

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE FÍSICA

CURSO DE LICENCIATURA EM FÍSICA

FLÁVIO DE OLIVEIRA SILVA D'AMATO

Bioespectroscopia de células vermelhas em dispositivo de acustofluídica

Maceió, AL

2021

FLÁVIO DE OLIVEIRA SILVA D'AMATO

Bioespectroscopia de células vermelhas em dispositivo de acustofluídica

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Física da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciado em Física.

Orientador: Prof. Dr. Uéslen Rocha Silva

Maceió, AL

2021

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

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

D155b D'Amato, Flávio de Oliveira Silva.
Biospectroscopia de células vermelhas em dispositivo de acustoflúidica /
Flávio de Oliveira Silva D'Amato. – 2021.
37 f. : il.

Orientador: Uéslen Rocha Silva.
Monografia (Trabalho de conclusão de curso em Física: licenciatura) –
Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Física. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 32-37.

1. Dispositivo de acustoflúidica. 2. Microscopia confocal. 3. Análise
espectral Raman. I. Título.

CDU: 543.424.2

Dedico este trabalho a minha mãe Valdelita, ao meu pai Anielo e ao meu irmão Mikhael que me ajudaram a acreditar, perseverar e fortalecer durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais Valdelita Oliveira e Anielo D'Amato que trabalharam muito para conceder uma educação de qualidade para meu irmão e para mim. Além de incentivar a criar oportunidades para alcançar meus objetivos.

Ao meu irmão Mikhael O.S. D'Amato por me apoiar e ajudar nos afazeres de casa e nos estudos, como também buscar novos aprendizados e tecnologias para nos capacitar.

Aos meus amigos do ensino médio Cleysson Darlysson, Igor Albuquerque, Joyce Azevedo, J. Matheus Silva e Vinícius Jatobá por estarem comigo no prólogo dessa jornada e sempre me encorajar a alcançar maiores objetivos e pela motivação constante.

Aos meus amigos da universidade Andrerson Pontual, George Tavares, Herbert Omena, Libni Teles, Luana Silva, Maiara Monteiro e Marcos Oliveira que ajudaram, acompanharam e estimularam na rotina de estudos dentro do campus.

Ao Prof. Dr. Glauber Silva do Grupo de Acústica Física (GAF) pelos ensinamentos e pela oportunidade de participar de alguns estudos experimentais sobre dispositivos acustofluidicos, ao Dr. Tasso Sales do Grupo de Nano-fotônica e Imagens (GNFI) e ao Me. Giclênio Silva do GAF que me ajudaram nos procedimentos experimentais deste trabalho e na iniciação científica dentro do Instituto de Física.

Ao meu orientador Prof. Dr. Uéslen Rocha Silva pelos ensinamentos e oportunidades concedidas durante minha graduação, por proporcionar o ingresso no GNFI através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), fornecendo atividades e instruções para manuseios de equipamentos, programas e na confecção de algoritmos computacionais comentados neste trabalho.

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

Ao CNPq pelo suporte financeiro através do PIBIC.

A Deus por me fornecer uma mentalidade forte para não desistir, levantar e continuar além de onde estou. Pois com fé, podemos alcançar nossos sonhos.

RESUMO

As hemopatias são consideradas distúrbios sanguíneos capazes de alterar a saúde do paciente afetado, podem ser hereditárias ou adquiridas ao longo da vida surgindo nos próprios componentes sanguíneos nos processos de formação das células vermelhas. As disfunções sanguíneas mais comuns no Brasil são anemia, distúrbios sanguíneos, coágulos sanguíneos e por último câncer no sangue, sendo o diagnóstico precoce determinante para o tratamento. Contudo o acesso ao diagnóstico e exames hematológicos está atrelado a condição econômica do paciente, portanto, o tratamento clínico é iniciado em estágios mais graves da doença. Este trabalho tem o objetivo de estudar e desenvolver novas tecnologias com capacidade de diagnóstico pouco invasiva baseado em espectroscopia vibracional Raman em células vermelhas para identificação e diferenciação de possíveis hemopatias com menores custos. A plataforma usa métodos de espectroscopia óptica Raman aliado a um dispositivo de acustofluídica capaz de armadilhar e levitar partículas através da força de radiação acústica, assim possibilita a investigação de propriedades bioquímicas de uma célula separada ou de um aglomerado de células sem o contato com paredes ou do substrato da cavidade submilimétrica. Através da plataforma de opto-acustofluídica obtivemos os espectros Raman com laser de 532nm de um conjunto de células normais e células vermelhas aquecida, em seguida aplicamos o método de análise dos componentes principais em uma matriz de 32 amostras por 513 linhas espectrais a fim de distinguir os grupos, pois a diferença de intensidade correspondentes as espectrais médias propiciam indicar os componentes biomoleculares que sofreram alteração com o processo de aquecimento.

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

ABSTRACT

Hemopathies are considered blood disorders capable of altering the health of the affected patient, they can be hereditary or acquired throughout life, arising in the blood components themselves in the processes of formation of red cells. The most common blood disorders in Brazil are anemia, blood disorders, blood clots and finally blood cancer, with early diagnosis being a determining factor for treatment. However, access to diagnosis and hematological exams is linked to the economic condition of the patient, therefore, clinical treatment is started in more severe stages of the disease. This work aims to study and develop new technologies with minimally invasive diagnostic capability based on Raman vibrational spectroscopy in red cells for the identification and differentiation of possible hemopathies at lower costs. The platform uses Raman optical spectroscopy methods combined with an acoustofluidics device capable of trapping and levitating particles through the force of acoustic radiation, thus enabling the investigation of biochemical properties of a separate cell or a cluster of cells without contact with walls or of the submillimeter cavity substrate. Through the opto-acoustofluidics platform, we obtained with a 532nm laser from a set of normal cells and heated red cells, the Raman spectra. Then, we applied the principal component analysis method in a matrix of 32 samples by 513 spectral lines in order to distinguish the groups, as the difference in intensity corresponding to the average spectral bands provide an indication of the biomolecular components that underwent alteration with the heating process.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Escala fluídica para dimensionar canais e área de atuação dos dispositivos. ..	17
Figura 2: Técnica de punção venosa usando contêiner de evacuação.	18
Figura 3: Representação das células vermelhas do sangue.	19
Figura 4: Sangue com anticoagulante e centrifugado, separado em camadas de plasma, leucócitos e células vermelhas.....	19
Figura 5: Representação da configuração do microscópio confocal Raman	21
Figura 6: Esquema ilustrativo da plataforma integrado de opto-acustofluídica.	22
Figura 7: Processo de coleta e separação do material para análise na Plataforma Integrada de opto-acustofluídica.....	24
Figura 8: (a) espectro Raman obtido com ruídos e fluorescência. (b) espectro Raman após tratamento com o baseline.	25
Figura 9: (a) Fotografia do sistema integrado Raman-acustofluídica. (b) Representação do aprisionamento de uma única célula devido a força de radiação acústica, desligado e ligado; (c) Imagem do aprisionamento de células vermelhas normais dentro da microcavidade do dispositivo; (d) Imagem do aprisionamento de células vermelhas que foram aquecidas por 50° C durante 23 min.	26
Figura 10: Intensidade do espectro médio em relação ao deslocamento Raman das células vermelhas normais.....	27
Figura 11: (a) Relação entre os espectros médios das células vermelhas normais e aquecidas, evidenciando os picos de intensidade correspondente as bandas espectrais; (b) Dispersão das amostras nas duas primeiras componentes principais, considerando apenas duas dimensões do domínio transformado; (c) Variação da primeira componente principal com o deslocamento Raman.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Equipamentos utilizados e suas funções.	21
Tabela 2: Posição da banda, atribuição e coordenada local para células vermelhas normais 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.	28

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

LOC	Laboratório no chip (Do inglês: “Lab-On-a-Chip”)
PCA	Análise da Principal Componente (Do inglês: “Principal Component Analysis”)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (Do inglês: “Ethylenediamine Tetraacetic Acid”)
MAF	Micro-acustofluídica (Do inglês: “Micro-acoustofluidics”)
GNFI	Grupo de Nano-Fotônica e Imagens
GAF	Grupo de Acústica Física
PZT	Piezoelétrico ou Piezo-atuador
PBS	Tampão fosfato-salino (Do inglês: “Phosphate Buffered Saline”)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
2.1 Espectroscopia Raman	13
2.2 Micro-acustofluídica	15
2.3 Células Vermelhas	17
2.4 Análise dos componentes principais (PCA).....	20
3 METODOLOGIA.....	20
3.1 Espectroscopia Raman: LabRam HR Evolution, Horiba	20
3.2 Plataforma Integrada de opto-acustofluídica.....	21
3.2.1 Microfabricação do Dispositivo	23
3.3 Coleta do Material	23
3.4 Análise dos dados: PCA	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
4.1 Pré-processamento e Análise	24
4.2 Bioespectroscopia das Células Vermelhas	25
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	31
REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

A microfluídica surge próximo ao ano de 1900, 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). Com o avanço tecnológico, novas tecnologias laboratoriais em menores tamanhos começaram a ganhar espaço de produção no mercado, uma das principais foram os dispositivos microfluídicos com finalidade de realizar análises clínicas e laboratoriais em pequenos chips. No final de 1990, 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).

