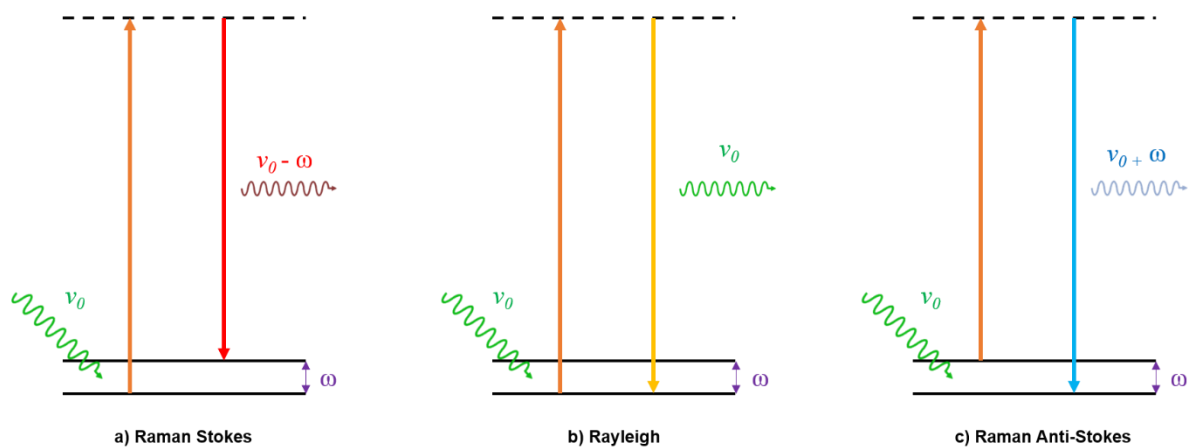


Fonte: Autor 2024.

Como as componentes Raman são opostas, podemos traçar seu desvio em relação à frequência do laser, como ilustrado na Figura 1.3. Ao interagirem com a rede do material, os fótons podem ser espalhados com frequências menores que a dos fótons incidentes, perdendo,

portanto, energia ao criarem fônons ópticos no sistema. Esse fenômeno é classificado como espalhamento Raman Stokes. No entanto, o desvio pode ser positivo em relação às frequências dos fótons incidentes, caracterizando o espalhamento Raman anti-Stokes. Nesse caso, ocorre a aniquilação de fônons ópticos na rede e um aumento na energia do fóton espalhado. A espectroscopia Raman é resultado da interação bosônica entre fótons e fônons.

Figura 1.3 - Diagrama de níveis de energia



Fonte: Autor 2024.

O espectro de radiação é frequentemente caracterizado pelo comprimento de onda (λ). No entanto, como o interesse da espectroscopia Raman é a informação obtida pelo espalhamento da radiação nos modos vibracionais moleculares, devemos colocar o espectro obtido em termos do número de onda (cm^{-1}):

$$c = \lambda \cdot \nu \quad (1.2.1)$$

Escrevendo a frequência ν em termos energéticos:

$$\epsilon = h \cdot \nu \quad (1.2.2)$$

Então, podemos representar os espectros em termos do deslocamento Raman, que compreende a região que houve variação na energia do fóton espalhado:

$$\omega = \frac{\Delta\epsilon}{h \cdot c} \quad (1.2.3)$$

O espalhamento Raman é um evento de baixa probabilidade que ocorre apenas com um a cada 10^6 – 10^8 fótons espalhados. Podemos comparar a razão de ocorrência entre o Raman Stokes e Anti-Stokes dependendo do número de moléculas vibrando no estado fundamental e

em estados excitados. Usando a mecânica estatística de Bose-Einstein, o número de moléculas vibrando em uma dada energia é descrito por:

$$N = g \cdot \exp\left(-\frac{E}{kT}\right) \quad (1.2.4)$$

Onde g representa os níveis de degenerescência, k a constante de Boltzmann ($1,3807 \cdot 10^{23} \text{ J.K}^{-1}$) e T a temperatura em Kelvin. A razão entre as populações no estado excitado N_n em relação ao fundamental N_0 é dada por:

$$\frac{N_n}{N_0} = \frac{g_n}{g_0} \cdot \exp\left(-\frac{(\epsilon_n - \epsilon_0)}{kT}\right) \quad (1.2.5)$$

Em baixas temperaturas, a população de moléculas no estado fundamental de vibração é maior, assim o espalhamento Raman Stokes tem uma ocorrência maior e por fim gera maior intensidade nos espectros obtidos. Como as intensidades dos espectros estão relacionadas a concentração de moléculas na mesma vibração, podemos relacionar picos de um mesmo espectro em diferentes faixas Raman através da razão entre as intensidades.

$$r_s = \frac{I_b}{I_a} \quad (1.2.6)$$

Os avanços da espectroscopia Raman permitiram a realização de experimentos em meios aquosos, amostras contidas em vidro, amostras sem qualquer preparo antes das medidas e assim gerou um grande crescimento em diversas técnicas para diagnósticos e análises. Os espectros são únicos para cada material e moléculas que o constituem, de modo que podemos chamar o espectro Raman de “impressão digital química” da amostra (OPILIK, L. et al., 2013 e SATO, H. et al., 2018). Logo, qualquer alteração na composição química da amostra poderá ser detectada e quantificada por meio desta técnica. A técnica mostrou eficácia na detecção de variações em biomarcadores, como o beta-caroteno, auxiliando no diagnóstico precoce de câncer (UDENSI, J. et al., 2022); identificação de infecções bacterianas (WANG, LIANG et al., 2021); análise química e estruturais de moléculas orgânicas e inorgânicas (SHIPP, D.W. et al., 2017); por ser uma técnica não invasiva, com alta sensibilidade devido à concentração moleculares de lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, podemos utilizá-la na identificação de lesões em células ou tecidos para detecção e prevenção de doenças (OSHIMA, Y. et al., 2023).

A espectroscopia Raman tem aplicabilidade em diagnóstico, pois é uma técnica de biópsia óptica, específica e sensível que identifica alterações de forma confiável em componentes celulares (LIMA, A. M. F. et al., 2021). A espectroscopia Raman tem baixa secção transversal de espalhamento na água com 1 μm de diâmetro no ponto laser focalizado e sua microscopia confocal permite observar espectros *in situ* de células vivas em diferentes posições dentro da célula (NOTINGHER, I. et al., 2002).

Apesar dos bons resultados obtidos até o momento, existem algumas desvantagens na aplicação da espectroscopia Raman convencional. Uma delas é sofrer de baixa intensidade do sinal retroespalhado pelo analito (MOOR, K. et al., 2018), pois quanto maior a potência aplicado, maior será o sinal Raman como também o possível sinal de fluorescência. A alta potência dificulta a visualização do espectro Raman e provoca danos estruturais por aquecimento local. Com respeito a experimentos a nível celular, a utilização do Raman para acompanhamento de células exige a fixação das mesmas em um substrato, o que implica na morte celular. Naturalmente, alguns aspectos das funções celulares não serão percebidos em células mortas. Por outro lado, pode-se realizar a espectroscopia de células vivas, mas as mesmas ficam dispersas em uma solução. Neste caso, é necessário varrer a solução e encontrar uma célula dispersa para realizar a espectroscopia Raman. Este processo pode apresentar baixa eficiência e dificultar o monitoramento de uma mesma célula isolada repetidas vezes para confirmação do seu espectro.

1.2.1 Interpretação clássica do espalhamento Raman

Vamos começar essa seção imaginando um feixe de luz monocromático incidindo em uma amostra. Essa amostra espalha a radiação na direção de um detetor que mede a quantidade de fótons espalhados numa dada direção. Uma pequena fração de fótons troca energia com as moléculas da amostra durante a colisão. Vamos pegar uma pequena parte da luz espalhada com frequência diferente em relação a do feixe. Vamos explicação clássica a nível molecular do espalhamento Raman (LONG, D. A., 2002).

O momento de dipolo induzido da molécula submetida ao campo de radiação é dado por (SMITH, E. 2019):

$$\mu = \alpha\mathcal{E} \quad (1.2.1.1)$$

Em que α representa o fator de polarizabilidade da molécula e \mathcal{E} é a intensidade do campo elétrico que incide no material. Podemos representar o campo elétrico oscilando com o tempo em uma frequência ν_0 :

$$\mathcal{E} = \mathcal{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (1.2.1.2)$$

Portanto, podemos reescrever o momento de dipolo induzido como:

$$\mu = \alpha \mathcal{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (1.2.1.3)$$

Mas a polarizabilidade varia conforme a mudança da geometria da molécula no tempo. Então devemos escrever a polarizabilidade em termos de seu valor em equilíbrio e de sua variação em relação a posição de equilíbrio (r_0). Escrevendo como uma expansão de Taylor:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial r}\right)_{r_0} (r - r_0) + \dots \quad (1.2.1.4)$$

Vamos reescrever a expansão em termos da coordenada local q_i . O modo normal de vibração é:

$$q_i = q_i^0 \cos(2\pi\nu_i t) \quad (1.2.1.5)$$

Onde ν_i é a frequência do modo normal i . Portanto, encontramos que:

$$\mu = \alpha_0 \mathcal{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q_i}\right)_0 \mathcal{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) q_i^0 \cos(2\pi\nu_i t) \quad (1.2.1.6)$$

Sabendo que $2 \cos(a) \cos(b) = \cos(a + b) + \cos(a - b)$, podemos reescrever:

$$\mu = \alpha_0 \mathcal{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q_i}\right)_0 \mathcal{E}_0 q_i^0 [\cos(2\pi(\nu_0 - \nu_i)t) + \cos(2\pi(\nu_0 + \nu_i)t)] \quad (1.2.1.7)$$

Os últimos dois termos oscilantes na diferença e soma de frequências, são os espalhamentos Raman Stokes e Anti-Stokes, respectivamente. Pela teoria clássica a intensidade de radiação emitida pela oscilação de um dipolo é dada por:

$$I = \frac{\nu_0^4}{12\pi\epsilon_0 c^3} |\mu|^2 \quad (1.2.1.8)$$

A razão entre as intensidades do espalhamento Raman Stokes e Anti-Stokes na interpretação clássica é dada por:

$$\frac{I(\text{Stokes})}{I(\text{anti} - \text{Stokes})} = \frac{(v_0 - v_i)^4}{(v_0 + v_i)^4} \quad (1.2.1.9)$$

A interpretação clássica não representa totalmente o que acontece em laboratórios, pois desconsidera a influência da temperatura na aquisição dos espectros Raman.

1.2.2 Interpretação quântica do espalhamento Raman

Vamos descrever a interação entre os fótons e as vibrações moleculares da matéria. Na visão energética do sistema, vamos descrever o Hamiltoniano da molécula \hat{H}_m sendo a soma entre as energias eletrônicas \hat{H}_e e vibracionais \hat{H}_v :

$$\hat{H}_{mol} = \hat{H}_e + \hat{H}_v \quad (1.2.2.1)$$

O campo de radiação eletromagnética tem sua energia representada pelo Hamiltoniano \hat{H}_r :

$$\hat{H}_{rad} = \sum_k \hbar\omega_k \left(a_k^\dagger a_k + \frac{1}{2} \right) \quad (1.2.2.2)$$

Onde a_k e a_k^\dagger são os operadores de aniquilação e criação para o modo do campo k .

A interação entre o campo de radiação e a matéria é descrita por uma Hamiltoniano de interação:

$$\hat{H}_{int} = -\hat{\mu} \cdot \hat{\mathcal{E}} \quad (1.2.2.3)$$

Onde $\hat{\mu}$ é o operador de dipolo elétrico da molécula e $\hat{\mathcal{E}}$ é o operador do campo elétrico. Assim o Hamiltoniano total do sistema é dado por:

$$\hat{H}_{sis} = \hat{H}_{mol} + \hat{H}_{rad} + \hat{H}_{int} \quad (1.2.2.4)$$

O espalhamento Raman pode ser tratado como uma perturbação no sistema devido a um campo de fótons. O sistema faz a transição do estado inicial $|i\rangle$ para o estado final $|f\rangle$, passando por estados intermediários virtuais $|r\rangle$, onde E_i , E_r e E_f são as energias correspondentes de cada estado apresentado.

Vamos descrever o espalhamento Raman utilizando o formalismo da mecânica quântica para abordar as transições de estados quânticos e a interação da luz com a matéria.

O sistema não perturbado pela luz incidente, pode ser descrito pela função de onda:

$$\psi_r^{(0)} = \psi_r^{(0)} e^{-i(\omega_r - i\gamma_r)t} \quad (1.2.2.5)$$

O termo γ_r representa a largura de banda de energia no estado $|r\rangle$. Utilizando a teoria da perturbação, vamos definir uma função de onda perturbada dependente do tempo e do estado $|r\rangle$:

$$\psi'_r = \psi_r^{(0)} + \psi_r^{(1)} + \psi_r^{(2)} + \dots + \psi_r^{(n)} \quad (1.2.2.6)$$

A função de onda do sistema pode ser descrita por:

$$\psi_r^{(n)} = \sum_r a_{p_r}^n \psi_r^{(0)} \quad (1.2.2.7)$$

Podemos transcrever o dipolo total de transição através dos estados inicial $|i\rangle$ e final $|f\rangle$:

$$\mu = \langle \psi'_f | \hat{\mu} | \psi'_i \rangle \quad (1.2.2.8)$$

Combinando a (1.2.2.6) com (1.2.2.8), temos a expansão:

$$(\mu)_{fi} = (\mu^{(0)})_{fi} + (\mu^{(1)})_{fi} + (\mu^{(2)})_{fi} + \dots + (\mu^{(n)})_{fi} \quad (1.2.2.9)$$

Onde o dipolo total de transição é descrito da forma:

$$\begin{aligned} (\mu^{(0)})_{fi} &= \langle \psi_f^{(0)} | \hat{\mu} | \psi_i^{(0)} \rangle \\ (\mu^{(1)})_{fi} &= \langle \psi_f^{(0)} | \hat{\mu} | \psi_i^{(1)} \rangle + \langle \psi_f^{(1)} | \hat{\mu} | \psi_i^{(0)} \rangle \\ (\mu^{(2)})_{fi} &= \langle \psi_f^{(0)} | \hat{\mu} | \psi_i^{(2)} \rangle + \langle \psi_f^{(1)} | \hat{\mu} | \psi_i^{(1)} \rangle + \langle \psi_f^{(2)} | \hat{\mu} | \psi_i^{(0)} \rangle \\ &\dots \end{aligned} \quad (1.2.2.10)$$

Para o espalhamento Raman vamos considerar: o momento de dipolo de transição de primeira ordem, o Hamiltoniano de interação puramente elétrico e a perturbação é produzida por um campo de radiação monocromático com frequência definida pela relação: $\nu_0 = 2\pi\omega_0$.

$$(\mu^{(1)})_{fi} = \sum_r a^*_{fr} \langle \psi_r^{(0)} | \hat{\mu} | \psi_i^{(0)} \rangle + \sum_r a_{ir} \langle \psi_f^{(0)} | \hat{\mu} | \psi_r^{(0)} \rangle \quad (1.2.2.11)$$

Os coeficientes a_{ir} e a^*_{fr} são dados pela equação:

$$\begin{aligned} a_{ir} &= -\frac{i}{\hbar} \int_0^t \langle \psi_r^{(0)} | \hat{H}_{int} | \psi_i^{(0)} \rangle \\ a^*_{fr} &= \frac{i}{\hbar} \int_0^t \langle \psi_f^{(0)} | \hat{H}_{int} | \psi_r^{(0)} \rangle \end{aligned} \quad (1.2.2.12)$$

Substituindo (1.2.2.12) em (1.2.2.11):

$$\begin{aligned} (\mu^{(1)})_{fi} &= \sum_r \frac{i}{\hbar} \int_0^t \langle \psi_f^{(0)} | \hat{H}_{int} | \psi_r^{(0)} \rangle \langle \psi_r^{(0)} | \hat{\mu} | \psi_i^{(0)} \rangle \\ &+ \sum_r -\frac{i}{\hbar} \int_0^t \langle \psi_r^{(0)} | \hat{H}_{int} | \psi_i^{(0)} \rangle \langle \psi_f^{(0)} | \hat{\mu} | \psi_r^{(0)} \rangle \end{aligned} \quad (1.2.2.13)$$

Substituindo (1.2.2.3) em (1.2.2.16). Podemos escrever o momento de dipolo em relação a componente ρ e o termo do momento de dipolo de transição devido a interação em relação a componente σ .

$$\begin{aligned} (\mu^{(1)}_{\rho})_{fi} &= \sum_r \frac{i}{\hbar} \int_0^t \langle \psi_f^{(0)} | -\hat{\mu}_{\sigma} \cdot \hat{\mathcal{E}} | \psi_r^{(0)} \rangle \langle \psi_r^{(0)} | \hat{\mu}_{\rho} | \psi_i^{(0)} \rangle \\ &+ \sum_r -\frac{i}{\hbar} \int_0^t \langle \psi_r^{(0)} | -\hat{\mu}_{\sigma} \cdot \hat{\mathcal{E}} | \psi_i^{(0)} \rangle \langle \psi_f^{(0)} | \hat{\mu}_{\rho} | \psi_r^{(0)} \rangle \end{aligned} \quad (1.2.2.14)$$

A componente elétrica da perturbação pode ser escrita como:

$$\mathcal{E}_i = \tilde{\mathcal{E}}_{i0} e^{-i(\omega_0)t} + \tilde{\mathcal{E}}^*_{i0} e^{i(\omega_0)t} \quad (1.2.2.15)$$

Portanto:

$$\begin{aligned}
(\mu^{(1)}_{\rho})_{fi} = & \frac{1}{2\hbar} \sum_{r \neq i} \left\{ \frac{\langle \psi_f^{(0)} | \hat{\mu}_{\rho} | \psi_r^{(0)} \rangle \langle \psi_r^{(0)} | \hat{\mu}_{\sigma} | \psi_i^{(0)} \rangle}{\omega_{ri} - \omega_0 - i\gamma_r} \tilde{\mathcal{E}}_{\sigma 0} e^{-i(\omega_0 - \omega_{fi})t} \right. \\
& + \left. \frac{\langle \psi_f^{(0)} | \hat{\mu}_{\rho} | \psi_r^{(0)} \rangle \langle \psi_r^{(0)} | \hat{\mu}_{\sigma} | \psi_i^{(0)} \rangle}{\omega_{ri} + \omega_0 + i\gamma_r} \tilde{\mathcal{E}}^*_{\sigma 0} e^{i(\omega_0 + \omega_{fi})t} \right\} \\
& + \frac{1}{2\hbar} \sum_{r \neq f} \left\{ \frac{\langle \psi_r^{(0)} | \hat{\mu}_{\rho} | \psi_i^{(0)} \rangle \langle \psi_f^{(0)} | \hat{\mu}_{\sigma} | \psi_r^{(0)} \rangle}{\omega_{rf} - \omega_0 - i\gamma_r} \tilde{\mathcal{E}}^*_{\sigma 0} e^{i(\omega_0 + \omega_{fi})t} \right. \\
& + \left. \frac{\langle \psi_r^{(0)} | \hat{\mu}_{\rho} | \psi_i^{(0)} \rangle \langle \psi_f^{(0)} | \hat{\mu}_{\sigma} | \psi_r^{(0)} \rangle}{\omega_{rf} + \omega_0 + i\gamma_r} \tilde{\mathcal{E}}_{\sigma 0} e^{-i(\omega_0 - \omega_{fi})t} \right\} \quad (1.2.2.16) \\
& + \text{complexo conjugado}
\end{aligned}$$

A energia do estado $|r\rangle$ é descrita por:

$$E_r = \hbar\omega_r \quad (1.2.2.17)$$

Com $\omega_{ri} = \omega_r - \omega_i$. O termo $(\omega_0 - \omega_{fi}) > 0$ descreve o espalhamento real da radiação eletromagnética no material. Dando origem aos espalhamentos: Rayleigh ($\omega_{fi} = 0$), onde os estados iniciais e finais têm a mesma energia; Raman Stokes ($\omega_{fi} > 0$), onde o estado final tem maior energia que o estado inicial e Raman anti-Stokes ($\omega_{fi} < 0$), onde o estado final é de menor energia que o estado inicial. O termo $(\omega_0 + \omega_{fi})$ representa descrevem a emissão induzida estimulada de dois quanta, e não consideraremos esse caso.