Quando utilizamos transdutores em uma cavidade ressonante, criamos um campo acústico e nos nós de pressão da onda estacionária formada surge uma força de radiação acústica que possibilita a levitação e sua 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 (T. LAURELL, F.P.; NILSSON, A., 2007).

Células humanas e polímeros podem ser descritas como partículas viscoelásticas. O sangue fica contido no aparelho circulatório, que mantém movimento regular e unidirecional, devido as contrações do coração. O sangue separado por punção venosa, tratado por anticoagulantes e em seguida centrifugado separa-se em várias camadas que mostram sua heterogeneidade (JUNQUEIRA. L.C; CARNEIRO. J., 2007. P. 218). A espectroscopia Raman possibilita um diagnóstico óptico não invasivo e rápido, ela investiga 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 (ZAMARRENHO, L. et al, 2005). O desenvolvimento de novos estudos e técnicas de biópsia óptica promove eliminar as desvantagens da biópsia convencional no diagnóstico e estudo de doenças (PEREIRA et al., 2004).

Neste trabalho, utilizamos o sistema de opto-acustofluídica com processos de manufatura aditivas, por meio da combinação de técnicas de espectroscopia óptica com o dispositivo de acustofluídica que utiliza ondas mecânicas capazes de transportar momento em sua propagação, o que as torna propícias a manipular células e averiguar reações em volume de microlitros. As células quando levitadas pelo biorreator em um plano de aprisionamento, facilita

a focalização e possibilita a obtenção do espectro Raman em microvolumes com baixa concentração. Potencializando informações químicas e estruturais dos materiais envolvidos, com maior precisão e velocidade possibilitando análises sobre a diferença entre espectros de células normais e células alteradas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Espectroscopia Raman

O espalhamento da luz incidente está intimamente ligado as cores do céu, o espalhamento da luz solar evidenciado por Rayleigh devido às moléculas na atmosfera, produz a visualização do céu azul pela manhã e alaranjado pelo final da tarde. Nesse espalhamento há uma conservação da energia do fóton, ou seja, o fóton incidente é igual ao espalhado.

A luz é uma forma de radiação eletromagnética, que possui propriedades de onda e partícula ("fóton"). A radiação eletromagnética se propaga através do espaço, transportando uma certa quantidade de energia. Essa energia é proporcional à sua frequência ν de oscilação, que pode ser descrita em termos do comprimento de onda, λ , e pela velocidade da luz, c , ou seja, $\nu = c/\lambda$. Quando um feixe de luz atinge a matéria ele pode ser transmitido, refratado, absorvido ou espalhado. Além disso, a luz incidente pode transferir energia para as moléculas que constitui a matéria, provocando, portanto, vibrações moleculares. Essas vibrações podem estar situadas na região do visível, infravermelho ou infravermelho próximo. O ramo da ciência que estuda esses processos, resultantes da interação luz-matéria, é denominado de espectroscopia.

Existem diferentes tipos de espectroscopias, dentre elas destacamos a espectroscopia Raman. Em 1928, C.V. Raman se dedicou ao estudo do espalhamento inelástico do fóton previsto por Smekal em 1923. Na espectroscopia Raman a luz espalhada apresenta bandas de frequência diferentes do incidente devido a substância que causa o espalhamento (GARCIA SOLÉ, J. et al., 2005).

A espectroscopia Raman pertence ao grupo de espectroscopias vibracionais (OPILIK, L. et al., 2013). Esta técnica mede os níveis de energia vibratória associados às ligações químicas de um dado material através da interação da radiação eletromagnética com o movimento vibracional dos núcleos, gerando, assim, o espectro vibracional. Os espectros vibracionais exibem uma maior riqueza de detalhes sobre o material analisado já que são espectros de emissão com bandas estreitas e em posições correspondentes às vibrações das ligações nas moléculas presentes no material. Vale ressaltar que esses espectros são únicos para

cada material e das 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.

O espalhamento Raman pode acontecer de duas formas de acordo com a intensidade e frequência da luz espalhada Stokes e anti-Stokes, o Stokes ocorre como resultado da absorção de fótons do estado fundamental para um estado virtual, seguido por um despovoamento para um estado excitado por fônon, a frequência do fóton espalhado é menor que a do fóton incidente, portanto, absorve energia. Por outro lado, o espalhamento Raman anti-Stokes é explicado como sendo um resultado da absorção de fótons no estado excitado por fônon para um estado virtual, seguido por um despovoamento até o estado fundamental, a frequência do fóton espalhado é maior que a do fóton incidente, logo cede energia.

No aparato experimental a radiação espalhada é coletada por geometria de retroespalhamento empregada no experimento, obtêm-se as frequências dos modos vibracionais do material a partir da diferença entre os espectros de radiação incidente e espalhado. No gráfico resultante temos no eixo das abcissas essas diferenças em termos de número de onda (cm^{-1}) e no eixo das ordenadas a intensidade espectral em unidades arbitrárias (u.a.) (RODRIGUES, A. et al., 2012).

O espectro Raman está relacionado a energia dos modos normais de vibração que dependem das interações atômicas e moleculares do material que caracteriza o material analisado, fornecendo informações de identificação, quantificação e estruturais da substância. No caso das células os modos vibracionais obtidos por meio da espectroscopia Raman são referentes às enzimas, lipídios, fosfolipídios, proteínas, amida I e amida II, caroteno, glucosamina e outras que são utilizadas para o diagnóstico de diversas doenças, incluindo câncer de cérebro, ovário, mama, próstata, pâncreas, células tumorais circulantes e leucemias (D’ACUNTO, M. et al., 2020; RAMÍREZ-ELÍAS, M.G.; GONZÁLEZ, F.J., 2018).

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 seção transversal de espalhamento na água com $1\ \mu\text{m}$ e sua microscopia confocal permite observar espectros in situ de células vivas em diferentes posições dentro da célula (NOTINGHER, I. et al., 2002).

Ao longo das últimas décadas, os avanços tecnológicos em termos de lasers e detectores, consolidaram a espectroscopia Raman como uma poderosa ferramenta para estudos de sistema biológicos (AUNER, G.W. et al.; CUI, S. et al., 2018). Dentro desse contexto, uma das suas principais vantagens está no fato de ser uma técnica de diagnóstico em tempo real, não invasiva, não destrutiva capaz de fornecer informações em nível molecular, possibilitando a identificação de grupos funcionais e tipos de ligações, com especificidade molecular.

Outra importante evolução é a combinação da espectroscopia Raman com a microscopia óptica. Essa junção tornou-se uma poderosa plataforma para análises de células vivas sendo capaz de detectar alterações bioquímicas em células individuais e, bem como, realizar imagens com alta resolução espacial (MOOR, K. et al., 2014). De fato, essa junção se apresentou como uma importante ferramenta para a detecção de infecções por vírus e seus mecanismos. Sendo possível realizar diagnóstico precoce da infecção de uma célula humana pelo adenovírus (grupo de vírus que normalmente causam doenças respiratórias), determinada apenas 3 h após a invaginação (MOOR, K. et al., 2018).

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 retro-espalhado pelo analito (MOOR, K. et al., 2018). Geralmente, 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. Nossa estratégia para sobrepor essas dificuldades é baseada na construção de um método integrado para análise de células isoladas, usando espectroscopia Raman em dispositivos de acustofluídica, que será apresentado com mais detalhes na seção 3.2.

2.2 Micro-acustofluídica

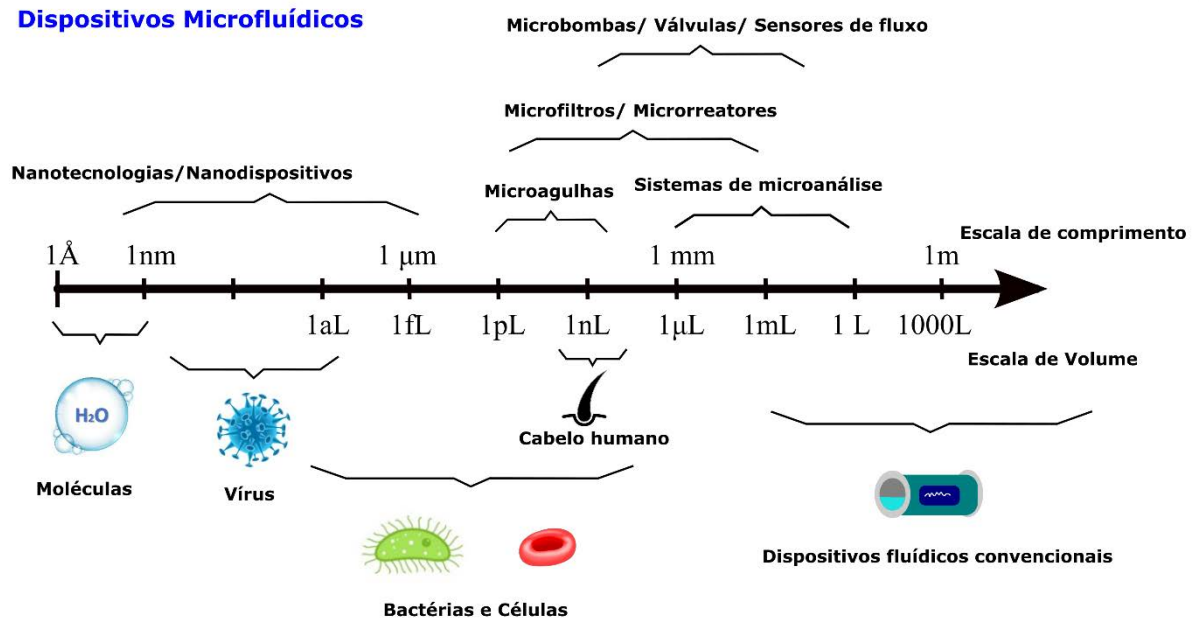
Nos últimos anos houve um enorme interesse em técnicas de ultrassom para manipulação sem contato de micro-partículas tais como células e outros microorganismos para separação, enriquecimento e bioensaios (NILSSON, A. et al., 2004; EVANDER, M. et al., 2007). Essas técnicas são implementadas em plataformas tipo LOC que combina método microfluídica com ondas de ultrassom em cavidades submilimétricas. As técnicas estão no