Vamos considerar apenas as componentes reais do espalhamento Raman, portanto, o momento de dipolo elétrico é:

$$\begin{aligned}
(\mu^{(1)}_{\rho})_{fi} = & \frac{1}{2\hbar} \sum_{r \neq i, f} \left\{ \frac{\langle \psi_f^{(0)} | \hat{\mu}_{\rho} | \psi_r^{(0)} \rangle \langle \psi_r^{(0)} | \hat{\mu}_{\sigma} | \psi_i^{(0)} \rangle}{\omega_{ri} - \omega_0 - i\gamma_r} \tilde{\mathcal{E}}_{\sigma 0} e^{-i(\omega_0 - \omega_{fi})t} \right. \\
& + \left. \frac{\langle \psi_r^{(0)} | \hat{\mu}_{\rho} | \psi_i^{(0)} \rangle \langle \psi_f^{(0)} | \hat{\mu}_{\sigma} | \psi_r^{(0)} \rangle}{\omega_{rf} + \omega_0 + i\gamma_r} \tilde{\mathcal{E}}_{\sigma 0} e^{-i(\omega_0 - \omega_{fi})t} \right\} \quad (1.2.2.18) \\
& + \text{complexo conjugado}
\end{aligned}$$

Para as funções de onda ψ_i e ψ_f a largura de banda $\gamma_r = 0$, pois são correspondentes a estados com energia inteira e não virtuais. O momento de dipolo elétrico é proporcional ao campo elétrico, associando a (1.2.1.1) podemos redefinir a polarizabilidade de transição como:

$$(\alpha_{\rho\sigma})_{fi} = \frac{1}{\hbar} \sum_{r \neq i, f} \left\{ \frac{\langle \psi_f^{(0)} | \hat{\mu}_\rho | \psi_r^{(0)} \rangle \langle \psi_r^{(0)} | \hat{\mu}_\sigma | \psi_i^{(0)} \rangle}{\omega_{ri} - \omega_0} + \frac{\langle \psi_r^{(0)} | \hat{\mu}_\rho | \psi_i^{(0)} \rangle \langle \psi_f^{(0)} | \hat{\mu}_\sigma | \psi_r^{(0)} \rangle}{\omega_{rf} + \omega_0} \right\} \quad (1.2.2.19)$$

Tal que:

$$(\mu^{(1)}_{\rho})_{fi} = \frac{1}{2} (\alpha_{\rho\sigma})_{fi} \{ \tilde{\mathcal{E}}_{\sigma 0}(\omega_0) e^{-i(\omega_0 - \omega_{fi})t} + \tilde{\mathcal{E}}^*_{\sigma 0}(\omega_0) e^{i(\omega_0 - \omega_{fi})t} \} \quad (1.2.2.18)$$

Para amplitudes de campos elétricos reais de mesma amplitude $\tilde{\mathcal{E}}_{\sigma 0}(\omega_0) = \tilde{\mathcal{E}}^*_{\sigma 0}(\omega_0)$, podemos reescrever como:

$$(\mu^{(1)}_{\rho})_{fi} = (\alpha_{\rho\sigma})_{fi} \tilde{\mathcal{E}}_{\sigma 0}(\omega_0) \cos(\omega_0 - \omega_{fi})t \quad (1.2.2.19)$$

Quando aplicamos em (1.2.1.8). A intensidade depende da ocupação do estado inicial. Essa ocupação é determinada pelo fator de distribuição de Boltzmann (Long, D.A., 2002). Portanto a razão entre as intensidades Stokes e anti-Stokes é dada por:

$$\frac{I(Stokes)}{I(anti - Stokes)} = \frac{(v_0 - v_i)^4}{(v_0 + v_i)^4} e^{\hbar c v_i / kT} \quad (1.2.1.20)$$

1.3 Princípios da acustofluídica e suas aplicações

A microfluídica surgiu na intenção de manipular pequenos volumes de fluídos. O transporte de fluídos em escalas micrométricas permite ensaios *in vitro* de materiais biológicos de pequena escala e análise químicas avançadas. Devido ao baixo consumo de substâncias e reagentes, a microfluídica é uma área de interesse para aplicações em biomedicina e engenharia biomédica.

1.3.1. Fundamentos de transporte e fluídos

Podemos definir a massa como uma grandeza física fundamental que está relacionada a uma quantidade de matéria formada pelos átomos. A matéria é encontrada na natureza na forma de aglomerados e são organizadas de acordo com as condições de contorno dependentes da Energia Interna, Número de átomos, Pressão, Volume e Temperatura em diferentes estados físicos: sólido, líquido, gasoso, plasma e condensado de Bose-Einstein. Ao analisarmos as propriedades físicas em fluídos (gases ou líquidos) da forma macroscópica, podemos considerar um meio contínuo, formado por elementos infinitesimais com um número extremamente alto de moléculas.

Em microssistemas, há uma competição entre as forças volumétricas (F_V), por exemplo: gravidade e forças inerciais, e as forças de superfície (F_S) como tensão e viscosidade. A lei da Escala rege o comportamento dos fluídos em microcanais, pois expressa a variação das quantidades físicas com tamanho l de diferentes sistemas ou objetos mantendo os vínculos constantes.

$$\frac{F_S}{F_V} \propto \frac{l^2}{l^3} = l^{-1} \quad (1.3.1)$$

A lei da Escala implica que em sistemas LOC as forças de superfície são dominantes em relação as forças volumétricas e esses fatores devem ser considerados na confecção de um circuito a ser percorrido pelo fluído.

A mecânica dos fluídos dependem de fatores associados a velocidade e a densidade na escala molecular. Para estudarmos os dispositivos LOC temos que aplicar a hipótese da continuidade em fluídos que afirma que podemos aplicar as propriedades físicas macroscópicas

do fluido considerando um elemento contínuo ao invés de discretizados por moléculas. Assim podemos considerar o volume dado como um limite pequeno e finito de uma partícula fluida, como também podemos aplicar os mesmos princípios mecânicos que governam o fluxo em macroescala.

Os sistemas microfluídicos têm menor consumo de reagentes devido à manipulação de micro a ato litros de analitos, diminuindo os custos e possibilitando um uso mais eficiente de materiais limitados. A sua razão superfície-volume tem eficácia na dissipação térmica, alto índice de separação ou mixagem dos analitos, obtendo um baixo número de Reynolds que reduz a dispersão das partículas e privilegia o fluxo laminar.

1.3.2. Conservação da massa

Vamos considerar N partículas fluidas compondo um fluido compressível, ou seja, sua densidade de massa ρ é obtida em função do vetor posição \mathbf{r} e do tempo t . A densidade de massa pode ser escrita como a razão entre a massa total M e o elemento de volume V_0 :

$$\rho(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{V_0} \sum_{i=1}^{N(t)} m_i \quad (1.3.2.1)$$

Onde M é a massa total formada pela soma da massa de cada partícula m_i dentro da região de volume V_0 . Cada partícula fluida é formada por átomo ou moléculas com velocidades i -ésimas, ela se desloca no volume V_0 com uma velocidade de convecção dada por:

$$\mathbf{v}(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{\rho(\mathbf{r}, t) \cdot V_0} \sum_{i=1}^{N(t)} m_i \mathbf{v}_i \quad (1.3.2.2)$$

Em um sistema isolado composto por fluidos, a massa total não pode variar espontaneamente sem que haja um fluxo de massa na região. Vamos definir a densidade de corrente de massa $\mathbf{J}(\mathbf{r}, t)$ como o produto da densidade de massa e a velocidade de convecção:

$$\mathbf{J}(\mathbf{r}, t) = \rho(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) \quad (1.3.2.3)$$

Podemos calcular a variação da massa total M na região delimitada por V_0 através do fluxo que passa pela superfície S_0 . Derivando parcialmente a (1.3.2.1) em relação ao tempo e

reescrevendo em termos da densidade de corrente que passa em um elemento de área da temos:

$$\frac{\partial M(V, t)}{\partial t} = \int_V d^3r \cdot \frac{\partial \rho(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = - \int_{\partial V} \mathbf{n} \cdot \mathbf{J}(\mathbf{r}, t) da \quad (1.3.2.4)$$

Aplicando o Teorema da Divergência de Gauss na última parte da equação, temos:

$$\int_V \nabla \cdot \mathbf{J}(\mathbf{r}, t) d^3r = \int_{\partial V} \mathbf{n} \cdot \mathbf{J}(\mathbf{r}, t) da \quad (1.3.2.5)$$

Substituindo a (1.3.2.5) e a (1.3.2.3) na (1.3.2.4), temos:

$$\int_V \frac{\partial \rho(\mathbf{r}, t)}{\partial t} d^3r = - \int_V \nabla \cdot [\rho(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t)] d^3r \quad (1.3.2.6)$$

Assim, os termos dos integrandos devem ser idênticos, resultando na equação da continuidade das massas:

$$\frac{\partial \rho(\mathbf{r}, t)}{\partial t} + \nabla \cdot [\rho(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t)] = 0 \quad (1.3.2.7)$$

Note que em fluídos incompressíveis, a densidade não varia localmente, portanto a conservação da massa é dada apenas pela velocidade de convecção:

$$\nabla \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) = 0$$

1.3.3. Conservação do momento linear

Com respeito a velocidade Euleriana dentro de um fluído, cada partícula fluida com densidade de massa ρ tem associado um momento de densidade linear $\rho(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{v}_i(\mathbf{r}, t)$ para dado volume fixo. Vamos considerar o momento do fluído dentro de um volume arbitrário fixo em uma região V . O momento linear total será dado pela soma dos momentos de cada partícula fluida:

$$P(\mathbf{V}, t) = \sum_{i=1}^{N(t)} P_i(\mathbf{V}, t) = V_0 \sum_{i=1}^{N(t)} \rho(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{v}_i(\mathbf{r}, t) \quad (1.3.3.1)$$

A soma das forças atuantes no fluido em dado volume fixo é representada pela variação do momento com relação ao tempo da i -ésima partícula:

$$\frac{\partial P_i(V, t)}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial t} \int_V [\rho(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{v}_i(\mathbf{r}, t)] d^3r \quad (1.3.3.2)$$

Assim, aplicando a regra do produto:

$$\frac{\partial P_i(V, t)}{\partial t} = \int_V \left[\frac{\partial \rho(\mathbf{r}, t)}{\partial t} \cdot \mathbf{v}_i(\mathbf{r}, t) + \rho(\mathbf{r}, t) \cdot \frac{\partial \mathbf{v}_i(\mathbf{r}, t)}{\partial t} \right] d^3r \quad (1.3.3.3)$$

A variação do momento linear é regida pela Segunda Lei de Newton, logo podemos elencar que a partícula fluida está sujeita a soma das contribuições das forças volumétricas, forças superficiais de contato entre o fluido e a região, forças devido à pressão de radiação e viscosidade (BRUUS, 2008). Então podemos reescrever a (1.3.3.3) para um volume fixo V_0 :

$$\begin{aligned} & \frac{\partial}{\partial t} \int_{V_0} \rho(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) d^3r \\ & + \int_{\partial V_0} [p(\mathbf{r}, t) - \boldsymbol{\sigma}' + \rho(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t)] \cdot \mathbf{n} d^2r \\ & + \int_{V_0} F_v d^3r = 0 \end{aligned} \quad (1.3.3.4)$$

Onde $p(\mathbf{r}, t)$ representa a pressão na posição \mathbf{r} , $\boldsymbol{\sigma}'$ é o tensor de viscosidade, f_v representada a densidade de força volumétrica. Podemos aplicar o teorema de Gauss para transformar as integrais de superfície em integrais de volume:

$$\begin{aligned} & \frac{\partial}{\partial t} \int_{V_0} \rho(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) d^3r \\ & + \int_{V_0} \nabla \cdot [p(\mathbf{r}, t) - \boldsymbol{\sigma}' + \rho(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t)] d^3r \\ & + \int_{V_0} F_v d^3r = 0 \end{aligned} \quad (1.3.3.5)$$

Como o volume escolhido é arbitrário, temos como condição que:

$$\frac{\partial}{\partial t} (\rho(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t)) + \nabla p(\mathbf{r}, t) - \nabla \cdot \boldsymbol{\sigma}' + \nabla \cdot (\rho(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t)) + F_v = 0 \quad (1.3.3.6)$$

O tensor de tensão viscosa é descrito pela relação (BRUSS, 2008):

$$\boldsymbol{\sigma}' = \eta(\partial_j v_i + \partial_i v_j) + (\beta - 1)\eta(\partial_k v_k)\delta_{ij} \quad (1.3.3.7)$$

Sendo η a viscosidade dinâmica, o primeiro termo da (1.3.3.7) é atrelado à viscosidade de cisalhamento dinâmico em um fluido incompressível, que pode ser entendido como o a diferença de velocidade de partícula fluida em relação a outra em uma camada diferente. Já o segundo termo representa a viscosidade dilatacional que é a viscosidade influenciada pela variação do volume devido a uma tensão aplicada, nesse caso, pela compressibilidade com β sendo a razão adimensional entre dois tipos de viscosidades.

Podemos reescrever a (1.3.3.6):

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial t}(\rho(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t)) + \nabla p(\mathbf{r}, t) - \eta \nabla^2 \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) - \beta \eta \nabla(\nabla \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t)) \\ - \frac{\partial \rho(\mathbf{r}, t)}{\partial t} \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) + \rho(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) \cdot \nabla \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t) + F_v = 0 \end{aligned} \quad (1.3.3.8)$$

Em fluidos newtonianos a dada temperatura os coeficientes de viscosidade e compressibilidade do tensor de viscosidade aproximam-se de constantes. Colocando os termos associados a densidade de forças inerciais no lado esquerdo da equação e as densidades de forças intrínsecas para o lado direito, podemos escrever a equação de Navier-Stokes:

$$\rho(\mathbf{r}, t) \left[\frac{\partial}{\partial t}(\mathbf{v}(\mathbf{r}, t)) + (\mathbf{v}(\mathbf{r}, t) \cdot \nabla)\mathbf{v}(\mathbf{r}, t) \right] = -\nabla p(\mathbf{r}, t) + \eta \nabla^2 \mathbf{v} + \beta \eta \nabla(\nabla \cdot \mathbf{v}(\mathbf{r}, t)) + F_v \quad (1.3.3.9)$$

Em pequenas escalas as contribuições das forças volumétricas são muito menores que as outras forças, podendo ser desprezada. Já as forças superfícies como as de contato entre a parede e o fluido depende das derivadas parciais das velocidades no escoamento. Assim o tensor de viscosidade tem papel importante na dinâmica do fluido.

1.3.4. Teoria da Perturbação

Vamos considerar um sistema adiabático composto por um fluido em repouso, ou seja, o campo de velocidade imposto é $\mathbf{v}_0 = 0$, com densidade ρ_0 e pressão p_0 constantes. O fluido obedece às equações de conservação de massa e de momento descritas nas seções anteriores, inicialmente sem interações com ondas acústicas. Considere pequenas perturbações de primeira ordem, tal que:

$$\rho = \rho_0 + \rho_1 \quad (1.3.4.1)$$

$$p = p_0 + c_0^2 \rho_1 \quad (1.3.4.2)$$

$$\mathbf{v} = \mathbf{v}_1 \quad (1.3.4.3)$$

Aplicando para o campo de pressão a expansão por série de Taylor em torno da densidade ρ_0 . Temos:

$$p - p_0 = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(\rho - \rho_0)^n}{n!} \cdot \frac{\partial^n p}{\partial \rho^n} \quad (1.3.4.4)$$

Para $n = 1$, e isolando ρ_1 na (1.3.4.1), podemos reescrever a pressão do sistema como:

$$p = p_0 + \frac{\partial p}{\partial \rho} \cdot \rho_1 \quad (1.3.4.5)$$

Podemos interpretar a variação de pressão no fluido em função da densidade como uma onda de pressão, ou seja, uma onda mecânica que se propaga com velocidade definida em um meio material. Assim, por análise dimensional a derivada parcial na (1.3.4.4) tem dimensão de velocidade ao quadrado.