domínio da micro-acustofluídica. Elas oferecem vantagens quando comparadas a métodos tradicionalmente utilizados em ensaios de células, como placas de microtitulação fabricadas normalmente em poliestireno incolor com dezenas de poços (de alguns milímetros de diâmetro) dispostos numa matriz retangular. Apesar de seu uso em ensaio de células essas placas não oferecem um ambiente mais próximo ao “natural”, que ocorre quando as células estão inseridas em sistemas biológicos vivos, onde prevalece trocas contínuas de metabólitos e nutrientes para proliferação e desenvolvimento de tecidos de forma eficiente. Adicionalmente, a manipulação e monitoramento de células no interior de placas de microtitulação apresentam um desafio adicional no bioensaio. Especialmente para organismos que apresentam baixa taxa de crescimento e necessitam de tempos de incubação longos (KUMAR, S. et al., 2004). Outro aspecto é o fato de que placas de microtitulação não são ideais ao trabalhar com células não aderentes (TEHRANIROKH, M. et al., 2013), que são melhores processadas em um ambiente sem contato com substrato e paredes (EVANDER, M. et al., 2007; TEHRANIROKH, M. et al., 2013).

As técnicas baseadas em micro-acustofluídica são bastante promissoras para ensaio de células e como alternativa a placas de microtitulação. Através da acustofluídicas, células podem ser levitadas e padronizadas em 1D e 2D em uma cavidade acústica com dimensões da ordem de alguns milímetros. O aprisionamento acústico é realizado no regime ultrassônico através de ondas estacionárias que exercem a força de radiação acústica sobre uma micro-partícula (SILVA, G.T., 2014). Diferente da pressão de radiação óptica ou força magnética, a força de radiação acústica depende das propriedades mecânicas da partícula e do meio como densidade e compressibilidade. Tal dependência é uma vantagem, pois garante um armadilhamento seletivo, isto é, células e/ou partículas com propriedades distintas podem ser concentradas em um canal fluídico ou mesmo serem separadas (JEONG, J.S. et al., 2011). Vale ressaltar que esse sistema é composto de transdutores ultrassônicos que podem ser adaptados a dispositivos com cavidades compatíveis com a microfluídica e tecnologia LOC. O armadilhamento acústico de micro-partículas ocorre na posição dos mínimos da energia potencial da força de radiação acústica (também chamado de poço de potencial acústico) (SILVA, G.T., 2014). É comum que grupos de células sejam armadilhados em um poço acústico. Entretanto, existem dispositivos que aprisionam uma única célula em um poço de potencial (SILVA, G.T. et al., 2019), permitindo o estudo de células isoladas (em inglês, single-cell analysis).

A Figura 1 mostra a escala de aplicação das técnicas de microfluídica, na região que compõe sistemas de microanálises que possuem microcanais maiores que células, possibilitando a análise e o fluxo de microorganismos.

Figura 1: Escala fluídica para dimensionar canais e área de atuação dos dispositivos.



Fonte: Autor, 2021.

2.3 Células Vermelhas

As células vermelhas são componentes essenciais do sangue, no ser humano possuem a função de transporte de substâncias e nutrientes, podem ser chamados de hemácias ou eritrócitos. Contribuem com a homeostase e o funcionamento do organismo. Durante o processo de diferenciação das células troncos, elas acabam perdendo seu núcleo, perde sua capacidade de se dividir e a rede de proteínas formada por microtúbulos formam um citoesqueleto que é responsável pela estabilidade e estrutura das células vermelhas (JUNQUEIRA. L.C; CARNEIRO. J., 2007). O sangue pode ser coletado pela técnica de punção venosa usando um contêiner de evacuação como mostrado na Figura 2.

Figura 2: Técnica de punção venosa usando contêiner de evacuação.

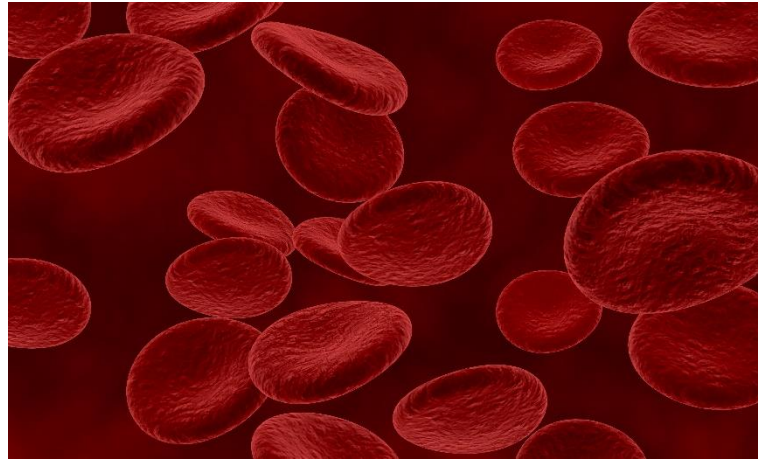


Fonte: Retirado de BAIN, BARBARA J., 2006.

O diâmetro médio das células vermelhas está em torno de $7,5\ \mu\text{m}$, com $2,6\ \mu\text{m}$ de espessura próximo a borda e $0,8\ \mu\text{m}$ próximo ao centro, tem diferente metabolismo por não possuir mitocôndria, o que propicia o transporte de oxigênio e gás carbônico (BAIN, BARBARA J., 2006). Os eritrócitos são flexíveis, passam facilmente por bifurcações e podem sofrer deformações temporárias sem se romper.

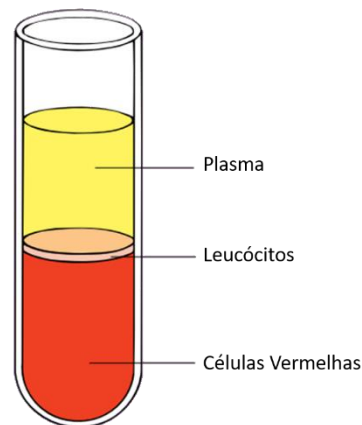
Na Figura 3 é possível observar uma representação das células vermelhas, elas são as mais abundantes do sangue e tem formato de disco bicôncavo com superfície de contato, sua cor vermelha está ligada as proteínas de hemoglobina que são capazes de se ligar as moléculas de oxigênio. Vivem em média 120 dias dentro do corpo e são destruídas no fígado e baço (BERNE et. al., 2004). Um dos métodos para separar as células vermelhas do sangue é a centrifugação com anticoagulante, que sobrepõe camadas por sua densidade, com alta quantidade de plasma, uma placa fina de leucócitos e por fim eritrócitos, como mostrado na Figura 4.

Figura 3: Representação das células vermelhas do sangue.



Fonte: PARGETER, K., 2009.

Figura 4: Sangue com anticoagulante e centrifugado, separado em camadas de plasma, leucócitos e células vermelhas.



Fonte: Adaptada de BAIN, BARBARA J., 2004.

A organização celular inicial após a exposição a ondas de ultrassom em dispositivos acustofluidicos depende do contato entre as células. A captura no plano de levitação, faz com que as células se aglomerem em camadas organizadas, mas fracamente compactadas (COAKLEY, W.T. et al. 2004). Essa organização depende do campo de pressão acústico, concentração de células no volume da cavidade e a combinação de forças de radiação possibilita a modelação de tecidos em microcanais (OLOFSSON, K et al. 2018).

2.4 Análise dos componentes principais (PCA)

A análise dos componentes principais (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.

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 determinada amostra, inicialmente calcula-se o vetor médio, subtrai a média de todos os itens dos dados, calcula a matriz de covariância e 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 dos dados, o grupo de amostras no gráfico são representados 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:

$$\mathbf{M} = \mathbf{LP}^T + \mathbf{E} = l_1 p_1^T + l_2 p_2^T + l_3 p_3^T + \dots + \mathbf{E} \quad (1)$$

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 Matlab, Scilab, linguagem R, Python, Java, C++ dentre outras, possibilitando a personalização dos algoritmos na geração de gráficos de tendência.