Comparando (1.3.4.2) e (1.3.4.5), podemos caracterizar a constante c_0 como a velocidade de propagação da onda de pressão em função da densidade.

$$c_0^2 = \frac{\partial p}{\partial \rho} \quad (1.3.4.6)$$

e, portanto:

$$p_1 = c_0^2 \rho_1 \quad (1.3.4.7)$$

Aplicando os resultados das equações (1.3.4.1), (1.3.4.2) e (1.3.4.3) nas equações de conservação da massa (1.3.2.7) e de continuidade de Navier-Stokes (1.3.3.9), desconsiderando as forças volumétricas e os produtos dos termos em primeira ordem:

$$\frac{\partial \rho_1}{\partial t} = -\nabla \cdot (\rho_0 \mathbf{v}_1) \quad (1.3.4.8)$$

$$\rho_0 \frac{\partial \mathbf{v}_1}{\partial t} = -c_0^2 \nabla p_1 + \eta \nabla^2 \mathbf{v}_1 + \beta \eta \nabla (\nabla \cdot \mathbf{v}_1) \quad (1.3.4.9)$$

Derivando parcialmente em relação ao tempo t (1.3.4.8), obtemos:

$$\frac{\partial^2 \rho_1}{\partial t^2} = -\nabla \cdot \left(\rho_0 \frac{\partial \mathbf{v}_1}{\partial t} \right) \quad (1.3.4.10)$$

Substituindo a (1.3.4.10) na (1.3.4.9):

$$\begin{aligned} \frac{\partial^2 \rho_1}{\partial t^2} &= c_0^2 \nabla^2 \rho_1 - \eta \nabla^2 (\nabla \cdot \mathbf{v}_1) + \beta \eta \nabla^2 (\nabla \cdot \mathbf{v}_1) \\ &= c_0^2 \nabla^2 \rho_1 - (1 + \beta) \eta \nabla^2 (\nabla \cdot \mathbf{v}_1) \\ &= c_0^2 \left[1 + \frac{(1 + \beta) \eta}{\rho_0 c_0^2} \frac{\partial}{\partial t} \right] \nabla^2 \rho_1 \end{aligned} \quad (1.3.4.11)$$

Utilizando a aproximação linear da expansão da pressão expressada na (1.3.4.7), obtemos a equação (1.3.4.11) em termos da pressão:

$$\frac{\partial^2 p_1}{\partial t^2} = c_0^2 \left[1 + \frac{(1 + \beta) \eta}{\rho_0 c_0^2} \frac{\partial}{\partial t} \right] \nabla^2 p_1 \quad (1.3.4.12)$$

Os campos acústicos de pressão, densidade e velocidade, tem variação temporal harmônica com frequência angular definida por $\omega = 2\pi f$ (BRUSS, 2007), onde f é a frequência da onda acústica. Na microfluídica a velocidade do fluido é menor que 1000 mm/s, portanto, a velocidade do fluido é muito menor que a velocidade de propagação da onda mecânica no meio, justificando nossa aproximação apenas em primeira ordem (LANDAU; LIFSHITZ, 1991). Assim, podemos supor que as equações desses campos com dependência harmônica temporal são dadas por:

$$\rho_1(r, t) = \rho_1(r) e^{-i\omega t} \quad (1.3.4.13)$$

$$p_1(r, t) = c_0^2 \rho_1(r) e^{-i\omega t} \quad (1.3.4.14)$$

$$\mathbf{v}_1(r, t) = \mathbf{v}_1(r)e^{-i\omega t} \quad (1.3.4.15)$$

Substituindo (1.3.4.14) na (1.3.4.12), temos:

$$\nabla^2 p_1 = - \left[1 - \frac{i(1 + \beta)\eta\omega}{\rho_0 c_0^2} \right]^{-1} \frac{\omega^2}{c_0^2} p_1 \quad (1.3.4.16)$$

Então, podemos reescrever (1.3.4.16) como:

$$\nabla^2 p_1 = -k_i^2 p_1 \quad (1.3.4.17)$$

chamamos de k_i o número de onda acústica complexo:

$$k_i = \sqrt{\frac{1}{1 - 2i\zeta}} k_0 \quad (1.3.4.18)$$

tal que:

$$\zeta = \frac{(1 + \beta)\eta\omega}{2\rho_0 c_0^2} \quad (1.3.4.19)$$

Onde o número de onda $k_0 = \frac{\omega}{c_0}$ e o fator de amortecimento acústico viscoso por ζ .

Quando $\zeta \ll 1$, pequeno, os efeitos da viscosidade podem ser desconsiderados e podemos reescrever (1.3.4.18) como uma expansão de Maclaurin:

$$k_i = (1 + i\zeta)k_0 \quad (1.3.4.20)$$

Portanto, podemos reescrever (1.3.4.17) caracterizando como a Equação de Helmholtz Amortecida:

$$(\nabla^2 + k_i^2)p_1(r, t) = 0 \quad (1.3.4.21)$$

1.3.5. Força de radiação acústica

Quando aplicamos um campo ultrassônico em um fluido contendo partículas suspensas, o espalhamento das ondas acústicas produz uma transferência de momento da onda às partículas. Essas partículas serão afetadas pela então chamada força de radiação acústica (LAURELL, T. LENSCHOF, A., 2015). Em chips microfluídicos essa força permite o aprisionamento e transporte acústico de partículas, denominado como acustoforese. Considerando apenas a força resultante de ondas estacionárias formada a partir dos módulos de

ressonância da microcavidade (NETO et al., 2015), podemos reescrever a força de radiação acústica como gradiente de uma função potencial U no regime de Rayleigh:

$$F_{rad} = -\nabla U_{rad} \quad (1.3.5.1)$$

Considerando a função potencial U para um microcavidade cilíndrica, podemos escreve-la em termos do raio das partículas a , da densidade ρ e da compressibilidade adiabática β_0 (SILVA, G. BRUSS, H., 2014) chegando na equação de Gor'kov (GOR'KOV., 1962):

$$U_{rad} = 2\pi a^3 \left[f_0 \frac{|p_i^2|}{3\rho_0 c_0^2} - \frac{1}{2} f_1 \rho_0 |v_i^2| \right] \quad (1.3.5.2)$$

Onde f_0 corresponde ao fator de compressão e f_1 ao contraste de densidade entre o fluído e a partícula. Assim podemos determinar o potencial experimentado pela partícula imersa em um campo de radiação acústica, representando a força de radiação acústica em termos das médias temporais de p^2 e v^2 .

A força de radiação acústica em primeira ordem suspende as partículas na posição central da cavidade. Chamamos o plano em que elas são suspensas de plano de levitação. Quando duas ou mais partículas estão próximas no plano de levitação, surge uma força de radiação acústica secundária devido aos fenômenos de reespalhamento das ondas acústicas. A força de radiação acústica em segunda ordem faz com que as partículas se aglomerem diminuindo a distância entre elas.

Considere um par de partículas idênticas com distância d entre elas, aprisionadas pela força de radiação acústica. O espalhamento da onda incidente na partícula 1 junto ao espalhamento no fluído provoca uma força de interação na partícula 2. Vamos definir essa força de interação como sendo uma força conservativa cuja variação do momento é transversal a força de radiação acústica primária.

$$F_{int} = -\nabla_{\perp} U_{int} \quad (1.3.5.3)$$

Considerando a parte real “Re” do produto escalar entre a velocidade do fluído dentro da cavidade v_c e a velocidade da onda espalhada v_{sc} , podemos definir a função potencial de interação U_{int} (SANTOS et al., 2021):

$$U_{int} = -\pi a^3 f_1 \rho_0 \text{Re}[v_c^* \cdot v_{sc}] \quad (1.3.5.4)$$

No plano de levitação, a força de radiação acústica de interação atua como força central, ou seja, o potencial de interação depende das distâncias entre as partículas. Podemos estimar a

velocidade de espalhamento através das contribuições dos campos acústicos próximos na ordem do raio da microcavidade (PIERCE, 2019):

$$v_{sc} \sim \frac{a^3 f_1 |v_c|^2}{r^3} \quad (1.3.5.5)$$

Assim, podemos aproximar a força de radiação acústica secundária como:

$$F_{int} \sim \frac{\pi a^6 f_1 \rho_0 |v_c|^2}{d^4} \quad (1.3.5.6)$$

1.3.6. Fabricação e aplicações

Os primeiros trabalhos com pequenos volumes de fluídos iniciaram com os estudos de Golay e Van Deemter na qual utilizaram capilares de sílica com diâmetro na ordem de micrômetros para melhorar a performance da cromatografia. A indústria da microeletrônica impulsionou os estudos em escalas micrométricas com o processo de fotolitografia na confecção de microchips (MANZ, A. et al., 1992). No início da década de 90, o primeiro chip de Eletroforese Capilar (EC) foi criado para separação de moléculas ionizadas, possibilitando nos anos seguintes a análise de moléculas de DNA (TIAN, WC., FINEHOUT, E., 2008).

A microfabricação originou-se com as técnicas de litografia desenvolvidas em moldes de silicone. A evolução tecnológica impulsionou a diversificação dos materiais utilizados em sistemas microfluídicos, abrangendo agora polímeros, cerâmicas e metais. (RAJURKAR, K.; MADOU, M., 2007). Assim, surgiram aplicações em áreas tão diversas como diagnóstico médico, entrada de medicamentos, descoberta e análise de fármacos, química analítica, síntese combinatória, diagnóstico molecular e fabricação de produtos químicos especializados (DITTRICH, PS.; MANZ, A., 2006). Os materiais para confecção dos dispositivos mudaram para polímeros que têm custo menor, maior resolução e é menos perigoso na confecção de estruturas (BECKER, H.; LOCASCIO, L.E., 2002).

A separação de partículas é um fator importante para aplicações nas áreas de biotecnologia e farmacêutica, como na purificação de amostras biomoleculares e análise de células em ensaios clínicos (VITORINO, R. et al., 2021). Essa separação pode ser aplicada pelos métodos de centrifugação, cromatografia, filtração, floculação entre outros. A acustofluídica é a fusão da acústica com a microfluídica e veio da necessidade de uma poderosa

ferramenta para separar amostras biológicas diluídas em fluidos com misturas complexas em qualquer laboratório, com biocompatibilidade e livre contato com o substrato (SAVAGE et al., 2017).

Os dispositivos acustofluídicos integram o conceito LOC e pode ser visto como um subconjunto de micro sistemas que combinam tarefas de controle, fluxo, detecção e análise de amostras, ou seja, um laboratório que opera na escala micrométrica. Ao adicionarmos uma cavidade ressonante, possibilitamos o uso de transdutores na geração de um campo acústico, este formado por ondas estacionárias gera nós de pressão. O gradiente de pressão em torno de um ponto no fluido favorece a troca de momentos em curtos intervalos de tempo gerando uma força de radiação acústica.

A força de radiação acústica depende da frequência de ressonância do transdutor com o chip e da amplitude do sinal. Esses parâmetros devem ser cuidadosamente manipulados para não danificar as amostras dentro da cavidade. Essa força acústica possibilita o aprisionamento, levitação e a manipulação de partículas e células suspensas no líquido.

Ao aplicarmos uma corrente alternada oscilando em alta frequência em um material piezoelétrico, este vibra em alta intensidade produzindo ondas mecânicas na região do ultrassom. A onda acústica que depende da reflexão na cavidade ressonante é classificada como Ondas Acústicas de Massa (do inglês BAW), assim materiais como silicone e vidro são mais indicados na microfabricação dos dispositivos. Entretanto, quando as vibrações são propagadas paralelamente a superfície do material, definimos como Ondas Acústicas de Superfície (do inglês SAW).

Os dispositivos acustofluídicos permitem a separação de partículas de densidades e tamanhos diferentes (LI AND HUANG, 2018), podendo ser aplicados em diferentes situações como purificação de água contra bactérias, vírus e microplásticos (DOW et al., 2018; CHEN et al., 2020), transporte de lipídeos que colocam em risco o fluxo sanguíneo (DING et al., 2021) e isolamento de partículas virais (XIE et al., 2020; LOCATELLI, 2021). Assim, os chips acustofluídicos conseguem levar e aprisionar micropartículas de poliestireno em uma cavidade ressonante (SANTOS, H. D. A. et al., 2021) com grande potencial em aplicações de biópsias em microvolumes baseados em teste de sangue, sendo uma alternativa menos invasiva que a biópsia tradicional de tecidos.

1.4 Princípios e Fundamentos da Análise dos Componentes Principais

A análise dos componentes principais (do inglês PCA) é um método de análise multivariada de representação de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais, reduzindo a quantidade de dados e produzindo informações importantes para o reconhecimento de padrões.

Seja M uma matriz de dados $n \times p$ onde n representa o número de linhas e p representa as colunas. Podemos interpretar essa matriz como a configuração de dados observáveis n associado à sua variável p . Através da maximização da variância, minimiza-se a soma dos quadrados dos desvios de reconstrução, fornecendo uma matriz de projeção W em um novo espaço ao qual a representação é dada em componentes principais.

Vamos deslocar os dados da matriz M para origem, centralizando os dados em uma nova matriz D :

$$D = \begin{bmatrix} cX_1 & cY_1 \\ cX_2 & cY_2 \\ cX_3 & cY_3 \end{bmatrix} \quad (1.4.1)$$

Em seguida calcula-se a matriz de covariância baseada em D

$$var(cX) = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (cX_i - \overline{cX})^2 \quad (1.4.2)$$

$$var(cY) = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (cY_i - \overline{cY})^2 \quad (1.4.3)$$

Como resultado tem uma matriz de covariância de dimensão $n \times n$:

$$cov(cX, cY) = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (cX_i - \overline{cX}) \cdot (cY_i - \overline{cY}) \quad (1.4.4)$$

Os autovetores da matriz de covariância podem ser encontrados dado a matriz:

$$A = \begin{bmatrix} \text{var}cX & \text{cov} \\ \text{cov} & \text{var}cY \end{bmatrix} \quad (1.4.5)$$

Sendo I a matriz identidade, para que se obtenha vetores v não-nulos deve-se ter, pela equação característica:

$$\det|A - \lambda \cdot I| = 0 \quad (1.4.6)$$

ssim,

$$A \cdot v = \lambda \cdot v \quad (1.4.7)$$

Implica que:

$$v = \begin{bmatrix} vX & -vY \\ vY & vX \end{bmatrix} \quad (1.4.8)$$

Por fim rearranjamos os dados em uma matriz linearmente independente, fornecendo as componentes principais:

$$D \cdot v = \begin{bmatrix} PC1_1 & PC2_1 & \dots \\ PC1_2 & PC2_2 & \dots \\ \vdots & \vdots & \ddots \end{bmatrix} \quad (1.4.9)$$

A distribuição dos dados no plano pode ser representada pelas duas primeiras componentes principais que são perpendiculares e mostram a tendência dos dados. As componentes principais podem ser obtidas em qualquer matriz de dados seguindo o algoritmo: centraliza os dados, calcula a matriz de covariância, encontra seus autovalores e autovetores, por fim arranja os dados por Transformada de Hotelling (BRO, R.; SMILDE, K., 2014).

A base dos vetores gerados aponta na direção de maior variância e são combinações lineares da matriz de origem. As informações presentes na matriz são representadas em gráficos através de *scores e loadings*. Os *scores* fornecem a composição estrutural das principais

componentes em relação as observações das amostras e os *loadings* relacionam as componentes principais com as variáveis.

Dada a matriz de dados M formada por i linhas (amostras) e j colunas (variáveis), decompomos em uma matriz L formada por projeções das amostras em um novo espaço (*scores*) e uma matriz de pesos P (*loadings*), restando uma matriz de resíduos que explica alguns dados não correlacionados, tal que:

$$\mathbf{M} = \mathbf{LP}^T + \mathbf{E} = l_1 p_1^T + l_2 p_2^T + l_3 p_3^T + \dots + \mathbf{E} \quad (1.4.10)$$

Assim, podemos interpretar L como as projeções das amostras na direção dos componentes principais e P sendo os ângulos entre cada componente principal e cada variável (BROWN, S.D. et al., 2009). A PCA pode ser implementada por diversas plataformas computacionais ou linguagens de programação como Matlab, Scilab, linguagem R, Python, Java, C++ dentre outras, possibilitando a personalização dos algoritmos na geração de gráficos de tendência.

2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

2.1 Descrição do design e fabricação do dispositivo opto-acustofluídico 3D impresso

O dispositivo, foi idealizado pelo GAFM e é composto por uma entrada para o canal (*Inlet*) e uma saída (*Outlet*), ambas com raio de 1,0 mm que levam a uma microcavidade que funciona como biorreator: a propagação da onda gerada por transdutor cerâmico, o piezoelétrico (PZT), com diâmetro de 25 mm, reflete e cria uma onda estacionária e as partículas tendem a ser aprisionadas nos nós de pressão. Através de simulações pelo *Software Comsol Multiphysics* analisou-se a densidade de energia necessária para o aprisionamento das partículas através do método de elementos finitos e obteve-se os resultados numéricos que são estudados para avaliar a convergência das simulações, assim obtêm-se como produto o raio da cavidade próximo a 1,8 mm, a profundidade da cavidade de 250 μm e por fim calcula-se a ressonância para identificar a frequência que maximiza a densidade de energia.

O primeiro passo na microfabricação é a impressão das camadas a serem conectadas para formar o dispositivo opto-acustofluídico. Confeccionou-se duas secções do dispositivo em material de resina fotossensível na impressora 3D (Moonray D75, Sprintray, EUA), a parte superior com os *Inlets* levando a microcavidade e a parte inferior com espaço de alocação para o PZT. Após a confecção das peças, elas precisam ser higienizadas com álcool isopropílico e secas com papel toalha: em seguida levadas ao processo de cura, que consiste em aumentar o grau de dureza do material através de raios ultravioletas (UV) de tal modo que não resseque ao ponto de quebrar. Esse método auxilia na propagação de ondas acústicas no sistema.

Inicia-se a montagem do dispositivo, na primeira peça colocamos uma lamínula circular de vidro com espessura de 150 μm como tampa da cavidade acústica. Na base é colado o PZT preenchendo seus arredores com gel de ultrassom, junta-se as partes impressas e finaliza-se a confecção do dispositivo.

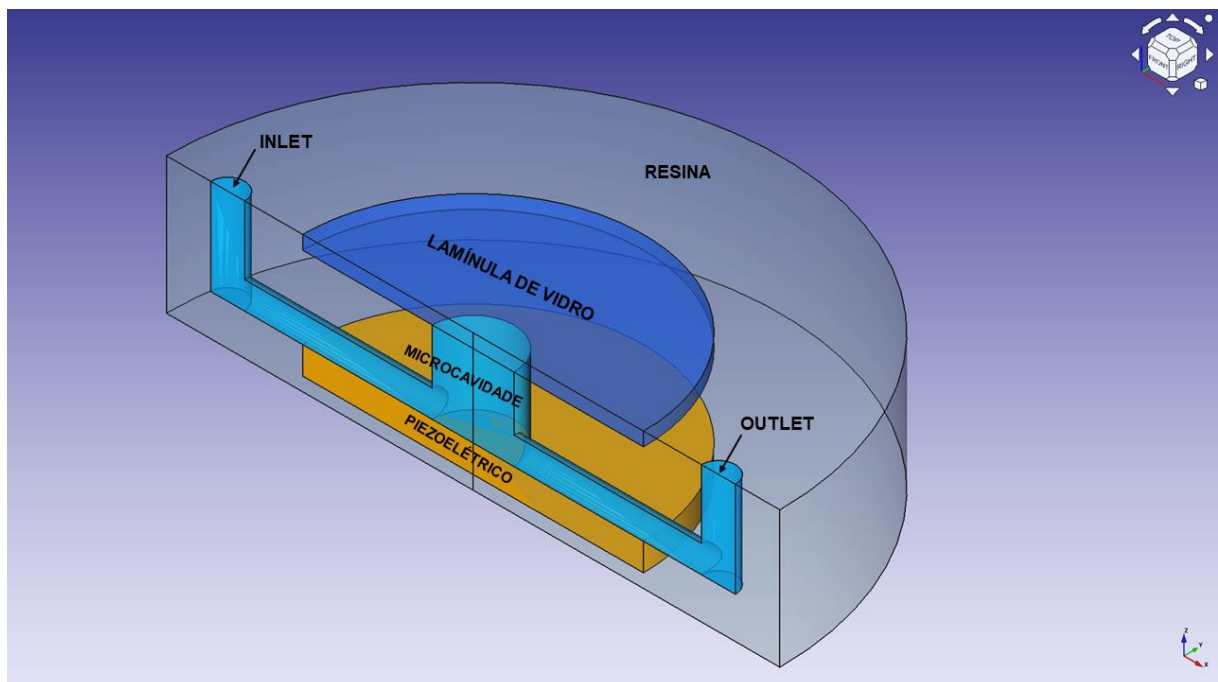
Os canais são novamente higienizados com uma seringa contendo 1mL de álcool etílico 70% e em seguida duas seringas de 1mL cada com água destilada, sendo assim realizado o teste de microfluídica dentro dos canais. Caso o layout impresso apresente resistência a esse teste, o dispositivo é higienizado novamente e levado ao microscópio para identificar os possíveis erros de manufatura que impedem o fluxo.

A microcavidade do dispositivo utilizado tem aproximadamente $2R = 3.6$ mm de diâmetro com altura $H = 250$ μm , sendo o aprisionamento em um plano preferencial próximo a

$h = 100 \mu\text{m}$. A condição para a distância de trabalho do sistema para obter o espectro Raman de um Ery levitado deve satisfazer a relação: $w \geq d + H - h = 300 \mu\text{m}$, onde $w = 600 \mu\text{m}$ é a distância de trabalho. A busca da frequência de ressonância do dispositivo é realizada com micropartículas de poliestireno ($10 \mu\text{m}$ ou $30 \mu\text{m}$) e através do gerador de funções varremos uma faixa de frequências próximas da simulada até encontrarmos a frequência de ressonância (3.13 MHz) com uma tensão de 5V , ou seja, a que fornece maior amplitude na tensão aplicada ao circuito e aprisionamento das partículas.

O dispositivo confeccionado no GAFm em parceria com a IntacLab tem simetria radial, baixo custo de matéria prima, operação simples e padronizada de funcionamento, tempo rápido de resposta e formação de aglomerados em sua cavidade e formação de estruturas estáveis à análise óptica.

Figura 2.1 - Representa de um corte seccional da geometria de distribuição dos materiais utilizados na confecção do dispositivo de acustofluídica. A figura detalha a entrada (*Inlet*) e saída (*Outlet*) do canal microfluídico conectados à uma microcavidade no centro do dispositivo.

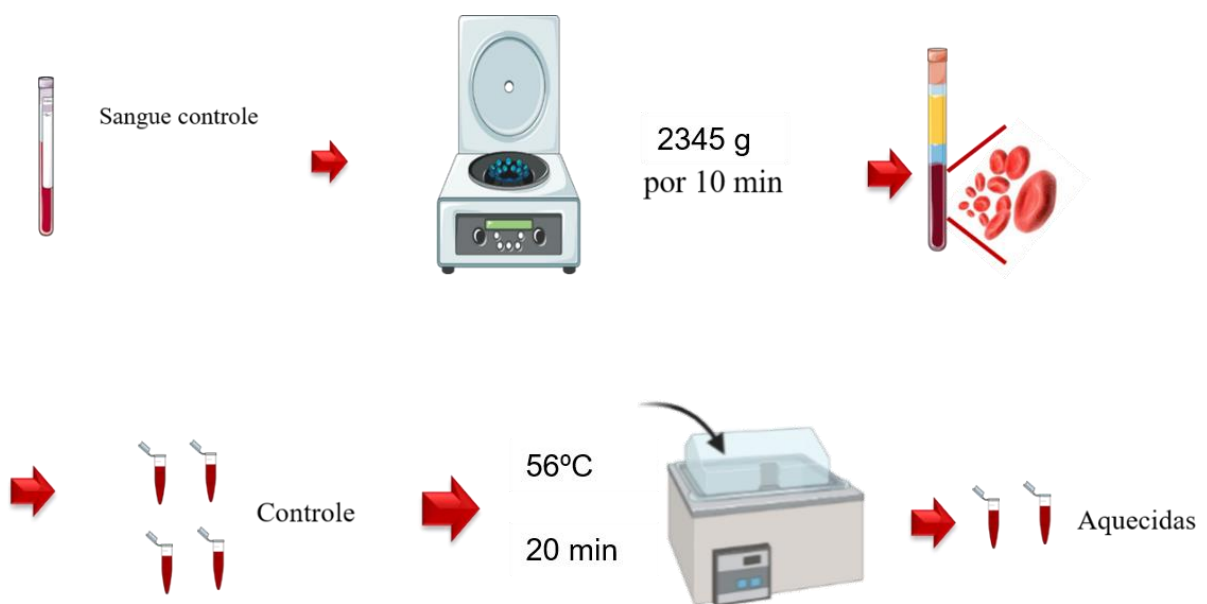


Fonte: Autor 2024.

2.2 Coleta e manipulação de Erys

Nos dois primeiros grupos a coleta de sangue foi realizada no Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (HUPAA). A coleta ocorreu através de punção venosa em tubos de vácuo com anticoagulante EDTA-K3 (ácido etilenodiamino tetra-acético), com concentração de $198 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para separação dos eritrócitos (Erys) do plasma, as amostras foram centrifugadas à 2345 g por 10 minutos, em temperatura ambiente, no Grupo de Nanofotônica e Imagem (GNFI) do Instituto de Física da UFAL. As amostras foram separadas em dois grupos: Controle e Pré-Aquecidas, no último realizou-se o procedimento de aquecimento por 20 min à $56 \text{ }^\circ\text{C}$, em banho térmico, seguindo o protocolo estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de inativação de vírus. Ambos os grupos foram purificados usando tampão fosfato (0,2M) e centrifugado três vezes a 14,654 g por 12 min a 4°C . O estudo foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL (CAEE 30732120.1.0000.5013). As células foram tratadas e separadas para análise em parceria com o Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da UFAL. Ambos os grupos foram submetidas à quantificação de proteína total pelo método de referência de Bradford.

Figura 2.2 - Processo de diferenciação dos grupos para análise no sistema de opto-acustoflúídica.



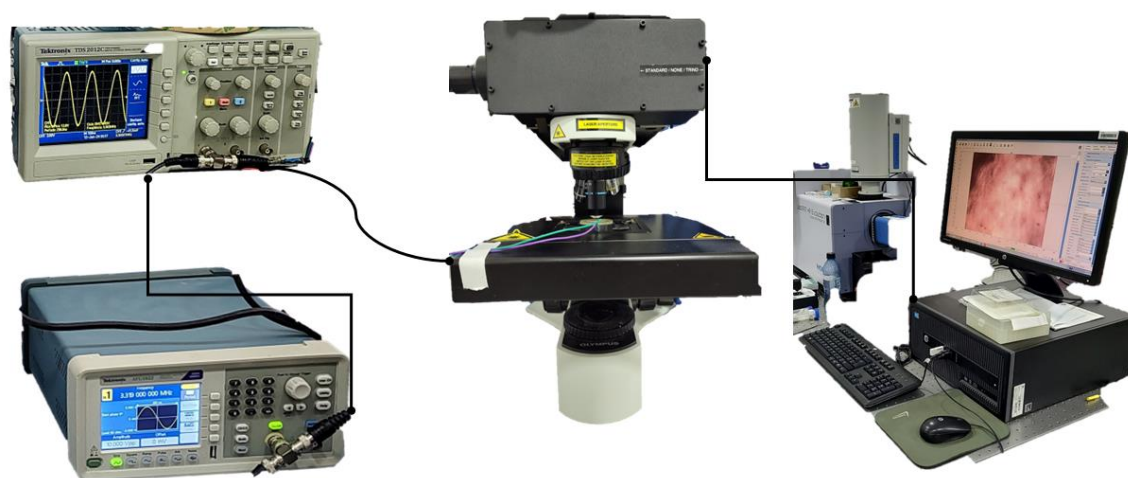
Fonte: Autor 2024.

2.3 Condições experimentais e aquisição de espectros

O sistema opto-acustofluídico é uma plataforma multifuncional produto do acoplamento de um dispositivo opto-acustofluídico ao microscópio confocal Raman. Na análise de partículas e células em microlitros o sistema consegue monitorar os parâmetros bioquímicos em tempo real e sem alterações espaciais na área focalizada.

Conectamos um gerador de funções (AFG1022, Tektronix, EUA) em paralelo ao osciloscópio (TDS 2012C, Tektronix, EUA) de 50 MHz e ao dispositivo opto-acustofluídico (GAFm, BR). O dispositivo é acoplado ao LabRam HR Evolution (Horiba, França) equipado com um detector Synapse e uma câmera CCD resfriada como mostrado na Figura 2.3. A microcavidade cilíndrica ressonante do dispositivo gera ondas estacionárias com maior amplitude e têm frequência de ressonância próxima à 3,13 MHz.

Figura 2.3 – Configuração experimental do dispositivo de opto-acustofluídica para ensaios de espectroscopia Raman em Erys.

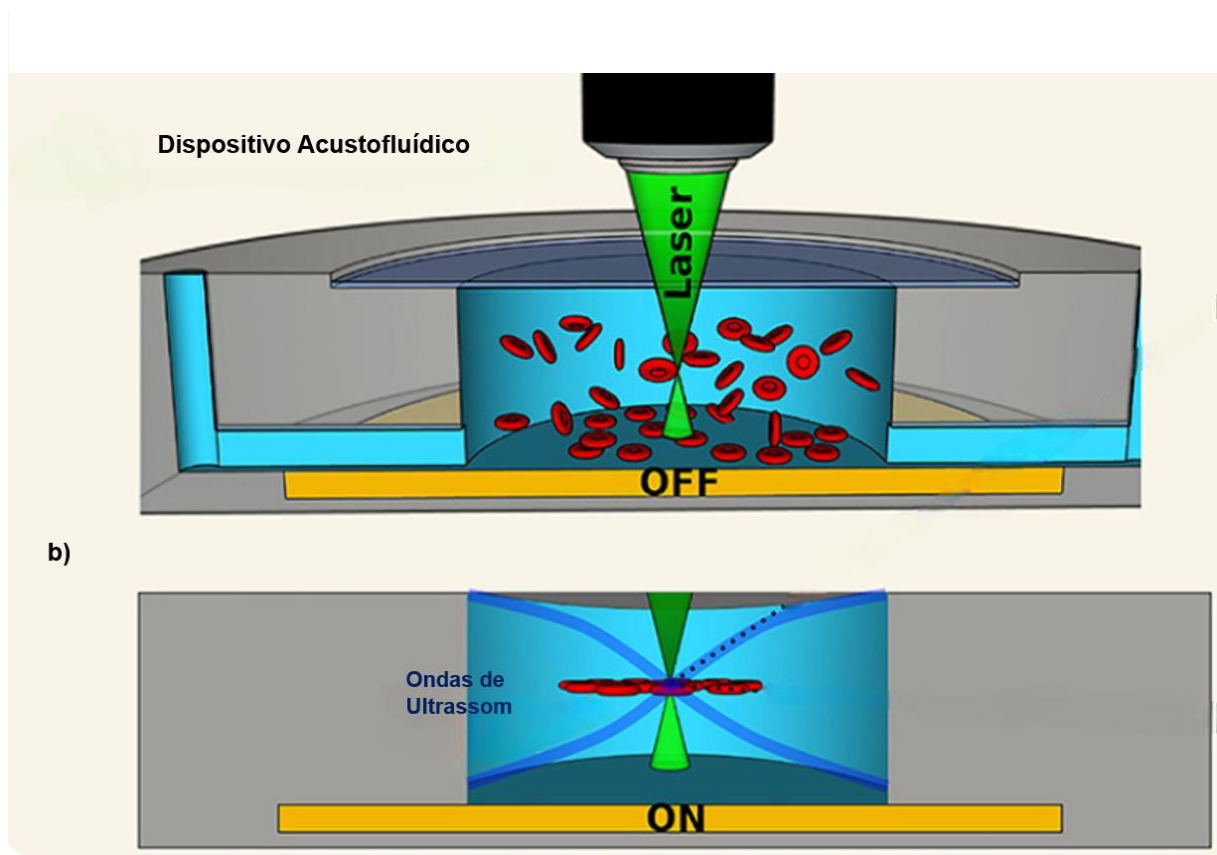


Fonte: Autor 2024.

O sistema foi ligado com uma amplitude de 5V pico-a-pico e em um dos *Inlets* do dispositivo foi pipetado 50 μL da amostra com as células vermelhas com uma concentração de 200 células/ μL , o fluxo laminar foi perdendo velocidade devido à força de radiação acústica próxima ao centro da cavidade, em seguida as células começaram a ser arrastadas, levitadas e

aprisionadas próximo ao centro da cavidade. O plano de aprisionamento e levitação das células é em torno de 100 μm no eixo Z em relação ao fundo do dispositivo. Quando altera-se a frequência na terceira casa decimal o aglomerado formado desloca-se apenas no plano XY como mostrado na Figura 2.4.

Figura 2.4– (a) Ilustração do dispositivo acustofluídico desligado, com uma concentração de Erys em sua microcavidade. (b) Quando o dispositivo é ligado, o PZT gera ondas ultrassons que são refletidas na lamínula e aprisionam as células em um plano preferencial de levitação.

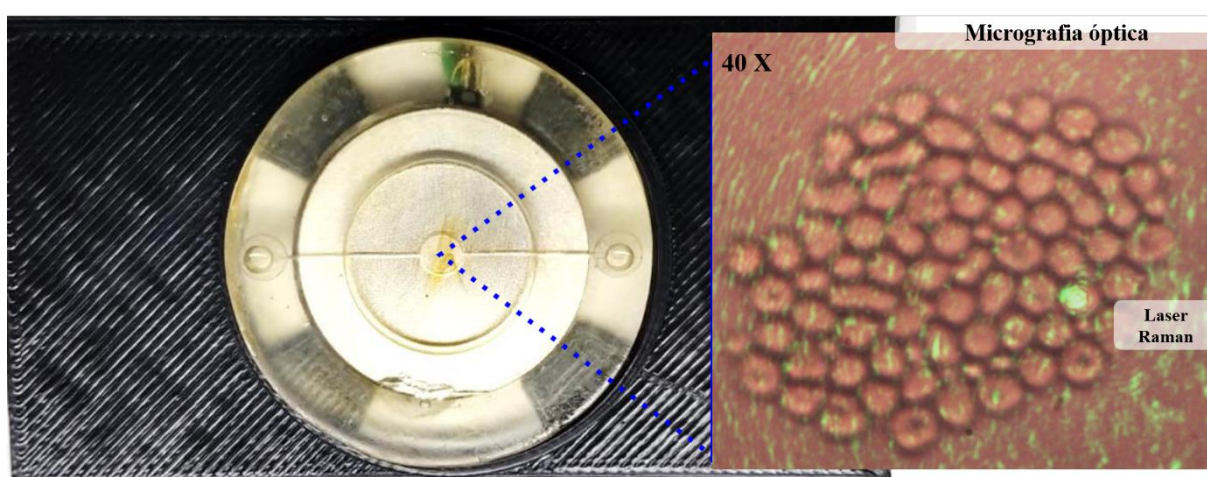


Fonte: Adaptada de Scilight 2023, 291111 (2023). <https://doi.org/10.1063/10.0020296>.