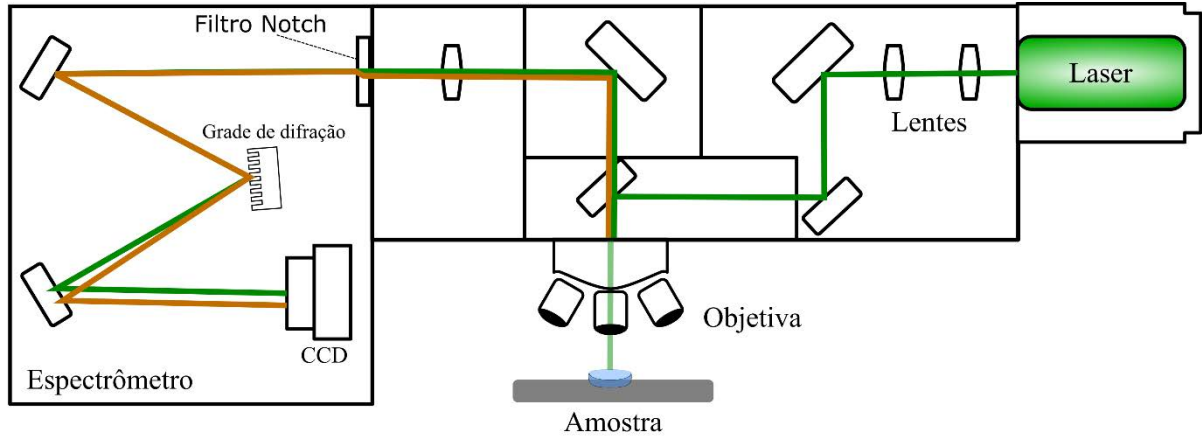
3 METODOLOGIA

3.1 Espectroscopia Raman: LabRam HR Evolution, Horiba

As medidas são feitas de duas formas: (a) pontuais, focalizando o laser de 532 nm na região nuclear das células através de uma lente objetiva de 40X (Olympus IR, 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) 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. Nas mesmas condições, os espectros das células são medidos na faixa espectral de 300-1800 cm^{-1} . A Figura 5 mostra o caminho da luz laser que é separada por lentes, parte espalha e captura as vibrações da amostra que passa pelo espectrômetro do microscópio confocal Raman.

Figura 5: Representação da configuração do microscópio confocal Raman



Fonte: Autor, 2021.

3.2 Plataforma Integrada de opto-acustofluídica

Tabela 1: Equipamentos utilizados e suas funções.

Descrição	Função	Quantidade
LabRam HR Evolution, Horiba	Microscopia confocal Raman	1
AFG1022, Tektronix Inc	Gerador de Funções	1
TDS 50 2012C, Tektronix Inc	Osciloscópio	1
Dispositivo Acustofluídico	Levitar e aprisionar partículas	1
Computador	Tratar e analisar dados	1

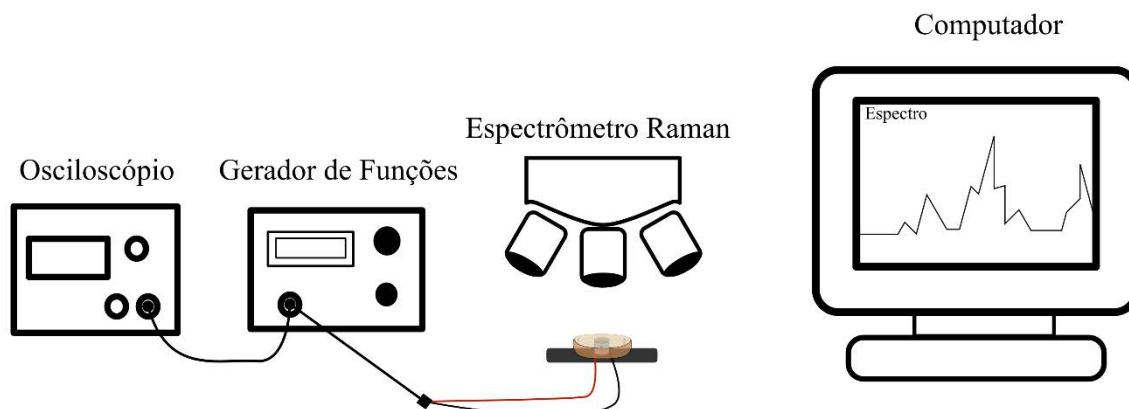
Fonte: Autor, 2021.

O dispositivo, foi idealizado pelo GAF e é composto por duas entradas para canais que levam a uma microcavidade que funciona como biorreator, a propagação da onda gerada pelo piezoelétrico reflete e gera 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 obtemos os resultados numéricos que são estudados para avaliar a convergência das simulações, assim obtemos como produto o raio da cavidade, a profundidade da cavidade e por fim calcula-se a ressonância para identificar a frequência que maximiza a densidade de energia.

O GNFI em colaboração com o GAF, desenvolveu uma plataforma multifuncional consistindo em um dispositivo de acustofluidica para levitação de células integrado ao sistema de espectroscopia Raman para monitoramento dos parâmetros bioquímicos de células em tempo real. A plataforma integrada de opto-acustofluidica, consiste quando o dispositivo de acustofluidica é conectado ao gerador de funções e monitorado em paralelo com o osciloscópio e depois alocado ao microscópio confocal Raman (LabRam HR Evolution, Horiba, Japão) como mostrado na Figura 6 e ajustado com partículas de poliestireno. O dispositivo contém uma microcavidade cilíndrica que forma uma onda de ultrassom estacionária gerada por um atuador piezoelétrico operando em uma frequência entre 1 a 5 MHz. As ondas de ultrassom exercem uma força de radiação acústica sobre as células que dessa forma são posicionadas na região central da microcavidade e se mantêm paradas sem contato com o substrato do dispositivo. O aprisionamento e levitação de células possibilita a avaliação dos componentes biomoleculares das células, realizada através da análise dos espectros Raman, que serão obtidos usando um microscópio confocal (LabRam HR Evolution). As medidas são feitas focalizando o laser de 532 nm (ou 785 nm) na região das células através de uma lente objetiva de 40X (Olympus IR, ou 60X). Serão medidos os espectros das células na faixa espectral de 300-1800 cm^{-1} .

Figura 6: Esquema ilustrativo da plataforma integrado de opto-acustofluidica.



Fonte: Autor, 2021.

3.2.1 Microfabricação do Dispositivo

Na microfabricação, imprimiu-se duas secções do dispositivo com resina fotossensível, a parte superior com dois canais levando a microcavidade e a parte inferior com espaço de alocação para o piezoelétrico e depois foi higienizada. Após a limpeza realizamos o processo de cura, que consiste em aumentar o grau de dureza do material através de raios ultravioletas de tal modo que não resseque ao ponto de quebrar, esse método auxilia na propagação de ondas acústicas no sistema.

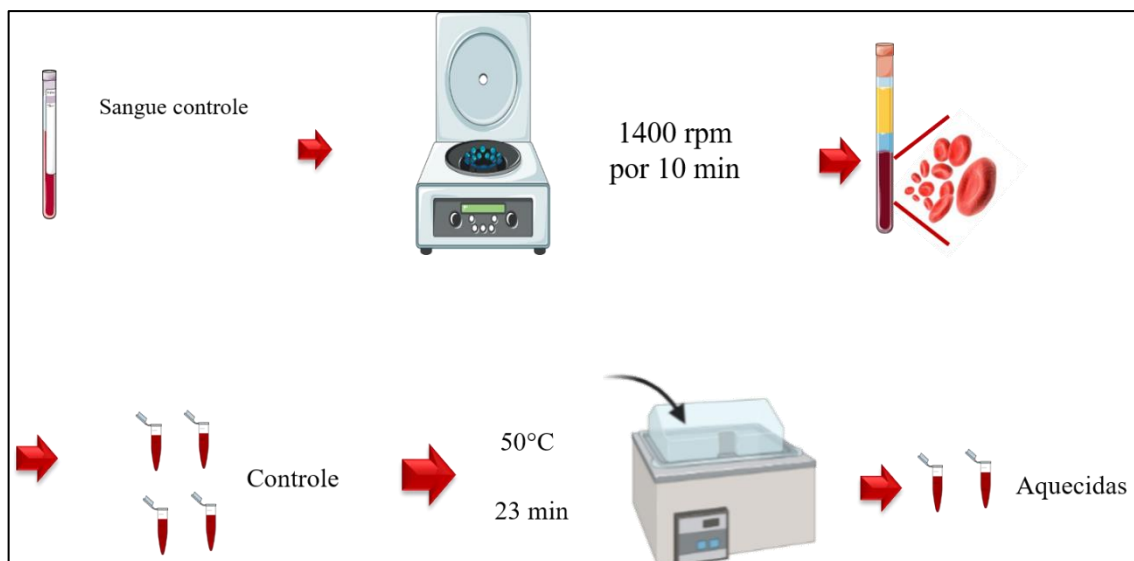
Inicia-se a montagem do dispositivo, na parte de cima colocamos uma lente circular como tampa da cavidade acústica e cola-se em sua base o piezoelétrico preenchendo seus arredores com gel de ultrassom, junta-se as partes impressas e finaliza-se a confecção do dispositivo.

A microcavidade do dispositivo tem 4 mm de diâmetro com 250 μm de altura, sendo o aprisionamento de células vermelhas em uma altura preferencial próxima a 133 μm . A busca da frequência de ressonância do dispositivo é realizada com micropartículas de poliestireno (10 μm) e através do gerador de funções varremos uma faixa de frequências próximas da simulada no Comsol Multiphysics até encontrarmos a frequência de maior aprisionamento.

3.3 Coleta do Material

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 (ácido etilenodiamino tetra-acético). Realizou-se o procedimento de aquecimento por 23 min à 50 °C, seguindo o protocolo estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em um dos grupos. Para separação dos eritrócitos do plasma, as amostras foram centrifugadas à 1400 rpm por 10 minutos, em temperatura ambiente, no Grupo de Nanofotônica e Imagem (GNFI) do Instituto de Física da UFAL. 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, o processo de diferenciação e separação das células vermelhas do sangue está ilustrado na Figura 7.

Figura 7: Processo de coleta e separação do material para análise na Plataforma Integrada de opto-acustofluidica.



Fonte: Autor, 2021.

3.4 Análise dos dados: PCA

No computador normalizamos todos os dados espectrais por sua área e inserimos no algoritmo de PCA, este agrupa os dados em uma tabela de amostras versus variáveis. Ao transpormos a tabela e obter sua covariância, desvio padrão e médias, o algoritmo determina os autovalores e autovetores nos eixos de tendência dados como principais componentes. A análise é aplicada e como produto gera os *scores* e os *loadings* que servem para produzir a figura de dispersão das amostras considerando suas intensidades e banda espectral. Os *scores* são os resultados relacionados as intensidades das amostras no espaço das componentes geradas e os *loadings* as variáveis.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

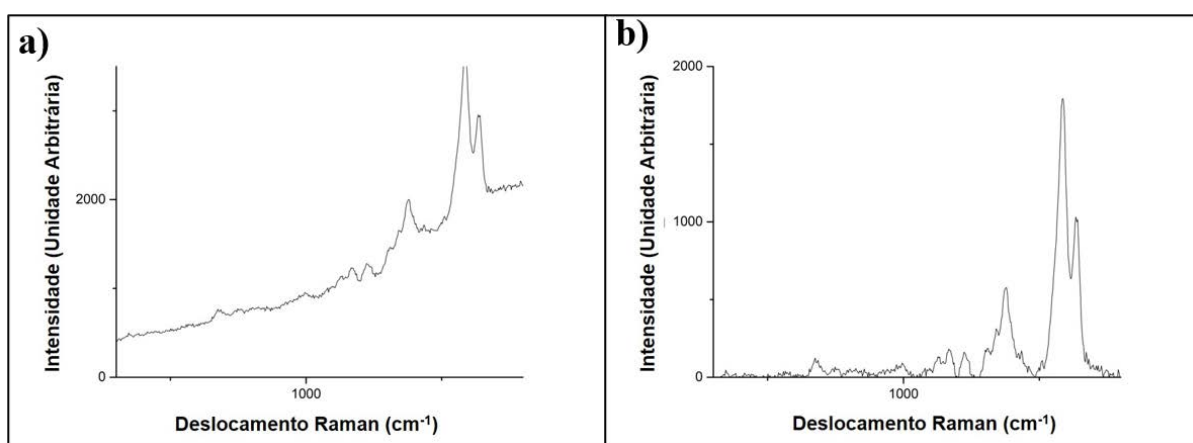
Nesta seção iremos apresentar os resultados obtidos utilizando a bioespectroscopia Raman de células normais e aquecidas.

4.1 Pré-processamento e Análise

Na bioespectroscopia de células vermelhas o comprimento de onda de excitação influencia na análise das amostras, pois a maioria das estruturas biomoleculares possuem emissões na região ultravioleta ou visível. Assim, a espectroscopia de fluorescência dessas moléculas se sobrepõe ao espectro Raman como mostrado na Figura 8(a). (BUTLER, H. J. et

al., 2016). Em nosso estudo o equipamento LabHam Evol Horiba, utiliza o laser de 532 nm, ou seja, região visível. Este problema pode ser resolvido através de algoritmos de subtração de ruídos e do background de fluorescência contido nos espectros (SILVA, E. C. O., 2019). Um desses métodos é o *baseline* pelo qual traçamos ponto a ponto retas tangentes aos mínimos próximos aos picos de intensidade e subtraímos os espectros de fundo de intensidade ao caminho traçado no espectro, assim retira o ruído e a fluorescência, mantendo as composições bioquímicas das amostras biológicas como é mostrado na Figura 8(b). Após a aplicação do baseline, normalizamos os espectros por sua área.

Figura 8: (a) espectro Raman obtido com ruídos e fluorescência. (b) espectro Raman após tratamento com o baseline.

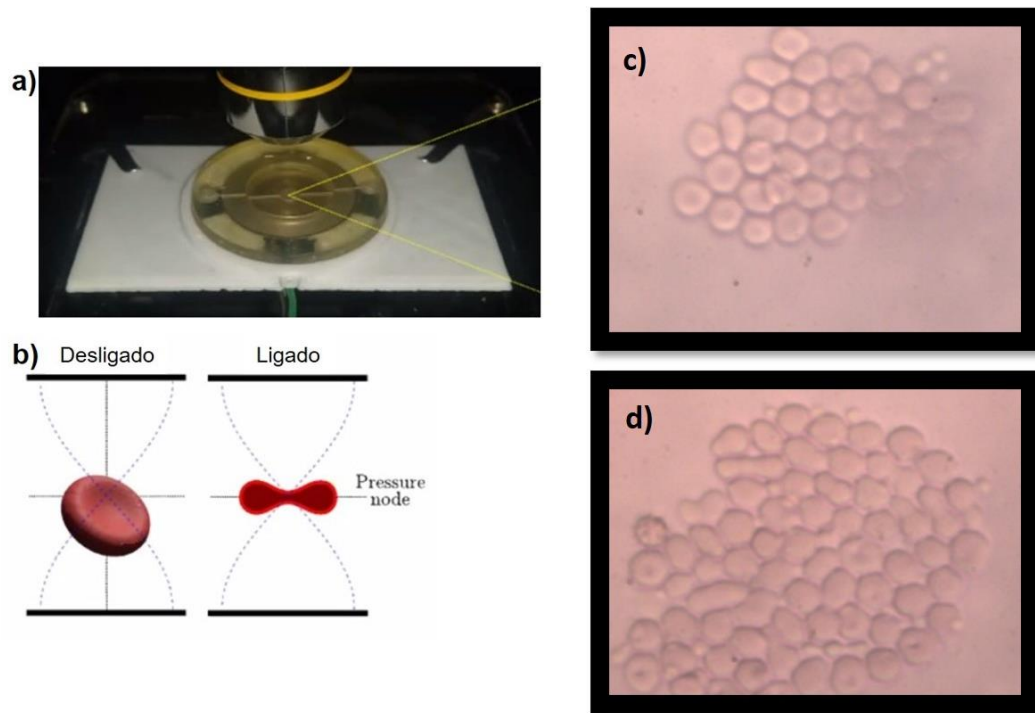


Fonte: Autor, 2021.

4.2 Bioespectroscopia das Células Vermelhas

A figura 9(a) mostra a fotografia digital do dispositivo que utilizamos acoplado ao microscópio confocal. O dispositivo é alimentado com um sinal senoidal, de frequência próximo a 3 MHz e tensão pico-a-pico 5 volts. Após um período de estabilização de todo o sistema (cerca de 5 min), com auxílio de uma pipeta foi injetado um volume de 2 μL de PBS com uma concentração de aproximadamente 162,5 $\mu\text{g/mL}$ de células vermelhas. Após um período, entre 5 e 10 minutos, para que o fluxo estabilize no interior do dispositivo, as células são aprisionadas na região central da cavidade devido ao regime ultrassônico através de ondas estacionárias que exercem a força de radiação acústica sobre as células, tal como ilustrado na Figura 9(b). As figuras 9(c) e (d) mostram as imagens digital das células estudadas ao longo deste projeto. A figura 9(c) apresenta as células vermelhas normais e os aspectos morfológicos estão dentro do esperado, elas são bicôncavas e arredondadas. A figura 9(d) apresenta as células aquecidas por 23 minutos a uma temperatura de 50°C. Como pode ser observado as células vermelhas aquecidas são morfológicamente diferentes das células normais. Estudos publicados na literatura demonstram que o aquecimento faz com que as células vermelhas reduzam seu volume, por desidratarem e terem suas membranas afetadas (JAFERZADEH, K, et al., 2019).