Com o sistema ligado, podemos adquirir os espectros Raman dentro do biorreator do dispositivo. As medidas são feitas de duas formas: (a) pontuais, focalizando o laser de diodo de 532 nm na região nuclear das células através de uma lente objetiva de 40X (Olympus Corp., Japão ou 60X). A mesma lente objetiva é usada para coletar a luz espalhada Raman após a interação com a amostra, em uma geometria de retroespalhamento; (b) espaciais, a caracterização é feita por meio de um mapeamento em 2D, usando as mesmas condições do item anterior, para avaliar toda estrutura da célula. A calibração da frequência é definida tendo como referência a banda vibracional de 520 cm^{-1} de uma amostra padrão de silício.

O sistema deve ficar isolado de radiações eletromagnéticas externas, com paredes preferencialmente opacas e refletivas. O laser Raman foi focalizado com a objetiva 40X, com abertura numérica $NA = 0.65$, 0.1% da potência total de 250mW, ou seja, 0,25mW em uma região com diâmetro de $2\mu\text{m}$ no plano XY. Nas mesmas condições, os espectros das células são medidos na temperatura de 22°C , com Hole de 300, tempo de aquisição de 14s e acumulação de 10 totalizando um tempo total de aproximadamente 120 s na faixa espectral de 300 à 1800 cm^{-1} . O sinal foi disperso por uma grade de difração com 300 ranhuras/mm e cada espectro tirado foi na região de uma única célula aprisionada em aglomerados no plano nodal do dispositivo sem a influência do substrato.

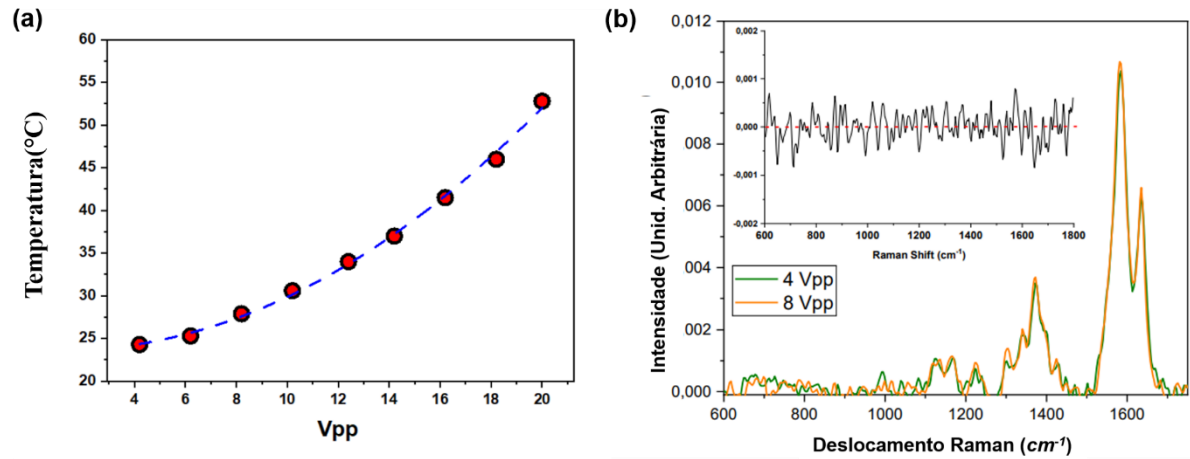
Figura 2.5 – Figura do dispositivo acustoflúídico atuando, com micrografia óptica de uma objetiva de 40X dentro da microcavidade com Erys, onde podemos visualizar o foco do laser Raman em uma única célula.



Fonte: Autor 2024.

Na Figura 2.6(a) podemos visualizar a alteração na temperatura dentro da microcavidade com o aumento da tensão aplicada e definir a melhor diferença de potencial para o ensaio celular. Aferimos a temperatura por câmera térmica Flir E40 (Teledyne, Inc. USA) com a microcavidade aberta. Na Figura 2.6 (b), conseguimos averiguar o comportamento dos espectros Raman com a diminuição da tensão aplicada no dispositivo onde mostramos a queda de tensão de 8 para 4Vpp. Quando diminuimos a diferença de potencial aplicada pico-a-pico podemos determinar o potencial mínimo necessário para que o agregado se mantenha no plano de aprisionamento, na inserção visualizamos que o espectro Raman não sofre alteração substancial devido ao incremento de potência no piezoelétrico do dispositivo.

Figura 2.6 - (a) Variação da temperatura dentro da cavidade em função da tensão pico-a-pico aplicada (b) Espectros Raman normalizados de uma mesma Ery em um mesmo plano de aprisionamento para diferentes tensões pico-a-pico (4 e 8Vpp), a inserção mostra a diferença entre os espectros.



Fonte: Adaptada de Rocha et al, material suplementar, 2023.

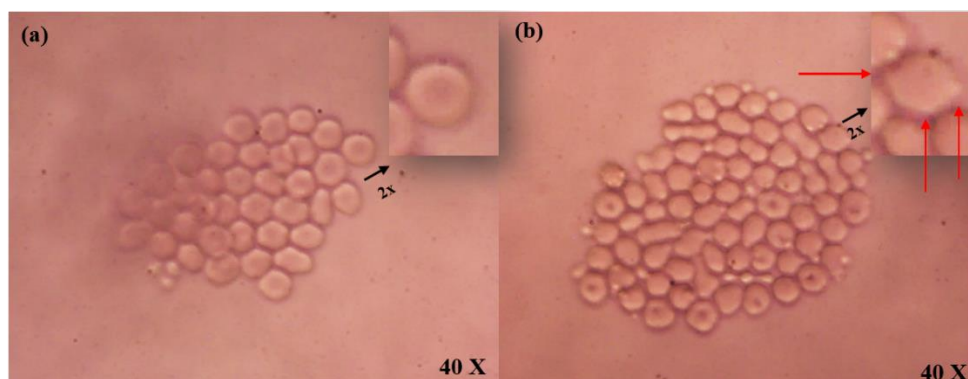
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Análise da formação de agregados de Erys dentro do dispositivo opto-acustofluídico

A amostra com Erys é inserida em pequenos volumes em um dos *inlets* do dispositivo: as células vermelhas passam pelo canal devido à pressão aplicada e também ao efeito de capilaridade em direção ao *outlet* no layout do dispositivo. No centro do dispositivo, a microcavidade ressonante funciona como biorreator, onde as forças de radiação acústica de primeira ordem surgem devido à mudança de momento linear no fluxo das células. Sendo o diâmetro das células muito menor que o comprimento de onda acústico, a força de radiação acústica é um gradiente da energia potencial dentro da cavidade tendendo levar as Erys para uma região de menor potencial próxima ao centro da cavidade.

Nos momentos iniciais as células sofrem uma desaceleração em seu fluxo para mudar sua direção no sentido da região de aprisionamento. No processo de formação do agregado de Erys, a força de radiação acústica de segunda ordem, devido a interação célula-célula, provoca um reespalhamento da onda propagada no biorreator, assim forma-se uma rede de estrutura plana e estável devido a força de radiação acústica de segunda ordem. A mudança do momento angular realiza um torque de forma que a Ery de formato bicôncavo e plano fique com sua superfície paralela a lamínula do dispositivo. Essa configuração minimiza a energia potencial no plano nodal facilitando a aquisição de espectros por horas.

Figura 3.1 –Micrografia digital de Erys agregados em tempo real para análise microscópica confocal Raman. (a) Agregado de células controle na microcavidade do dispositivo opto-acustofluídico. A seta preta indica o uma ampliação de 2x na imagem. (b) Agregado das células aquecidas. A seta vermelha indica as regiões de alterações na morfologia que pode ser visualizada pela imagem digital e suas alterações bioquímicas através da espectroscopia Raman.



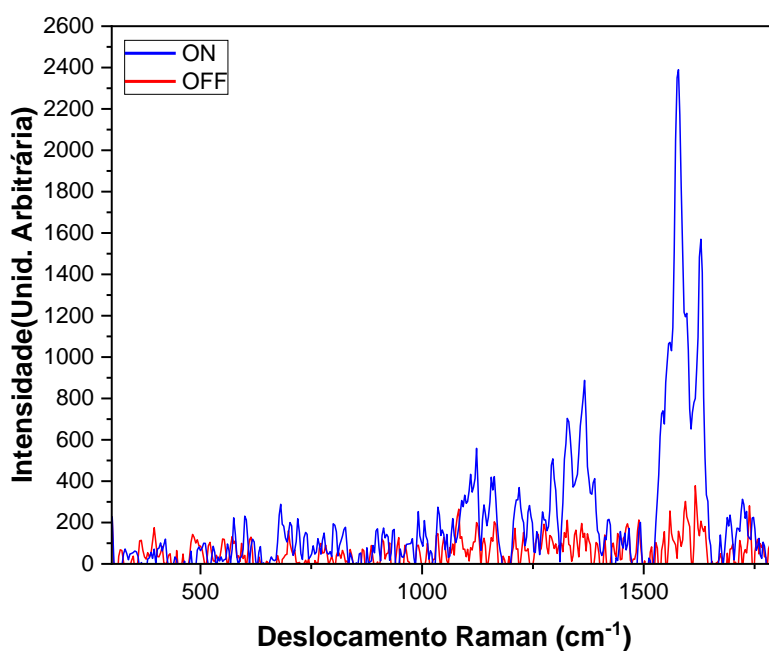
Fonte: Autor 2024.

Na Figura 3.1(a) podemos visualizar que as células ficam justapostas na região do plano nodal. Percebe-se também que a força de radiação acústica aplicada não estimula o rompimento celular, mantendo as células vivas para análise em tempo real. Conseguimos visualizar algumas alterações morfológicas entre os grupos. Na Figura 3.1 (b) as células aquecidas apresentam pequenas deformações em sua membrana plasmática, formando algumas espículas.

3.2 Demonstração da aquisição bem-sucedida de espectros Raman de Erys saudáveis e aquecidas

Após a formação do aglomerado, posicionamos cuidadosamente o feixe de laser utilizando uma objetiva de 40x na Ery localizada próxima ao centro do aglomerado. Ajustamos a potência para 0.25W antes de capturar os espectros de cada célula, com cada novo espectro atrelado a posição de outra Ery próxima. Os espectros Raman obtidos podem ser afetados pela emissão de fluorescência do material quando exposto à luz laser. Para mitigar esse efeito, aplicamos a técnica de baseline, criando uma função polinomial com 32 pontos de intersecção que nos permite subtrair a contribuição da fluorescência dos dados brutos. A Figura 3.2 mostra espectros Raman de uma Ery no plano de aprisionamento com o dispositivo ligado e desligado.

Figura 3.2 – Comparação entre os espectros Raman adquiridos no plano de levitação com o dispositivo ligado (ON) e com o dispositivo desligado (OFF).

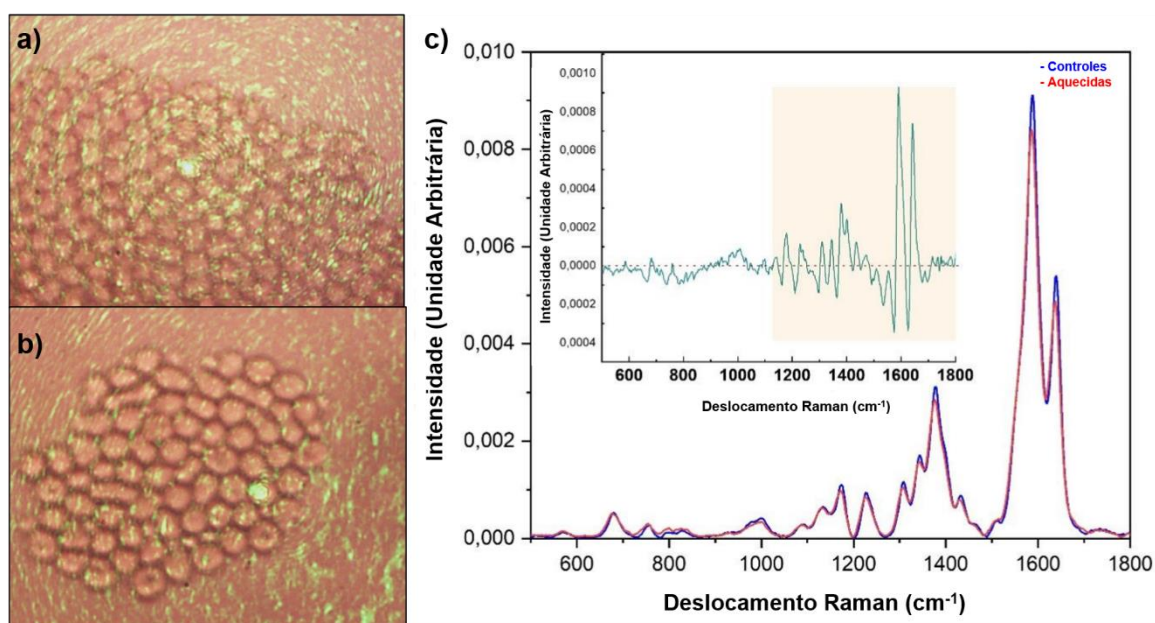


Fonte: Autor 2024.

Os pontos de intersecção selecionados foram os pontos de mínimo, ou seja, em regiões cuja derivada de primeira ordem é nula e com a concavidade da curva voltada para cima, preservando assim a integridade do espectro Raman. Em seguida para padronizarmos os espectros obtidos, eles são normalizados pela área, mantendo as características do espectro Raman e com dimensionamento escalar ideal para análises.

A Figura 3.3 mostra o aprisionamento e levitação de Erys agregadas dentro da cavidade acustofluídica, possibilitando a tomada de espectros Raman focalizados em uma única célula. Na Figura 3.3 (c) podemos visualizar os espectros Raman médio de cada grupo, onde cada espectro Raman médio representa uma média aritmética de 15 espectros Raman.

Figura 3.3 – (a) Aquisição do espectro Raman com ponto laser focalizado em uma única Ery controle, (b) Aquisição do espectro Raman com ponto laser focalizado em uma única Ery aquecida, (c) Espectros Raman médios normalizados dos grupos controle e aquecidas, a inserção mostra a diferença entre os espectros.



Fonte: Autor 2024.

3.3 Análise estatística: Aplicação da análise de componentes principais (PCA) para identificação de grupos de Erys

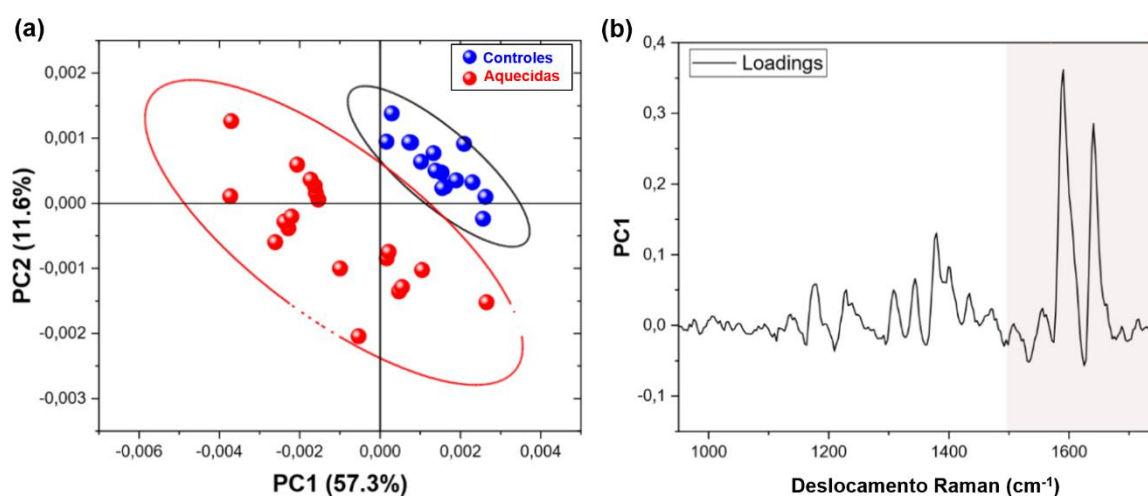
Como demonstrado na Figura 3.3, os espectros Raman adquiridos contêm assinaturas moleculares, bioquímicas e estruturais importantes para análises. Contudo apenas a inspeção

visual não demonstra um parecer qualitativo de diagnóstico, assim podemos aplicar o método de análise multivariada PCA em uma matriz de dados formada por 513 linhas e 30 colunas, sendo cada coluna representando um espectro de uma Ery.

O algoritmo retorna os valores das principais componentes que formam planos com determinado percentual de informação sobre os dados. Assim, com as duas primeiras principais componentes (PC1 e PC2) podemos criar um gráfico que represente a localização de cada indivíduo em relação ao novo plano formado. A PC1 representa 57.3% dos indivíduos no eixo das abscissas, já a PC2 contribui 11.6% no eixo das ordenadas, totalizando 68.9% da representação nas novas coordenadas. Podemos observar na Figura 3.4 a distinção entre os pontos azuis (Erys controle) dos pontos vermelhos (Erys aquecidas) com uma elipse de confiança de 95%.

Ao relacionarmos a coluna da PC1 as linhas dos dados de entradas, podemos encontrar o perfil dos *Loadings* mostrado na Figura 3.4 (b) que são utilizados para identificar características significativas no espectro Raman. As variações positivas e negativas das bandas no espectro estão correlacionadas a variações na composição molecular representadas pelas regiões vibracionais moleculares. *Loading* positivo indica uma região que contribui fortemente para diferenciação entre os grupos.

Figura 3.4 - (a) Os gráficos de PCA mostram a discriminação de dados com base em células de controle (pontos azuis) e células tratadas termicamente (pontos vermelhos). A variação percentual capturada por cada PC é mostrada entre parênteses ao longo de cada eixo. (b) *Loadings* do gráfico PC1 para os grupos controle e aquecidas.