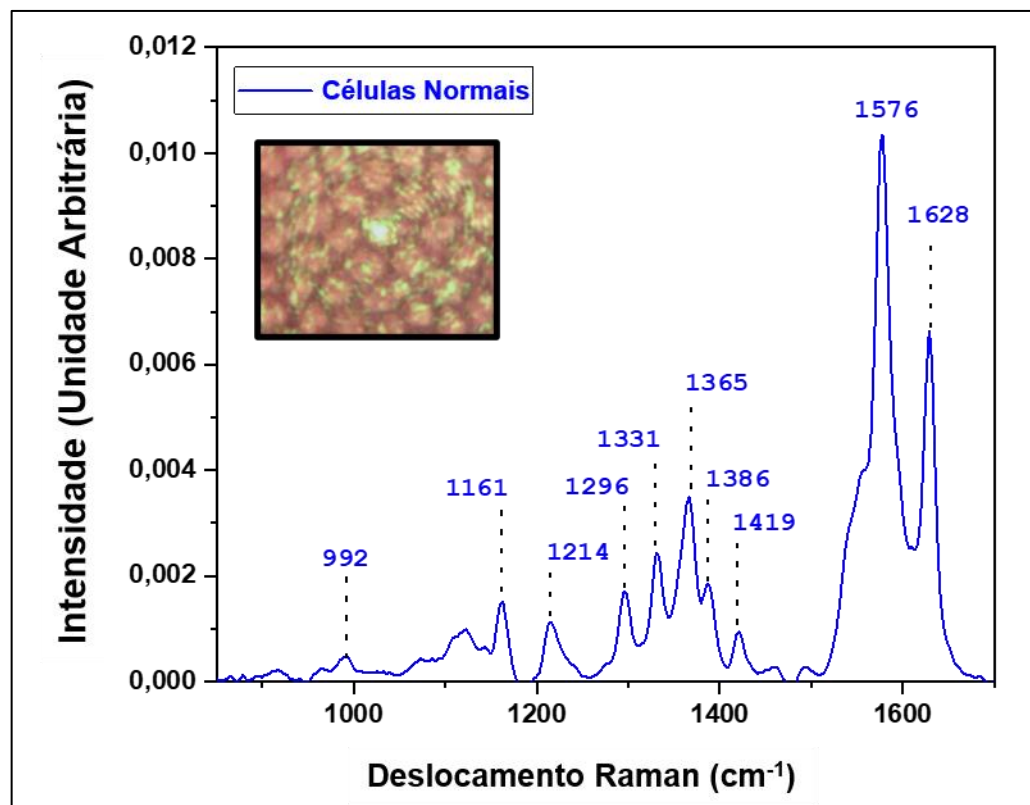
Figura 9: (a) Fotografia do sistema integrado Raman-acustofluídica. (b) Representação do aprisionamento de uma única célula devido a força de radiação acústica, desligado e ligado; (c) Imagem do aprisionamento de células vermelhas normais dentro da microcavidade do dispositivo; (d) Imagem do aprisionamento de células vermelhas que foram aquecidas por 50° C durante 23 min.



Fonte: Autor, 2021.

A Figura 10 mostra o espectro Raman normalizado de células vermelhas normais (sem aquecimento) e tratadas na faixa de 300-1800 cm^{-1} sob excitação de laser de 532 nm. O *inset* na figura demonstra a capacidade de realizar medidas “*single cell*”. Como esperado, os picos Raman observados são predominantemente originados da Hemoglobina (Hb) intracelular, lipídios da membrana e outras proteínas. A Figura 10 inclui bandas correspondentes às vibrações de deformação do pirrole (681 cm^{-1} e 754 cm^{-1}), a deformação CH de metino (1307 e 1228 cm^{-1}), a região de alongamento do anel de pirrole (1300-1400 cm^{-1}) e na região do marcador de tamanho do núcleo (1500-1700 cm^{-1}). As atribuições da banda inteira, as coordenadas da banda local e os componentes celulares obtidos de glóbulos vermelhos sob excitação a laser de 532 nm estão resumidos na Tabela 2.

Figura 10: Intensidade do espectro médio em relação ao deslocamento Raman das células vermelhas normais.



Fonte: Autor, 2021.

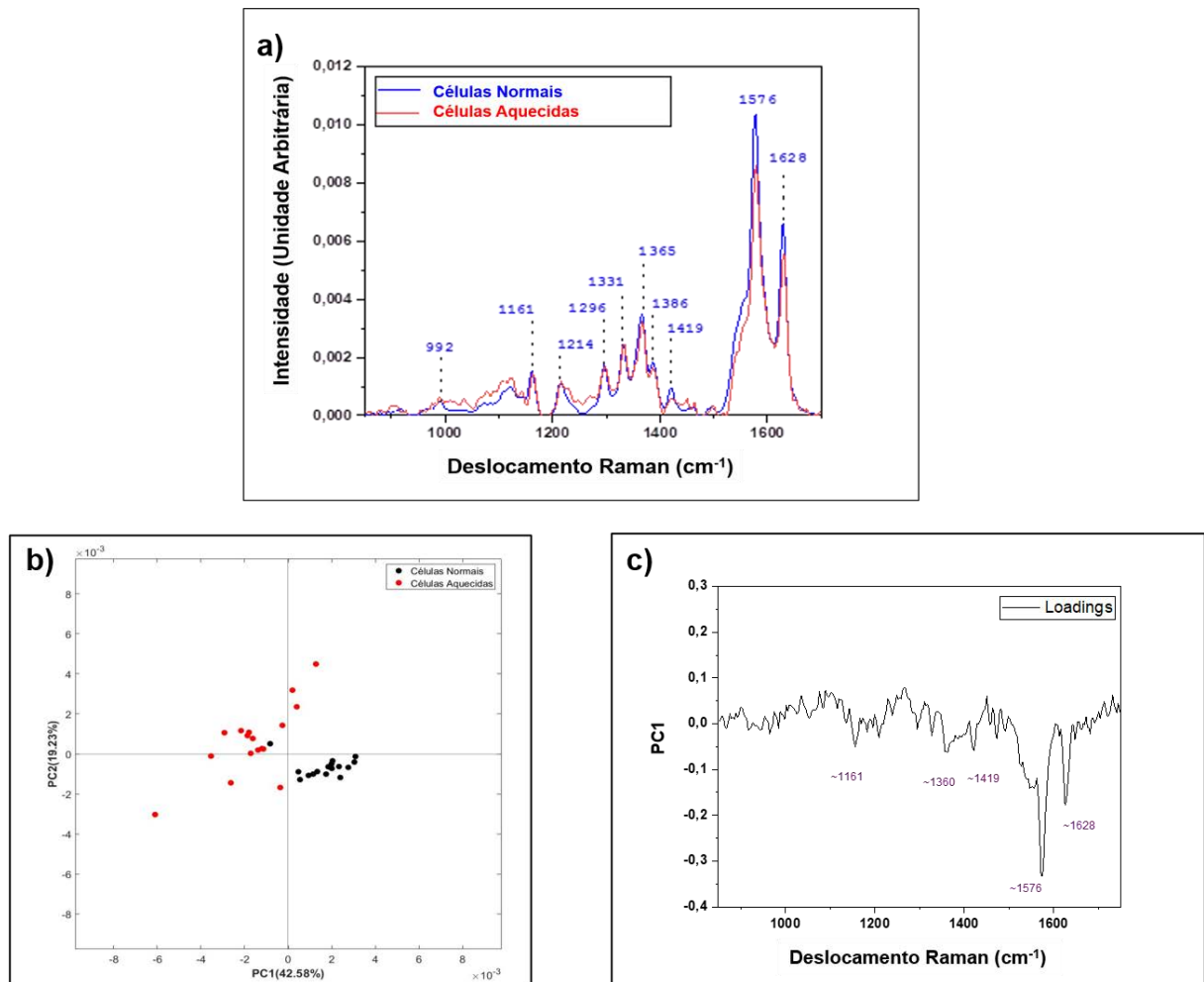
Tabela 2: Posição da banda, atribuição e coordenada local para células vermelhas normais e aquecidas, obtidos usando uma excitação Raman de 532 nm. A identificação dos modos vibracionais está de acordo com a referência Rusciano e De Luca em 2008.

Posição de Banda Células Normais	Posição de Banda Células Aquecidas	Coordenada Local
992 cm ⁻¹		$\nu(\text{C}_{\beta}\text{C}_1)_{\text{asym}}$
1161 cm ⁻¹	1162 cm ⁻¹	$\nu(\text{pyrhal f-ring})_{\text{asym}}$
1214 cm ⁻¹	1215 cm ⁻¹	$\delta(\text{C}_m\text{H})$
1296 cm ⁻¹	1298 cm ⁻¹	$\delta(\text{C}_m\text{H})$
1331 cm ⁻¹	1331 cm ⁻¹	$\nu(\text{pyrhal f-ring})_{\text{sym}}$
1365 cm ⁻¹	1366 cm ⁻¹	$\nu(\text{pyrhal f-ring})_{\text{sym}}$
1386 cm ⁻¹	1387 cm ⁻¹	$\nu(\text{pyrquarter-ring})$
1419 cm ⁻¹	1421 cm ⁻¹	$\nu(\text{C}_{\alpha}\text{C}_m)_{\text{asym}}$
1576 cm ⁻¹	1578 cm ⁻¹	$\nu(\text{C}_{\alpha}\text{C}_m)_{\text{asym}}$
1628 cm ⁻¹	1629 cm ⁻¹	$\nu(\text{C}_{\alpha}\text{C}_m)_{\text{asym}}$

Fonte: Autor, 2021

A Figura 11 apresenta os espectros Raman médios normalizados do grupo controle (normais) em relação ao grupo de células aquecidas. Há uma coincidência notável entre o padrão de intensidades e frequências vibracionais relativas para o grupo controle e aquecido. No entanto, pequenos deslocamentos espectrais e mudanças de intensidade relativa são evidentes para algumas regiões quando os espectros Raman médios são comparados em detalhes. O espectro Raman médio em azul representa a média de um conjunto de dados com 16 amostras de células vermelhas normais e o espectro Raman em vermelho representa a média de um conjunto de dados com 16 amostras de células vermelhas aquecidas. Essas amostras foram coletadas na região central do dispositivo e tratadas conforme a seção 4.1.