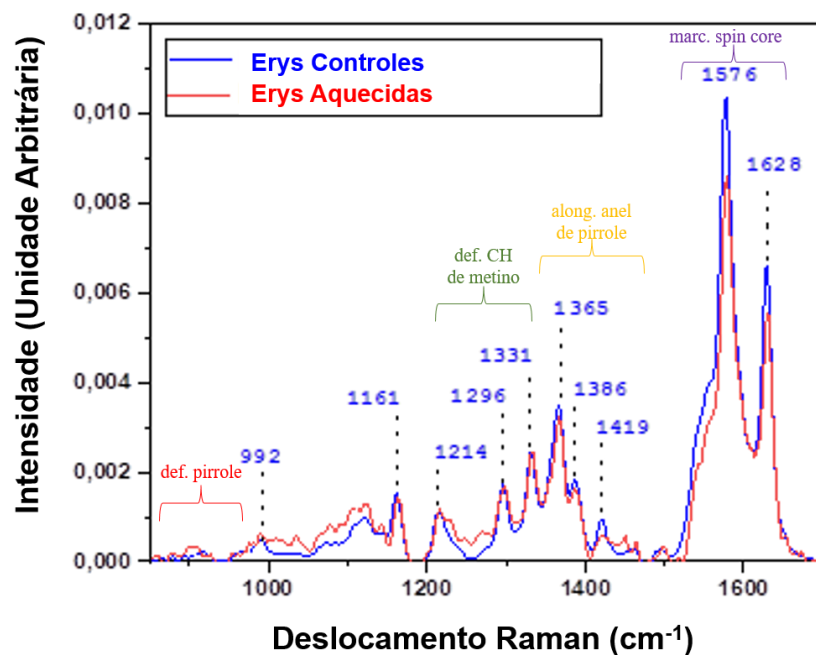


Fonte: Adaptada de Rocha et al, material suplementar, 2023.

3.4 Interpretação dos resultados à luz dos objetivos da pesquisa e da revisão da literatura

Para analisar flutuações no espectro Raman, é possível usar algumas bandas para estimar a quantidade relativa de oxiemoglobina. Além disso, para avaliar a capacidade relativa da hemoglobina total de ligar oxigênio e mudanças conformacionais em anéis de pirrol como mostrado na Figura 3.5 e de acordo com a Tabela 1.

Figura 3.5 – Espectros Raman médios dos grupos de Erys controles e aquecidas com as marcações referentes as regiões: i) a região de baixo número de onda (600-1.200 cm^{-1}); (ii) a região de deformação C-H da metina (1.300-1.200 cm^{-1}); (iii) a região de estiramento do anel pirrol (1.300-1.400 cm^{-1}); (iv) a região da banda do marcador do spin core (1.500-1.650 cm^{-1}).



Fonte: Autor 2024.

Tabela 1 - Posição da banda, atribuição e coordenada local para Erys controle e aquecidas, obtidos usando uma excitação Raman de 532 nm. A identificação dos modos vibracionais está de acordo com a referência Rusciano e De Luca em 2008.

Posição de Banda Erys Controle	Posição de Banda Erys Aquecidas	Coordenada Local
992 cm ⁻¹	992 cm ⁻¹	v(CβC1) asym
1172 cm ⁻¹	1172 cm ⁻¹	v(pyrhal f-ring) asym
1226 cm ⁻¹	1225 cm ⁻¹	δ(CmH)
1307 cm ⁻¹	1306 cm ⁻¹	δ(CmH)
1343 cm ⁻¹	1341 cm ⁻¹	v(pyrhal f-ring) sym
1378 cm ⁻¹	1376 cm ⁻¹	v(pyrhal f-ring) sym
1399 cm ⁻¹	1398 cm ⁻¹	v(pyrquarter-ring)
1434 cm ⁻¹	1430 cm ⁻¹	v(CαCm) asym
1588 cm ⁻¹	1586 cm ⁻¹	v(CαCm) asym
1639 cm ⁻¹	1637 cm ⁻¹	v(CαCm) asym

Fonte: Autor, 2024

Os picos Raman do Erys detectados entre 1500 e 1700 cm⁻¹ são significativamente influenciados pelo estado de spin do ferro ou, de forma semelhante, através do estado de oxigenação da célula investigada. Nossos resultados mostram dois picos proeminentes por volta de 1588 e 1639 cm⁻¹. Como pode ser observado na Fig. 3.3 para Erys aquecidas, a intensidade relativa das bandas Raman diminui, e uma mudança para o azul na posição espectral é observada quando em comparação com a resposta Raman da Erys controle. Os picos próximos a banda de 1585 cm⁻¹ estão associados a uma maior concentração de Hb. As bandas de 747 à 1130 cm⁻¹ são definidas como uma região com maior concentração de lipídios e de 1130 à 1690 cm⁻¹ como uma região relacionada as proteínas (LENZI, E., et al., 2021).

Utilizando (1.2.6), podemos quantificar a razão entre as intensidades das bandas Raman em 1588 e 1553 cm⁻¹, que estão relacionadas aos ligantes da hemoglobina. Essa razão permite

analisar a capacidade de ligação ao oxigênio das hemácias controle e aquecidas. (SLATINSKAYA, O. LUNEVA, L. DEEV, et al., 2021):

$$r_{controle} = \frac{I_{1588}}{I_{1553}} = 3.20 \pm 0.02 \quad (3.4.1)$$

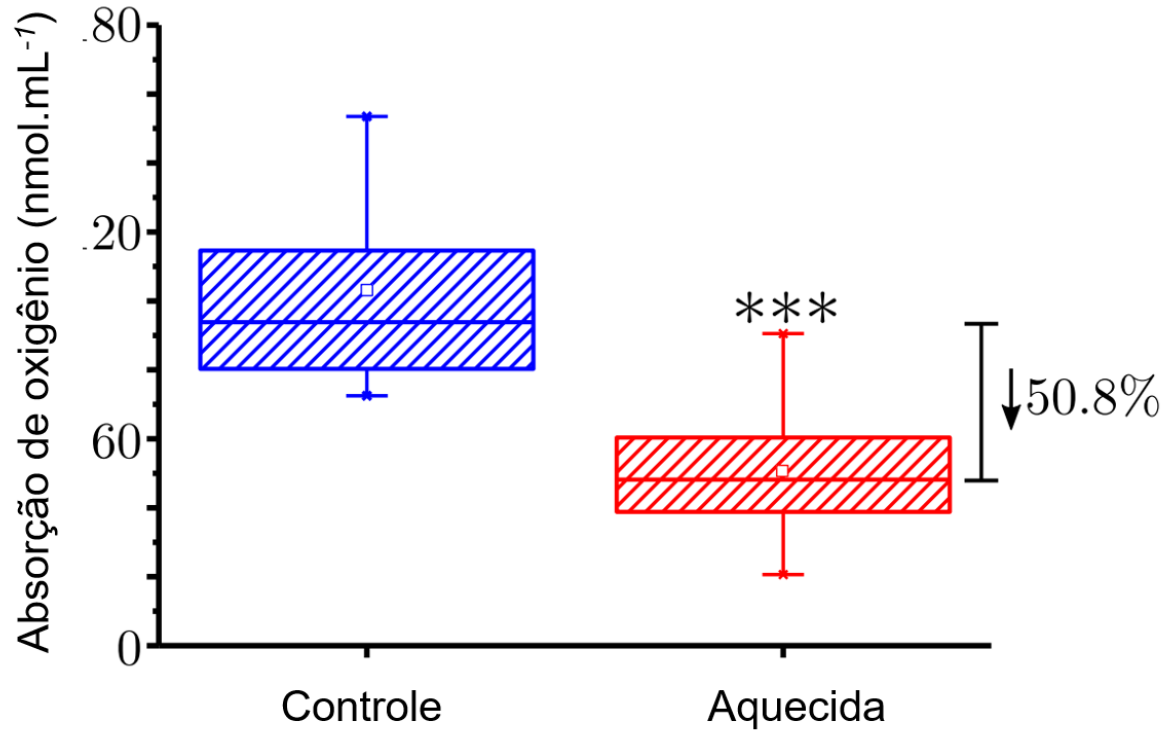
$$r_{aquecidas} = \frac{I_{1588}}{I_{1553}} = 2.83 \pm 0.01 \quad (3.4.2)$$

Portanto, a razão entre os grupos das aquecidas e o grupo controle sugere uma perda de oxigenação entre as células de:

$$\frac{r_{aquecidas}}{r_{controle}} \cong 0.88$$

O tempo de aquisição dos espectros não superou dois minutos, o que minimiza um potencial efeito de fotodano às Erys. As mudanças biomoleculares apresentadas evidenciaram uma queda da manutenção da principal função da hemoglobina no transporte de oxigênio. Essas alterações são ratificadas pela Figura 3.6 que mostra a queda da absorção de oxigênio em 50.8% das Erys aquecidas em relação ao grupo controle.

Figura 3.6 – Absorção de oxigênio de cada população de Erys.



Fonte: Adaptada de Rocha et al, material suplementar, 2023.

3.5 Análise do comportamento mecânico dos eritrócitos

O comportamento das Erys dentro da microcavidade é devido a interação com as ondas acústicas. Essa interação pode ser explicada devido a composição multicamada do dispositivo. Considere a impedância acústica específica da resina de impressão 3D, água e vidro à temperatura ambiente sendo respectivamente: $Z_r = 2,9 \text{ MPa s m}^{-1}$, $Z_{\text{agua}} = 1,49 \text{ MPa s m}^{-1}$, $Z_{\text{vidro}} = 13,4 \text{ MPa s m}^{-1}$. A razão das impedâncias acústicas são dadas por:

$$\frac{Z_r}{Z_{\text{agua}}} = 1,94 \quad e \quad \frac{Z_{\text{vidro}}}{Z_{\text{agua}}} = 8,98 \quad (3.5.1)$$

Vamos supor que o dispositivo opto-acustofluídico pode ser tratado como um ressonador acústico de uma dimensão (1D), com paredes infinitamente duras na parte superior e inferior (SANTOS, H.D.A. et al., 2021). Considere uma onda plana na direção axial descrita por modos normais através da amplitude de pressão que é uma solução para (1.3.4.21):

$$p = p_0 \cos\left(\frac{\pi z}{H}\right) \quad (3.5.2)$$

Onde p_0 é a amplitude de pressão. A pressão p é descrita em relação a um sistema cartesiano definido no centro da superfície inferior da microcavidade.

A força de radiação acústica devido a onda de pressão na direção e_z é dada por:

$$F_{rad} = \phi A_p E_0 \sin\left(\frac{\pi z}{H}\right) e_z \quad (3.5.3)$$

Onde ϕ é o fator acustoforético, A_p é a área transversal do Ery e $E_0 = \frac{p_0^2}{4\rho_0 c_0^2}$ é a densidade de energia acústica. Essa força gera um torque de radiação acústica τ_{rad} na Ery representado por vetores na direção e_x e e_z :

$$\tau_{rad} = \gamma V_p E_0 \sin^2\left(\frac{\pi z}{H}\right) \sin 2\beta (\cos \alpha e_y - \sin \alpha e_x) \quad (3.5.4)$$

Onde γ é o fator giroacústico, V_p é o volume do Ery. Considere: $A_p = 192,6 \mu\text{m}^2$ e $V_p = 94 \mu\text{m}^3$, $\phi = 0.0061$ e $\gamma = -0.0020$ em 3.3 Mhz na solução aquosa (LIMA, E. B. e SILVA, G. T., 2021). Devido $\gamma < 0$ e $\phi > 0$ o Ery será aprisionado e levantado no nó de pressão em $z = H/2$ e também será alinhado paralelamente ao plano, $\beta = 0$. Note que o torque de radiação é máximo no nó de pressão enquanto a força é maior em $Z = H/4$. Ambos os fenômenos aumentam linearmente com o aumento da densidade de energia acústica na microcavidade.

Os efeitos viscosos na força de radiação atuando sobre uma partícula esférica de raio desprezível quando $\frac{\delta}{a} \ll 1$, onde δ é a profundidade da camada limite viscosa. Entretanto, os Erys são próximos à discos bicôncavos. Assim podemos modelá-los como esferoides oblato: $\frac{\delta}{a} = 0.2$, a força devido a microtransmissão perto da superfície do Ery domina sobre contribuições invíscidas. Em nossa configuração experimental $\frac{\delta}{a} \cong 10^{-4}$, o que necessita de investigações adicionais para avaliar o impacto dos efeitos viscosos na força de radiação sobre os Erys.

Podemos obter a rigidez relacionada à força de radiação e ao torque, respectivamente, como:

$$k_F = -\left. \frac{\partial F_{rad}}{\partial z} \right|_{z=\frac{H}{2}} = \frac{2\pi}{H} \phi A_p E_0 \quad (3.5.5)$$

$$k_\tau = -\left. \frac{\partial \tau_{rad}}{\partial z} \right|_{\beta=0} = 2\gamma V_p E_0 \quad (3.5.6)$$

Para baixas energias ($<5V$), a densidade de energia dentro da microcavidade é em torno de $E_0 = 1 J \cdot m^{-3}$. Assim, a rigidez devido ao aprisionamento é $k_F = 0,0295 pN\mu m^{-1}$ e $k_\tau = 0,376 pN\mu m$.

O agregado de células formado no plano de pressão nodal é devido a força de interação acústica. Considerando a geometria dos Erys podemos aproximar:

$$F_{int} \approx \frac{9V_p^2(\rho_p - \rho_0)E_0}{2\pi^2(2\rho_p + \rho_0)d^4} \quad (3.5.7)$$

Onde $\rho_0 = 1005 kg \cdot m^{-3}$ e $\rho_p = 1100 kg \cdot m^{-3}$ são a densidade do meio (PBS) e do Ery e $d = 7,82 \mu m$ é a distância mínima entre células. O valor máximo da força de interação $F_{int} = 0,0319 pN$. Por outro lado, na vizinhança do plano nodal de pressão, $z = H/2 \pm 1\mu m$, a força de radiação acústica $F_{rad} = \mp k_F \cdot z = \mp 0.0295 pN$ (SILVA, G.T. e BRUSS, H., 2014).

No plano de aprisionamento, a deformação ϵ induzida na membrana de Ery pelo estresse de radiação acústica é quase estática. Pode ser estimada pela razão entre o estresse (σ) e o módulo de Young(E).

$$\varepsilon = \frac{\sigma}{E} \quad (3.5.8)$$

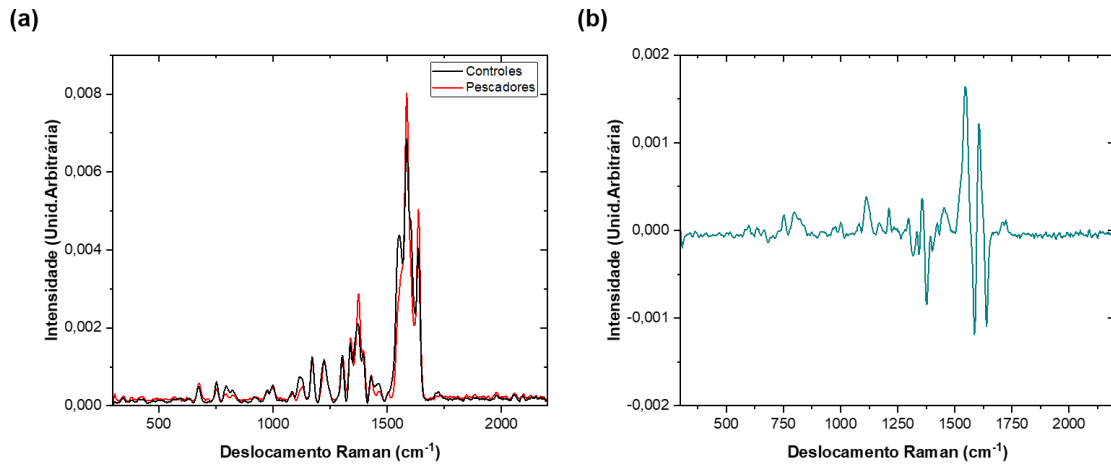
Considerando o valor do módulo de Young do Ery como $E = 679\text{Pa}$ e $\sigma = \frac{|F_{rad}|}{A_p E}$ (43), nós encontramos $\varepsilon = 2,25 \times 10^{-7}$. A deformação correspondente é dada pela relação: $\Delta r = r_0 \varepsilon$, onde r_0 é a distância radial não formada da superfície do Ery até o seu centro geométrico. Portanto, a deformação na configuração acustofluídica é mínima quando comparada com r_0 . Essa deformação considerou o eritrócito como uma fina casca esférica (SILVA, G.T. et al., 2019). Ao considerar uma membrana bicôncava hiperelástica preenchida com citoplasma, as simulações numéricas mostraram que os glóbulos vermelhos se transformam em um formato de disco oblato quando a pressão incidente é maior que 1MPa na água. Isso corresponde a uma densidade de energia acústica ($\sim 110 \text{ J.m}^{-3}$) muito acima daquela gerada pelo piezoelétrico no dispositivo (LIU, Y. e XIN, F., 2023).

3.6 Validação: Pescadores do Complexo Lagunar Mundaú-Manguaba

A contaminação ambiental por metais pesados na população ao redor do complexo lagunar Mundaú-Manguaba (CLMM) leva à redução da captação de O_2 pelos eritrócitos, alterações na estrutura nativa da hemoglobina e causa estresse oxidativo nas células sanguíneas dos pescadores. Neste segundo momento foi realizada a coleta do sangue de pescadores que atuam no entorno do complexo Mundaú-Manguaba nos bairros do Vergel, Pontal da Barra e Bebedouro, em Maceió. O sangue foi coletado de 120 voluntários (Certificado de Apreciação Ética, CAAE 57998116800005013) da mesma forma que o estudo anterior. A coleta ocorreu através de punção venosa em tubos de vácuo com anticoagulante EDTA-K3 (ácido etilenodiamino tetra-acético), com concentração de $198 \mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras foram separadas em dois grupos: Controle e Pescadores. Para separação dos eritrócitos (Erys) do plasma, as amostras foram centrifugadas à 2345 g por 10 minutos, em temperatura ambiente, no GNFI do Instituto de Física da UFAL. Ambos os grupos foram purificados usando tampão fosfato (0,2M) e centrifugado três vezes a $14,654 \text{ g}$ por 12 min a 4°C .