Figura 11: (a) Relação entre os espectros médios das células vermelhas normais e aquecidas, evidenciando os picos de intensidade correspondente as bandas espectrais; (b) Dispersão das amostras nas duas primeiras componentes principais, considerando apenas duas dimensões do domínio transformado; (c) Variação da primeira componente principal com o deslocamento Raman.



Fonte: Autor, 2021

Como demonstrado acima na Figura 11(a), ambos os espectros Raman contêm informações bioquímicas ricas sobre a assinatura molecular. No entanto, a inspeção visual não é suficiente para resolver pequenas diferenças complexas nos espectros Raman. Nesse contexto, usamos métodos multivariados como o PCA para realizar comparação e classificação dos dados obtidos, aplicado a uma matriz de 32 amostras por 513 linhas espectrais. A análise foi realizada nos dados espectrais Raman pré-processados de ambos os glóbulos vermelhos de controle e tratados. A Figura 11(b) mostra o gráfico de dispersão dos primeiros dois componentes principais considerando apenas duas dimensões do domínio transformado, isto é, PC1(42,8%)

e PC2 (19,23%). Como pode ser observado, o gráfico de pontuação de PC1 e PC2 facilmente distingue células de controle (pontos pretos) das células aquecidas (pontos vermelhos), indicando diferenças espectrais significativas entre elas.

Para determinar a capacidade de distinção do PCA e identificação de características significantes do espectro Raman, o comportamento dos *loadings* mostrado na Figura 11(c), revela a região dos espectros Raman onde a diferença entre os grupos celulares normais e aquecidos é maior. Observe que há uma correlação negativa nas bandas 1161, 1360, 1419, 1576 e 1628 cm^{-1} , que corresponde aos picos mais alterados pelo aquecimento.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A plataforma de opto-acustofluídica é um potencial equipamento para diagnósticos de hemopatias como anemia, leucemia e linfomas. Além de possibilitar maior precisão e velocidade no aferimento das medidas através de espectroscopia Raman, não utiliza reagentes caros e realiza a obtenção de dados de forma precisa e não invasiva. No dispositivo a relação entre a diferença de potencial aplicada e a energia associada a ressonância para o aprisionamento foi simulada pelo software COMSOL MULTIPHYSICS pelo GAF e constatou a existência de um plano preferencial de aprisionamento próximo a 133 micrômetros de altura na cavidade ressonante. Inicialmente constatamos esse aprisionamento com partículas de poliestireno e averiguamos a frequência que ocorre o maior aprisionamento de partículas, próximo a 3 MHz com uma tensão aplicada de 5V pico a pico.

Os dados obtidos por espectroscopia Raman em conjunto com o dispositivo apresentaram diferença nos espectros que foram acentuadas através do algoritmo de PCA, assim como mostrado na Figura 11, há uma distinção das células vermelhas normais (pontos pretos) para as células vermelhas aquecidas (pontos vermelhos). Assim conseguimos distinguir células alteradas de células normais 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.

Nosso estudo possibilita no futuro realizar a investigação da causa da morte celular de células malignas e saudáveis 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. Como também monitorar a influência das ondas acústicas na internalização das nanopartículas luminescentes nas células, capazes de fornecer imagens de fluorescência; detecção subcelular; medição em tempo real da temperatura intracelular e aquisição de imagens de fluorescência de célula única. Em particular, há perspectiva de monitorar as mudanças de temperatura de uma única célula em terapias medicamentosas.

REFERÊNCIAS

- AUNER, G.W.; KOYA, S.K.; HUANG, C.; BROADBENT, B.; TREXLER, M.; AUNER, Z.; ELIAS, A.; MEHNE, K.C.; BRUSATORI, M.A. APPLICATIONS OF RAMAN SPECTROSCOPY IN CANCER DIAGNOSIS. *CANCER METASTASIS REV.* 2018 DEC;37(4):691-717. DOI: 10.1007/S10555-018-9770-9.
- BAIN, BARBARA J. A BEGINNER'S GUIDE TO BLOOD CELLS. WILEY-BLACKWELL. 2ND ED. 2004. P. 2.
- BAIN, BARBARA J. BLOOD CELLS A PRACTICAL GUIDE. WILEY-BLACKWELL. 4ª EDIÇÃO. LONDRES. 2006. P. 65.
- BECKER, H.; LOCASCIO, L.E. POLYMER MICROFLUIDIC DEVICES. *TALANTA* 2002, 56, 267–287.
- BERNE R.M. ET AL. FISILOGIA. 5ª ED. RIO DE JANEIRO: ELSEVIER, (2004).
- BRANDT, E.H. ACOUSTIC PHYSICS: SUSPENDED BY SOUND. *NATURE*, LONDON, V.413,P. 474-475, 2001.
- BRO, RASMUS; SMILDE, K. AGE. PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS. *ANALYTICAL METHODS*, V. 6, P. 2812–1052831, 2014.
- BROWN, STEVEN D.; WALCZAK, BEATA; TAULER, ROMÁ. COMPREHENSIVE CHEMOMETRICS: CHEMICAL AND BIOCHEMICAL DATA ANALYSIS. 1. ED. AMSTERDAM: ELSEVIER, 2009.
- BUTLER, H. J. ET AL. USING RAMAN SPECTROSCOPY TO CHARACTERIZE BIOLOGICAL MATERIALS. *NATURE PROTOCOLS*, V. 11, N. 4, P. 664, 2016. ISSN 1750-2799.).
- CHONG, Z.Z.; TAN, S.H.; GANAN-CALVO, A.M.; TOR, S.B.; LOH, N.H.; NGUYEN, N.T. ACTIVE DROPLET GENERATION IN MICROFLUIDICS. *LAB CHIP* 2016, 16, 35–58.
- COAKLEY, W.T.; BAZOU, D.; MORGAN, J.; FOSTER, G.A.; ARCHER, C.W.; POWELL, K.; BORTHWICK, K.A.; TWOMEY, C.; BISHOP, J. CELL-CELL CONTACT AND MEMBRANE SPREADING IN AN ULTRASOUND TRAP. *COLLOIDS SURF. B BIOINTERFACES* 2004, 34, 221–230.
- D. J. COLLINS, B. MORAHAN, J. GARCIA-BUSTOS, C. DOERIG, M. PLEBANSKI, AND A. NEILD, TWO-DIMENSIONAL SINGLECELL PATTERNING WITH ONE CELL PER WELL DRIVEN BY SURFACE ACOUSTIC WAVES, *NAT. COMMUN.* 6, 8686 (2015).

D.JAQUE, A.E., NANOPARTICLES FOR PHOTOTHERMAL THERAPIES. NANOSCALE, 2014. 6: P.9494-9530.

DE LUCA, A.; RUSCIANO, G.; CIANCIA, R.; MARTINELLI, V.; PESCE, G.; ROTOLI, B.; SELVAGGI, L. AND SASSO, A. "SPECTROSCOPICAL AND MECHANICAL CHARACTERIZATION OF NORMAL AND THALASSEMIC RED BLOOD CELLS BY RAMAN TWEEZERS," OPT. EXPRESS 16, 7943-7957 (2008).

DING, X.; LIN, S.C.S.; KIRALY, B.; YUE, H.; LI, S.; CHIANG, K.; SHI, J.; BENKOVIC, S.J.; HUANG, T.J. ON-CHIP MANIPULATION OF SINGLE MICROPARTICLES, CELLS, AND ORGANISMS USING SURFACE ACOUSTIC WAVES. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, WASHINGTON, V. 109, P. 11105-11109, 2012.

E. K. SACKMANN, A. L. FULTON, AND D. J. BEEBE, THE PRESENT AND FUTURE ROLE OF MICROFLUIDICS IN BIOMEDICAL RESEARCH, NATURE 507, 181 (2014).

EVANDER, M.; JOHANSSON, L.; LILLIEHORN, T.; PISKUR, J.; LINDVALL, M.; JOHANSSON, S.; ALMQVIST, M.; LAURELL, T.; NILSSON, J. *ANALYTICAL CHEMISTRY* 2007, 79, 2984.

FERREIRA JR., F.M. INVESTIGAÇÃO NUMÉRICA DE LEVITAÇÃO ACÚSTICA DE CAMPO PRÓXIMO, TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO- UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - MG, FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA, , 2018.

FRIEND, J. YEO, L.Y. MICROSCALE ACOUSTOFLUIDICS: MICROFLUIDICS DRIVEN VIA ACOUSTICS AND ULTRASONICS. REVIEW MODERN PHYSICS, V. 83, P. 647-704, 2011.

GALE, B. K. ET AL. A REVIEW OF CURRENT METHODS IN MICROFLUIDIC DEVICE FABRICATION AND FUTURE COMMERCIALIZATION PROSPECTS. INVENTIONS, MULTIDISCIPLINARY DIGITAL PUBLISHING INSTITUTE, V. 3, N. 3, P. 60, 2018.