As amostras foram pipetas no dispositivo acustofluídico acoplado ao LabRam Horiba, adquirimos os espectros Raman do total de 10 indivíduos separados em grupo Controle e grupo Pescadores, com uma média de 8 espectros Raman de cada célula. Aplicamos o PCA em uma tabela de dados de 580 linhas por 83 colunas, com cada coluna um espectro Raman tomado com 10 s de aquisição e 15 acumulações no intervalo espectral de 300 à 2200 cm^{-1} . A Fig. 3.7 (a) mostra o espectro médio do grupo controle (em preto) e o espectro médio do grupo pescadores (em vermelho): as curvas foram suavizadas pelo filtro de Savitzky-Golay, com 5 pontos em um polinômio de segunda ordem. Em (b) onde podemos visualizar diferenças espectrais que podem ser potencializadas pelo PCA.

Figure 3.7 – (a) Espectros Raman médios normalizados dos grupos controles e pescadores, (b) diferença entre os espectros Raman médios dos grupos controles e pescadores.



Fonte: Autor 2024.

Na Figura 3.8 (a) podemos observar a capacidade clínica do método apresentado com uma elipse de confiança de 95% separando os espectros em regiões no plano XY das principais componentes. A PC1 representa 57.17% dos indivíduos no eixo das abscissas, já a PC2 contribui 20.04% no eixo das ordenadas, totalizando 77.21% da representação nas novas coordenadas. Podemos observar a distinção entre os pontos pretos (Erys controle) dos pontos vermelhos (Erys pescadores). A Fig. 3.8 (b) mostra a taxa de variação da primeira principal componente em relação as bandas espectrais Raman.

Seguindo o mesmo método utilizado para verificar a sensibilidade de diagnóstico do sistema opto-acustofluídico, observamos que os picos Raman do Erys detectados entre 1500 e 1700 cm^{-1} são significativamente influenciados, de forma semelhante, através do estado de oxigenação da célula investigada. Assim, podemos utilizar o dispositivo para investigar a contaminação do grupo pescadores devido à sua atividade laboral no complexo Mundaú-Manguaba na cidade de Maceió.

Para avaliar as alterações estruturais e conformacionais da membrana lipídica da Erys, escolhemos as bandas atribuídas as vibrações de estiramento da ligação C-C para conformações trans (1128 cm^{-1}) e a banda associada ao gauche de vibração da ligante C-C (1078 cm^{-1}). Assim podemos novamente utilizar a (1.2.6) para determinar a razão de intensidades das bandas de cada população. O S_{trans} quantifica as alterações na membrana lipídica das Erys (LI apud SALES, M.V.S, et al., 2023):

$$S_{controle}^{trans} = \frac{I_{1128}/I_{1078}}{1.77} = 1.15 \quad (3.6.1)$$

$$S_{pescadores}^{trans} = \frac{I_{1128}/I_{1078}}{1.77} = 1.25 \quad (3.6.2)$$

Portanto, a razão entre os grupos dos pescadores e o grupo controle sugere uma diminuição na fluidez da membrana lipídica, tornando-a mais rígida:

$$\frac{S_{pescadores}^{trans}}{S_{controle}^{trans}} \cong 1.08 \quad (3.6.3)$$

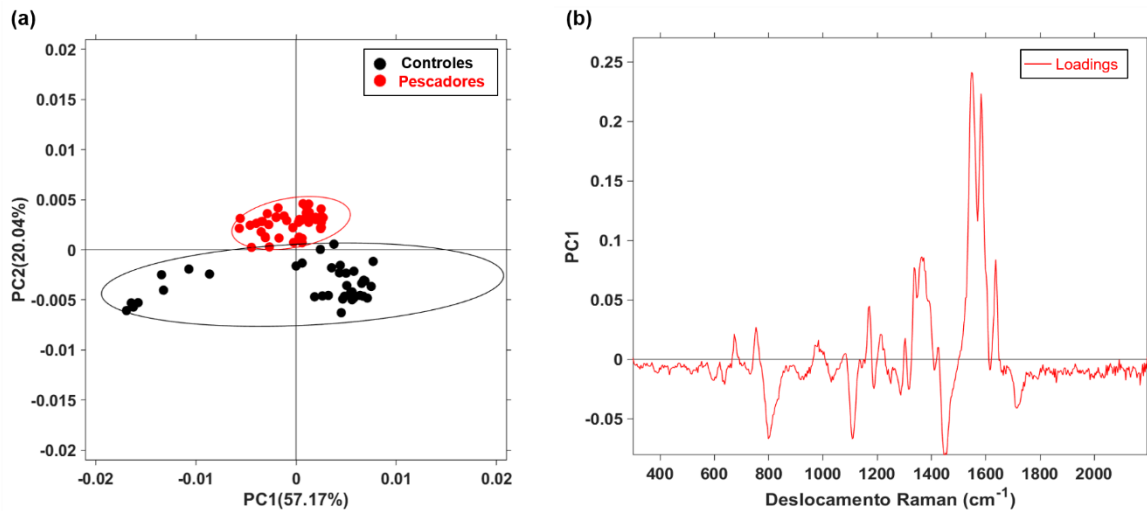
Na Tabela 2 podemos observar a intensidade média das bandas Raman selecionadas de cada grupo para o cálculo da S_{trans} , o desvio padrão em relação ao valor médio e sua variância.

Tabela 2 - Posição da banda, média, desvio padrão e variância de intensidades das Erys controle e pescadores.

	Média	Desvio Padrão	Variância
Controle (1078cm⁻¹)	$3,27 \cdot 10^{-4}$	$9,05 \cdot 10^{-5}$	$8,20 \cdot 10^{-8}$
Controle (1128cm⁻¹)	$6,70 \cdot 10^{-4}$	$1,74 \cdot 10^{-4}$	$3,04 \cdot 10^{-8}$
Pescadores (1078cm⁻¹)	$2,26 \cdot 10^{-4}$	$1,57 \cdot 10^{-4}$	$2,49 \cdot 10^{-8}$
Pescadores (1128cm⁻¹)	$5,03 \cdot 10^{-4}$	$1,65 \cdot 10^{-4}$	$2,74 \cdot 10^{-8}$

Fonte: Autor 2024

Figure 3.8 - (a) PCA representando a discriminação de dados com base em células de controle (pontos pretos) e células de pescadores (pontos vermelhos). A variação percentual capturada por cada PC é mostrada entre parênteses ao longo de cada eixo. (b) *Loadings* do gráfico PC1 para os grupos controle e pescadores.



Fonte: Autor 2024.

O sistema opto-acustofluídico se mostrou importante no avanço de novas técnicas de biópsia óptica que reside na capacidade de melhorar a precisão e diminuir o tempo para diagnósticos de doenças, como também possibilita o monitoramento em tempo real da atuação de fármacos em células únicas ou aglomerados.

A utilização de amostras líquidas em microvolumes aliado a microscopia confocal Raman se mostrou minimamente invasiva e acarreta pouco ou nenhum desconforto aos futuros pacientes. A aquisição dos espectros não foi contaminada pelo substrato devido a levitação e aprisionamento das Erys na microcavidade ressonante do dispositivo. A estrutura das células se manteve estável durante todo o ensaio. Essa capacidade permite o acompanhamento da evolução do tratamento de acordo com a resposta celular em relação a biomarcadores específicos correlacionados as primeiras condições clínicas.

4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

A junção do dispositivo acustofluídico com a microscopia confocal Raman em um único sistema para análises clínicas de microlitros possibilita: maior precisão e velocidade no aferimento de medidas através da levitação, formação de agregados celulares em ordem micrométrica em um plano estável e aquisição de espectros Raman de células únicas. Esse método tem potencial de escalonamento para diagnósticos sem o uso de reagentes caros e obtém informações dos pacientes de forma não invasiva, em tempo real, sem contato com paredes ou substratos.

As técnicas de microfabricação aplicadas possuem viabilidade e variabilidade na otimização de caminhos que possibilitem a propagação da onda acústica em mais de uma microcavidade conectadas para maior caracterização. A diferença de potencial aplicada fornece modos de vibração para microcavidade com as condições de contorno impostas pela Equação de Navier-Stokes aplicadas a canais micrométricos, no qual pela teoria do espalhamento, a força de radiação acústica atua em partículas muito menores que o comprimento de onda submetido obedecendo o potencial de Gorkov. Assim, caracterizamos a frequência e tensão para os eritrócitos serem levitados e aprisionados em um agregado pela força de radiação acústica de primeira ordem e seu espalhamento em segunda ordem.

Os dados obtidos pelo sistema identificaram pequenas varrições nas proteínas seguidas de alterações significativas nas contribuições lipídicas na diferença dos espectros que foram acentuadas através do algoritmo de PCA. Assim conseguimos distinguir células alteradas de células controles e podemos identificar as regiões espectrais significativas para aprimorar os eixos de tendência em novas análises, com grande potencial para diagnóstico e estudo de novos fármacos.

A análise de eritrócitos vivos e de forma única através do espectro Raman em uma microcavidade acústica impressa em 3D, permite o aprisionamento da célula em um nó de pressão na altura média da microcavidade, denominada de plano de levitação. Assim, o sinal retroespalhado Raman do substrato é virtualmente eliminado, capturando prioritariamente as informações do volume focal. Como os eritrócitos possuem forma bicôncava plana, sofrem o efeito do torque de radiação acústica, portanto, ocorre o alinhamento paralelamente ao plano nodal de pressão, o que facilita a aquisição do sinal Raman em um agregado metaestável. O dispositivo acustofluídico mantém os agregados eritrocitários quase estacionários por horas, permitindo a aquisição Raman por longos períodos de tempo. Contudo, para minimizar o tempo

de irradiação nas células e evitar o fotodano, caracterizamos o tempo de tomada de um espectro de qualidade próximo a 2 min.

A análise dos dados diferenciados dos espectros Raman dos grupos controle e aquecidos a 56°C mostrou a viabilidade do dispositivo na identificação de pequenas alterações biomoleculares, com hemoglobina mantendo sua função principal, embora com diminuição da captação de oxigênio. Em última análise, aplicamos o mesmo método na análise de um grupo de pescadores que operam no complexo lagunar Mundaú-Manguába em Maceió-AL, os espectros adquiridos em relação ao grupo controle apresentaram diferenças nas regiões de picos das hemoglobinas, indicando uma alteração na capacidade das células em absorverem oxigênio.

Nosso estudo possibilita investigações da causa morte celular, teste de novos fármacos, alterações bioquímicas em macrófagos em tempo real sem a interferência do substrato por meio da espectroscopia Raman. Assim, identificar uma informação bioquímica única de morte celular pode nos ajudar a traçar o caminho da morte celular induzida por drogas ou seu tratamento medicamentoso in vivo em tempo real. Como também monitorar a influência das ondas acústicas na internalização das nanopartículas luminescentes em células saudáveis ou cancerígenas, capazes de fornecer imagens de fluorescência; detecção subcelular; medição em tempo real da temperatura intracelular e aquisição de imagens de fluorescência de célula única.

O sistema de diagnósticos opto-acustofluídico por ser produto de técnicas de manufatura aditiva necessita de investimentos para escalar e popularizar sua aplicação. O GAFm junto a empresa IntacLab planejam viabilizar a confecção em escala industrial de dispositivos otimizados para aplicações clínicas e laboratoriais, necessitando de investimentos públicos e privados para sua implementação na abertura de um novo ramo de indústria no Brasil. A aquisição de um microscópio confocal Raman por dispositivo acustofluídico se mostra a curto prazo inviável devido aos altos custos, contudo o avanço tecnológico pode agregar na inovação de espectrômetros Raman de preços e tamanhos menores de fácil acoplamento aos dispositivos.

Um dos desafios é a confecção de um sistema isolado termicamente e biologicamente que consiga permitir a entrada de partículas ou fármacos e permaneça ativa com fluxo por várias horas aproximando-se aos poucos do que acontece dentro dos sistemas circulatórios dos seres vivos. Necessitando de otimização na confecção do design do dispositivo junto a inserção de *inlets* que permitam o controle de fluxo e mantendo a área de trabalho para espectroscopias ópticas como a ER.

As análises necessitam de espectros sem ou com pouca fluorescência e normalizados, então o tratamento de dados necessita de atenção para o desenvolvimento de um software com

implementação de algoritmos de uso simples para diagnósticos rápidos. A criação de um banco de espectros de Erys acometidas por variadas doenças potencializa a aplicação de técnicas de aprendizagem de máquina na identificação rápida de doenças como diabetes, leucemia, anemias e linfomas em um futuro próximo.

REFERÊNCIAS

- ATKINS, C.G.; BUCKLEY, K.; BLADES, M.W.; TURNER, R.F.B. Raman spectroscopy of blood and blood components. *Applied Spectroscopy*, v. 71, n. 5, p. 767–793, (2017).
- BAIN, Barbara J. Blood cells: a practical guide. 4. ed. Wiley-Blackwell, Londres, p. 65, (2006).
- BECKER, H.; LOCASCIO, L.E. Polymer microfluidic devices. *Talanta*, v. 56, p. 267–287, (2002).
- 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).
- BRUUS, H. Theoretical microfluidics. [S.l.]: Oxford University Press, Oxford, v. 18, (2008).
- CHAKRABORTY, A.; GHOSH, A.; BARUI, A. Advances in surface-enhanced Raman spectroscopy for cancer diagnosis and staging. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 51, n. 1, (2020).
- CHEN, X.; MILLER, A.; CAO, S.; GAN, Y.; ZHANG, J.; HE, Q.; WANG, R.-Q.; YONG, X.; QIN, P.; LAPIZCO-ENCINAS, B.H. Rapid Escherichia coli trapping and retrieval from bodily fluids via a three-dimensional bead-stacked nanodevice. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 12, p. 7888–7896, (2020).
- D’ACUNTO, M.; GAETA, R.; CAPANNA, R.; FRANCHI, A. Contribution of Raman spectroscopy to diagnosis and grading of chondrogenic tumors. *Scientific Reports*, (2020) 10:2155;
- DING, L.; YANG, X.; GAO, Z.; EFFAH, C.Y.; ZHANG, X.; WU, Y.; QU, L. A holistic review of the state-of-the-art microfluidics for exosome separation: An overview of the current status, existing obstacles, and future outlook. *Small*, v. 17, p. 2007174, (2021).
- DITTRICH, P.S.; MANZ, A. Lab-on-a-chip: Microfluidics in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 5, p. 210–218, (2006).

DOW, P.; KOTZ, K.; GRUSZKA, S.; HOLDER, J.; FIERING, J. Acoustic separation in plastic microfluidics for rapid detection of bacteria in blood using engineered bacteriophage. *Lab on a Chip*, v. 18, p. 923–932, (2018).

DYBAS, J.; ALCICEK, F.C.; WAJDA, A.; KACZMARSKA, M.; ZIMNA, A.; BULAT, K.; BLAT, A.; STEPANENKO, T.; MOHAISSEN, T.; SZCZESNY-MALYSIAK, E.; PEREZGUAITA, D.; WOOD, B.R.; MARZEC, K.M. Trends in Analytical Chemistry, v. 146, 116481, (2022).

EFREMOV, E.V.; ARIESE, F.; GOOIJER, C. Achievements in resonance Raman spectroscopy review of a technique with a distinct analytical chemistry potential. *Analytica Chimica Acta*, v. 606, n. 2, p. 119–134, (2008).

EWEN SMITH, G.; DENT, G. Modern Raman spectroscopy: A practical approach. 2nd ed. Newark: Wiley, (2019).

EWEN SMITH, G.; DENT, G. Modern Raman spectroscopy: A practical approach, p.77, (2019).

GORKOV, L.P. On the forces acting on a small particle in an acoustical field in an ideal fluid. *Soviet Physics – Doklady*, v. 6, n. 9, p. 773–775, (1962).

GROTTO, H.Z.W. O hemograma: Importância para a interpretação da biópsia. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, p. 178-182, (2009).

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 218, (2007).

KALLAWAY, C. et al. Advances in the clinical application of Raman spectroscopy for cancer diagnostics. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 10, n. 3, p. 207–219, (2013).

LAURELL, T.; LENSHOF, A. Microscale acoustofluidics. [S.l.]: Royal Society of Chemistry, (2014).

LENSHOF, A.; EVANDER, M.; LAURELL, T.; NILSSON, J. Acoustofluidics 5: Building microfluidic acoustic resonators. *Lab on a Chip*, Royal Society of Chemistry, v. 12, n. 4, p. 684–695, (2012).

LENZI, E.; DINARELLI, S.; LONGO, G.; GIRASOLE, M.; MUSSI, V. Multivariate analysis of mean Raman spectra of erythrocytes for a fast analysis of the biochemical signature of ageing. *Talanta*, v. 221, p. 121442, (2021).

LI, N.; LI, S.X.; GUO, Z.Y.; ZHUANG, Z.F.; LI, R.; XIONG, K.; CHEN, S.J.; LIU, S.H. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 112, p. 37, (2012).

LI, P.; HUANG, T.J. Applications of acoustofluidics in bioanalytical chemistry. *Analytical Chemistry*, v. 91, p. 757–767, (2018).

LIAO, C.C.; CHEN, Y.Z.; LIN, S.J.; CHENG, H.W.; WANG, J.K.; WANG, Y.L.; HUANG, N.T. A microfluidic microwell device operated by the automated microfluidic control system for surface-enhanced Raman scattering-based antimicrobial susceptibility testing. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 191, p. 113483, (2021).

LIMA, A.M.F.; SILVA, J.D.P.; DANIEL, C.R. Diagnóstico, classificação e monitoramento de leucemias baseado em espectroscopia Raman. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 14, e67101421657, (2021). ISSN 2525-3409.

LOCATELLI, C. Investigating the mechanisms and outcomes of Sprouty-2 S-acylation, (2021).

LONG, D. A. The Raman effect. A unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules, Wiley, Chichester, V.1, p. 31-34, 119-120, 2002.

MANZ, A.; HARRISON, D.J.; VERPOORTE, E.J.; FETTINGER, J.C.; PAULUS, A.; LÜDI, H.; WIDMER, H.M. Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: Capillary electrophoresis on a chip. *Journal of Chromatography A*, v. 593, p. 253-258, (1992).

MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H.M. Miniaturized total chemical-analysis systems—a novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 1, p. 244–248, (1990).

MASE, George E. Schaum's outline series theory and problems of continuum mechanics. (1970).

MILANOVICH, F.P.; SHORE, B.; HARNEY, R.C.; TU, A.T. Raman spectroscopic analysis of Dutch Belt rabbit erythrocyte ghosts. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 17, n. 1, p. 79–84, (1976).

MOOR, K.; TERADA, Y.; TAKETANI, A.; HIROKO, M.; OHTANI, K.; SATO, H. Early detection of virus infection in live human cells using Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, v. 23, n. 9, p. 097001, (2018).

NETO, J.P.L. et al. Força e torque de radiação sobre uma partícula viscoelástica em um fluido ideal. Universidade Federal de Alagoas, (2015).

OSHIMA, Y.; HARUKI, T.; KOIZUMI, K.; YONEZAWA, S.; TAKETANI, A.; KADOWAKI, M.; SAITO, S. Practices, potential, and perspectives for detecting pre-disease using Raman spectroscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, p. 12170, (2023).

PANNEERSELVAM, R.; SADAT, H.; HÖHN, E.M.; DAS, A.; NOOTHALAPATI, H.; BELDER, D. Microfluidics and surface-enhanced Raman spectroscopy, a win–win combination?. *Lab on a Chip*, v. 22, n. 4, p. 665–682, (2022).

PEPTIDOMICS, PROTEOMICS, AND CELL ANALYSIS. *Nanomaterials*, v. 11, p. 1118, (2021).

PETERSON, P.; MCNEILL, S.; GULATI, G. Cellular morphologic analysis of peripheral blood. In *Laboratory Hematology Practice* (eds K. Kottke-Marchant and B.H. Davis), (2012).

PEREZ-GUAITA, D.; MARZEC, K.M.; HUDSON, A.; EVANS, C.; CHERNENKO, T.; MATTHÄUS, C.; MILJKOVIC, M.; DIEM, M.; HERAUD, P.; RICHARDS, J.S.; ANDREW, D.; ANDERSON, D.A.; DOERIG, C.; GARCIA-BUSTOS, J.; MCNAUGHTON, D.; WOOD, B.R. Parasites under the spotlight: Applications of vibrational spectroscopy to malaria research. *Chemical Reviews*, v. 118, p. 5330–5358, (2018).

PETRY, R.; SCHMITT, M.; POPP, J. Raman spectroscopy—a prospective tool in the life sciences. *ChemPhysChem: A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry*, v. 4, n. 1, p. 14–30, (2003).

QI, Yapang et al. Applications of Raman spectroscopy in clinical medicine. *Food Frontiers*, (2024): *Food Frontiers*, 2024-01. (2024).

RAJURKAR, K.; MADOU, M. *Micromachining: International research and development*. Springer, Netherlands, pp. 53-87, (2007).

RAMAN, C.V.; KRISHNAN, K.S. *Nature*, v. 121, p. 501, (1928).

RUSCIANO, G.; LUCA, A.C.D.; PESCE, G.; SASSO, A. Raman tweezers as a diagnostic tool of hemoglobin-related blood disorders. *Sensors, Molecular Diversity Preservation International (MDPI)*, v. 8, n. 12, p. 7818–7832, (2008).

SALES, M.V.S.; SILVA FILHO, R.C.; SILVA, M.M.; ROCHA, J.L.; FREIRE, R.O.; TANABE, E.L. de L.; SILVA, E.C.O.; FONSECA, E.J.S.; FIGUEIREDO, I.M.; ROCHA, U.; SANTOS, J.C.C.; LEITE, A.C.R. *Trace Element Medicine and Biology*, v. 71, p. 126928, (2022).

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 acousto-fluidic devices for Raman spectroscopy of cells. *Advanced Engineering Materials, Wiley Online Library*, v. 23, n. 10, p. 2100552, (2021).

SAVAGE, W.J.; BURNS, J.R.; FIERING, J. Safety of acoustic separation in plastic devices for extracorporeal blood processing. *Transfusion*, v. 57, p. 1818–1826, (2017).

SHIPP, D.W.; SINJAB, F.; NOTINGHER, I. Raman spectroscopy: Techniques and applications in the life sciences. *Advanced Optical Materials*, v. 9, p. 315–428, (2017).

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).

SILVA, G.T.; LOPES, J.H.; LEÃO-NETO, J.P.; NICHOLS, M.K.; DRINKWATER, B.W. Particle patterning by ultrasonic standing waves in a rectangular cavity. *Physical Review Applied, APS*, v. 11, n. 5, p. 054044, (2019).

SILVA, G. T. Acoustic radiation force and torque on an absorbing compressible particle in an inviscid fluid. *The Journal of the Acoustical Society of America*, v. 136, n. 5, p. 2405–2413, (2014).

SILVA, G.T.; TIAN, L.; FRANKLIN, A.; WANG, X.; HAN, X.; MANN, S.; DRINKWATER, B.W. *Physical Review E*, v. 99, p. 063002, (2019).

SLATINSKAYA, O.; LUNEVA, L.; DEEV, A. et al. *Biophysics*, v. 66, p. 797, (2021).

SMEKAL, A. *Naturwissenschaften*, v. 43, p. 873, (1923).

STEWART, J. *Cálculo Vol. 2. Notes and Queries*, v. 180, (2018). ISSN 0029-3970.

LAURELL, T.; NILSSON, A. Chip integrated strategies for acoustic separations and manipulations of cells and particles. *Chemical Society Reviews*, v. 36, p. 492-506, (2007).

LONG, D. A. *The Raman effect: a unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules*. Wiley, Chichester, v. 1, p. 31-34, (2002).

TIAN, W.C.; FINEHOUT, E. Microfluidic systems for cellular applications. In: *Microfluidics for Biological Applications*. Springer, Boston, MA, (2008).

ROCHA, U.; SALES, M.V.; SILVA, G.C.; D'AMATO, F.O.; LEITE, A.C.; SILVA, G.T. Advancing Raman spectroscopy of erythrocytes with 3D-printed acousto-fluidic devices. *Applied Physics Letters*, v. 123, n. 3, (2023).

VITORINO, R.; GUEDES, S.; DA COSTA, J.P.; KAŠIČKA, V. Microfluidics for peptidomics, proteomics, and cell analysis. *Nanomaterials*, v. 11, n. 5, p. 1118, (2021).

WANG, L.; GAO, M.; LI, L.; WANG, X.; ZHANG, Y.; XIAO, W.; ZHANG, Y.; CHEN, Y. Applications of Raman spectroscopy in bacterial infections: Principles, advantages, and shortcomings. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 683580, (2021).

WEI, W.; WANG, Y.; WANG, Z.; DUAN, X. Microscale acoustic streaming for biomedical and bioanalytical applications. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 116958, (2023).

WEINGRILL, R. B., LEE, M. J., BENNY, P., RIEL, J., SAIKI, K., GARCIA, J., ... & URSCHITZ, J. Temporal trends in microplastic accumulation in placentas from pregnancies in Hawai'i. *Environment International*, v. 180, p. 108220, (2023).

WHITESIDES, G. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, v. 442, p. 368–373, (2006).

WILLNER, M. R., MCMILLAN, K. S., GRAHAM, D., VIKESLAND, P. J., ZAGNONI, M. Surface-enhanced Raman scattering based microfluidics for single-cell analysis. *Analytical Chemistry*, v. 90, n. 20, p. 12004-12010, (2018).

XIE, Y., RUFO, J., ZHONG, R., RICH, J., LI, P., LEONG, K. W., HUANG, T. J. Microfluidic isolation and enrichment of nanoparticles. *ACS Nano*, v. 14, p. 16220–16240, (2020).

XU, JIAYANG, CHEN, HONGYI, WANG, CE, MA, YUTING, SONG, YIZHI. Citometria de fluxo Raman e suas aplicações biomédicas. *Biossensores*, v. 14, n. 4, p. 171, (2024).

ANEXOS

ANEXO A - ADVANCING RAMAN SPECTROSCOPY OF ERYTHROCYTES WITH 3D-PRINTED ACOUSTOFLUIDIC DEVICES

ACCEPTED MANUSCRIPT

Applied Physics Letters



This is the author's peer-reviewed, accepted manuscript. However, the online version of record will be different from this version once it has been copyedited and typeset.
PLEASE CITE THIS ARTICLE AS DOI: 10.1063/5.0145565

Advancing Raman Spectroscopy of Erythrocytes with 3D-printed Acoustofluidic Devices

Ueslen Rocha,^{1,*} Gielênio C. Silva,^{2,*)} Marcos V. S. Sales,³ Flávio O. S. D'Amato,² Ana C. R. Leite,³ and Glauber T. Silva²

¹⁾Nanomaterials for Bioimaging Group, Departamento de Física de Materiales, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Francisco Tomás y Valiente 7, 28049, Madrid, Spain.

²⁾Physical Acoustics Group, Institute of Physics, Federal University of Alagoas, Maceió, AL 57072-900, Brazil^(*)

³⁾Bioenergetics Laboratory, Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, Maceió, AL 57072-900, Brazil.

(*Electronic mail: gtomaz@fis.ufal.br)

(*Electronic mail: ueslen.silva@fis.ufal.br)

(Dated: 19 May 2023)

Acoustofluidics is a technique that utilizes the forces produced by ultrasonic waves and fluid flows to manipulate cells or nano/microparticles within microfluidic systems. In this study, we demonstrate the feasibility of performing the Raman analysis of living human erythrocytes (Erys) within a 3D-printed acoustofluidic device designed as a half-wavelength multilayer resonator. Experiments show that a stable and orderly Ery aggregate can be formed in the pressure nodal plane at the resonator's mid-height. This has a significant potential for improving the applicability of Raman spectroscopy in single Ery analysis, as evidenced by the acquisition of the spectrum of healthy and pre-heated Erys without substrate interference. Moreover, principal component analysis (PCA) applied on the obtained spectra confirms the correct Ery group identification. Our study demonstrates that 3D-printed acoustofluidic devices can improve the accuracy and sensitivity of Raman spectroscopy in blood investigations, with potential clinical applications for non-invasive disease diagnosis and treatment monitoring.

Acoustofluidic methods are employed to manipulate cells and microparticles in microfluidic systems, commonly using the acoustic radiation force.^{1,2} The exchange of linear momentum between an incoming ultrasonic wave and a suspended object generates this force.^{3,4}

In this Letter, we present a 3D-printed resonant microcavity, as depicted in Fig. 1. A piezoactuator generates bulk acoustic waves (BAWs) to trap human Erys immersed in phosphate buffer saline (PBS) in the pressure node^{5,6} at the microcavity mid-height. In addition to being trapped, each Ery is also subjected to the acoustic radiation torque caused by changes in the angular momentum of the incident wave due to scattering and absorption.⁷⁻¹¹ Erys are re-oriented parallel to the pressure nodal plane through the action of radiation torque, resulting in a configuration that minimizes their potential energy.¹²⁻¹⁴ It is worth mentioning that BAW acoustofluidic devices have been extensively employed for cell and microparticle focusing and separation,¹⁵⁻¹⁹ patterning,²⁰⁻²² and simultaneous aggregation and levitation.²³⁻²⁷

Another force that arises between two Erys is the secondary radiation force.^{28,29} This force organizes Erys into a two-dimensional (2D) lattice structure that persists for extended periods. This system state allows for the inspection of individual Erys at will. In particular, we demonstrate that

this aggregate is suitable for performing Raman spectroscopy (RS) on single, living Erys. RS is a powerful tool for analyzing cell biochemistry at the molecular level. The technique has been used to investigate the Ery membrane, analyze hemoglobin structure, assess the properties of ligands bound to hemoglobin, determine the quality of stored blood in transfusion medicine, and diagnose diseases such as thalassemia, sickle-cell disease, malaria, and diabetes.³⁰ Additionally, recent research has demonstrated that RS detected changes in heme conformation, membrane lipids, and amino acids caused by human exposure to mercury.³¹

Acoustofluidics has been utilized in a variety of scenarios to enhance the capabilities of RS, including the molecular investigation of microparticles in liquid flows and suspensions,^{32,33} detection of nucleic acids,³⁴ monitoring live bacteria in the presence of an antibiotic,³⁵ probing exosomes,³⁶ and bioanalyzing macrophage cultures.²⁶ The role of acoustofluidics in these applications is to enrich biosamples through the acoustic radiation force. However, the impact of radiation torque on enrichment processes has yet to be fully explored.

We provide a detailed examination on how the radiation force and torque produced in 3D-printed acoustofluidic devices can significantly improve Ery enrichment. As a result, the Raman investigation of a live and single Ery becomes simple and without the influence of the substrate. The method is showcased by acquiring the Raman spectrum of a healthy (control) and a pre-heated Ery population. The pre-heating protocol consists in placing Erys in an independent heat bath at 56°C temperature (see Sec. 1.1 of the supplementary material). We chose pre-heated Erys as an example because this temperature is routinely used to deactivate the SARS-CoV-2 virus in blood samples.³⁷ With the Raman analysis, we could

^{*)}Permanent address: Nanophotonics and Imaging Group, Institute of Physics, Federal University of Alagoas, Maceió, AL 57072-900, Brazil.

^{*)}Also at INTRA-LAB Ltd, Maceió, AL 57035-557, Brazil.

^{*)}U. Rocha and G. C. Silva equally contributed to this work.

Authors to whom correspondence should be addressed: U. Rocha, ueslen.silva@fis.ufal.br; G. T. Silva, gtomaz@fis.ufal.br

ANEXO B - TEMPORAL TRENDS IN MICROPLASTIC ACCUMULATION IN PLACENTAS FROM PREGNANCIES IN HAWAII

Environment International 180 (2023) 108220



Contents lists available at ScienceDirect

Environment International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envint



Full length article

Temporal trends in microplastic accumulation in placentas from pregnancies in Hawaii



Rodrigo Barbano Weingrill^{a,1}, Men-Jean Lee^{b,1}, Paula Benny^b, Jonathan Riel^b, Kevin Saiki^b, Jacob Garcia^b, Lais Farias Azevedo de Magalhaes Oliveira^c, Eduardo Jorge da Silva Fonseca^c, Samuel Teixeira de Souza^c, Flavio de Oliveira Silva D'Amato^c, Ueslen Rocha Silva^c, Mariana Lima Dutra^d, Aldilane Lays Xavier Marques^d, Alexandre Urban Borbely^{d,*}, Johann Urschitz^{a,*}

^a Institute for Biogenesis Research, Department of Anatomy, Biochemistry, and Physiology, John A. Burns School of Medicine, University of Hawaii'i at Manoa, Honolulu, HI, USA

^b Department of Obstetrics and Gynecology, John A. Burns School of Medicine, University of Hawaii'i, Honolulu, HI, USA

^c Physics Institute, Federal University of Alagoas, Maceio, Alagoas, Brazil

^d Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, Maceio, Alagoas, Brazil

ARTICLE INFO

Handling Editor: Shoji Nakayama

Keywords:
Human placenta
Microplastic accumulation
Raman spectroscopy
Atomic force microscopy

ABSTRACT

Microplastics are created for commercial use, are shed from textiles, or result from the breakdown of larger plastic items. Recent reports have shown that microplastics accumulate in human tissues and may have adverse health consequences. Currently, there are no standardized environmental monitoring systems to track microplastic accumulation within human tissues. Using Raman spectroscopy, we investigated the temporal exposures to plastic pollution in Hawaii and noted a significant increase in the accumulation of microplastics in discarded placentas over the past 15 years, with changes in the size and chemical composition of the polymers. These findings provide a rare insight into the vulnerability and sensitivity of Pacific Island residents to plastic pollution and illustrate how discarded human tissues can be used as an innovative environmental plastic pollution monitoring system.

1. Introduction

Plastic products have become a ubiquitous and essential part of modern society owing to their physiochemical properties, mass production, and convenience. Packaging containers and storage materials, single-use water bottles, sterile medical supplies, and clothing made of plastic materials have become an integral part of everyday life. Global plastic production has increased exponentially from under 2 Megatons (Mt) in the 1950s to more than 400 Mt in 2022 (Landrigan, 2023). Worldwide, only 9% of plastic waste is recycled, while 22% is polluted into the environment as macro- and microplastic waste (OECD, 2022). Macroplastic pollution is degraded by physical elements (e.g., sun, heat, wind) and chemical agents (e.g., acid, salt, chlorine) into microplastic (MP) particles (1 μ m to 5 mm) which accumulate in the environment over time (Hale et al., 2020). This rapid increase in environmental

pollution by commercial plastics has a combined impact on climate change, marine ecosystems, and ultimately public health.

Recently, there have been reports of MP accumulation in the human gut, lungs, and bloodstream (Ibrahim, 2021; Jenner, 2022; Leslie, 2022). However, even more alarming are the recent discoveries of MP in the human reproductive system, such as the male testis (Zhao, 2023), mammary glands (breastmilk) (Ragusa, 2022), and placental tissue (Ragusa, 2021). Nonetheless, the impact of MP accumulation in human tissues and the effect on population health is still largely unknown (Haram, 2020; Academies and of Sciences Engineering and Medicine, 2022; Sun, 2020). Currently, there are no established systems to track environmental sources, sources of plastic, circulation of plastic pollution, or MP bioaccumulation in human tissues. While it has been postulated that plastic ingestion by marine wildlife could serve as a marker of marine health and coastal environments (Savoca, 2022), there

* Corresponding authors.

E-mail address: johann@hawaii.edu (J. Urschitz).

¹ RBW, MJL, AUB and JU contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.108220>

Received 29 June 2023; Received in revised form 3 September 2023; Accepted 18 September 2023

Available online 20 September 2023

0160-4120/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Fonte: Weingrill, R.B. 2023.