GARCÍA SOLÉ, J; BAUSÁ, L.E. AND JAQUE. D. AN INTRODUCTION TO THE OPTICAL SPECTROSCOPY OF INORGANIC SOLIDS. 2005. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID, MADRID, SPAIN.

HENRIK BRUSS, THEORETICAL MICROFLUIDICS, MIC – DEPARTMENT OF MICRO AND NANOTECHNOLOGY TECHNICAL UNIVERSITY OF DENMARK, P.1-5, 2008.

- J. MIQUEL, P.R.L, K.G. BENSCH, H. ATLAN, EFFECTS OF TEMPERATURE ON THE LIFE SPAN, VITALITY AND FINE STRUCTURE OF DROSOPHILA MELANOGASTER. MECH. AGEING. DEV., 1976. 5: P.347-370.
- J. S. JEONG, J. LEE, C. LEE, S.-Y. TEH, A. LEE, K. SHUNG, PARTICLE MANIPULATION IN A MICROFLUIDIC CHANNEL USING ACOUSTIC TRAP. BIOMEDICAL MICRODEVICES (2011), 13, 779.
- JAFERZADEH, K.; SIM, M.; KIM, N. ET AL. QUANTITATIVE ANALYSIS OF THREE-DIMENSIONAL MORPHOLOGY AND MEMBRANE DYNAMICS OF RED BLOOD CELLS DURING TEMPERATURE ELEVATION. SCI REP 9, 14062 (2019). [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/S41598-019-50640-Z](https://doi.org/10.1038/s41598-019-50640-z).
- JEONG, J. S.; LEE, J.; LEE, C.; TEH, S.Y.; LEE, A.; SHUNG, K. *BIOMEDICAL MICRODEVICES* 2011, 13, 779.
- JUNQUEIRA. L.C; CARNEIRO. J. HISTOLOGIA BÁSICA. ED. GUANABARA KOOGAN 11º EDIÇÃO. RIO DE JANEIRO. 2007.
- KUMAR, S.; WITTMANN, C.; HEINZLE, E. *BIOTECHNOLOGY LETTERS* 2004, 26, 1.
- LEE, C. P.; WANG, T.G. ACOUSTIC RADIATION PRESSURE. JOURNAL OF THE ACOUSTICAL SOCIETY OF AMERICA, V. 94, P. 1099-1109,1993.
- 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 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: [HTTP://DX.DOI.ORG/10.33448/RSD-V10I14.21657](http://dx.doi.org/10.33448/RSD-V10I14.21657).
- M. ANTFOLK AND T. LAURELL, CONTINUOUS FLOW MICROFLUIDIC SEPARATION AND PROCESSING OF RARE CELLS AND BIOPARTICLES FOUND IN BLOOD - A REVIEW, ANAL. CHIM. ACTA 965, 9 (2017).
- M. OHLIN, I. IRANMANESH, A. E. CHRISTAKOU, AND M. WIKLUND, TEMPERATURE-CONTROLLED MPA-PRESSURE ULTRASONIC CELL MANIPULATION IN A MICROFLUIDIC CHIP, LAB CHIP 15, 3341 (2015).
- MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H.M. MINIATURIZED TOTAL CHEMICAL-ANALYSIS SYSTEMS-A NOVEL CONCEPT FOR CHEMICAL SENSING. SENS. ACTUATORS B CHEM. 1990, 1, 244–248.
- MARIO D'ACUNTO, RAFFAELE GAETA, RODOLFO CAPANNA & ALESSANDRO FRANCHI. CONTRIBUTION OF RAMAN SPECTROSCOPY TO DIAGNOSIS AND

GRADING OF CHONDROGENIC TUMORS SCIENTIFIC REPORTS; (2020) 10:2155;
[HTTPS://DOI.ORG/10.1038/S41598-020-58848-0](https://doi.org/10.1038/s41598-020-58848-0)

MENDES, M. FABRICAÇÃO DE SENSORES MICROFLUÍDICOS UTILIZANDO UMA IMPRESSORA 3D, MONOGRAFIA- UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - SP, INSTITUTO DE FÍSICA GLEB WATAGUIN, 2014.

MIGUEL GHEBRÉ RAMÍREZ-ELÍAS & FRANCISCO JAVIER GONZÁLEZ, RAMAN SPECTROSCOPY FOR IN VIVO MEDICAL DIAGNOSIS. DOI: 10.5772/INTECHOPEN.72933

MOISEYENKO, RAYISA P. AND HENRIK BRUUS. WHOLE-SYSTEM ULTRASOUND RESONANCES AS THE BASIS FOR ACOUSTOPHORESIS IN ALL-POLYMER MICROFLUIDIC DEVICES. PHYSICAL REVIEW APPLIED 11 (2018): 014014.

MOOR, K., OHTANI, K., MYRZAKOZHA, D., ZHANSEKENOVA, O., ANDRIANA, B. B., & SATO, H. (2014). ANALYSIS OF VIRUS INFECTED CELL BY RAMAN SPECTROSCOPY AND TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY. BIOMEDICAL VIBRATIONAL SPECTROSCOPY VI: ADVANCES IN RESEARCH AND INDUSTRY.

MOOR, K.; TERADA, Y.; TAKETANI, A.; HIROKO, M.; OHTANI, K.; SATO, H. EARLY DETECTION OF VIRUS INFECTION IN LIVE HUMAN CELLS USING RAMAN SPECTROSCOPY. J. OF BIOMEDICAL OPTICS, 23(9), 097001 (2018)

NILSSON, A.; PETERSSON, F.; JÖNSSON, H. ; LAURELL, T. *LAB ON A CHIP* 2004, 4, 131;

NOTINGHER, I.; VERRIER, S.; ROMANSKA, H.; BISHOP, A. E.; POLAK, J. M.; HENCH, L. L.. "IN SITU CHARACTERISATION OF LIVING CELLS BY RAMAN SPECTROSCOPY", JOURNAL OF SPECTROSCOPY, VOL. 16, ARTICLE ID 408381, 9 PAGES, 2002. [HTTPS://DOI.ORG/10.1155/2002/408381](https://doi.org/10.1155/2002/408381).

NUÑEZ, P. YSABEL P. SÍNTESES E CARACTERIZAÇÕES ÓPTICA E ESTRUTURAL DE NANOPARTÍCULAS DE LAF3:YB3+/HO3+ E LAF3:YB3+/TM3+ E CERÂMICAS TRANSPARENTES DE Y2O3:EU3+ E Y2O3:TM3+. 2016. 146 F. TESE (DOUTORADO EM FÍSICA) – INSTITUTO DE FÍSICA, UNIVERSIDADE DE ALAGOAS, MACEIÓ, 2016.

OLOFSSON, K.; HAMMARSTRÖM, B.; WIKLUND, M. ULTRASONIC BASED TISSUE MODELLING AND ENGINEERING. MICROMACHINES 2018, 9, 594. [HTTPS://DOI.ORG/10.3390/MI9110594](https://doi.org/10.3390/mi9110594).

OPILIK, L.; SCHMID, T.; ZENOBI, R. MODERN RAMAN IMAGING: VIBRATIONAL SPECTROSCOPY ON THE MICROMETER AND NANOMETER SCALES. ANNU. REV. ANAL. CHEM. 2013. 6:379–98

PARGETER, K. BLOOD CELLS AND BACTERIA. 2009. Disponível em: <https://br.freepik.com/fotos-gratis/3d-rendem-de-globulos-e-bacterias-em-uma-arteria_936788.htm>. Acesso em: 03 dezembro de 2021

PEREIRA, R.M.F.; MARTIN, A.A.; TIERRA-CRIOULO, C.J.; SANTOS, I.D.A.O. - DIAGNOSIS OF SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF HUMAN SKIN BY RAMAN SPECTROSCOPY. SPIE 2004; 5326:106-112.

ROCHA, U., ET AL., SUBTISSUE THERMAL SENSING BASED ON NEODYMIUM-DOPED LAF₃ NANOPARTICLES, ACS NANO, 2013.

RUSCIANO, G.; DE LUCA, A.C.; PESCE, G.; SASSO, A. RAMAN TWEEZERS AS A DIAGNOSTIC TOOL OF HEMOGLOBIN-RELATED BLOOD DISORDERS. SENSORS 2008, 8, 7818-7832. [HTTPS://DOI.ORG/10.3390/S8127818](https://doi.org/10.3390/S8127818).

SATO, HIDETOSHIA; ISHIGAKI, MIKAB; TAKETANI, AKINORIA; ANDRIANA, BIBIN B. RAMAN SPECTROSCOPY AND ITS USE FOR LIVE CELL AND TISSUE ANALYSIS. BIOMEDICAL SPECTROSCOPY AND IMAGING, VOL. 7, NO. 3-4, PP. 97-104, 2018

SHI, J.; AHMED, D.; MAIO, X.; LIN, S.; LAWIT, A.; HUANG, T. ACOUSTIC TWEEZERS: PATTERNING CELLS AND MICROPARTICLES USING STANDING SURFACE ACOUSTIC WAVES (SAW). LAB ON A CHIP, V.9, P. 2890-2895, 2009.

SILVA, E. C. O. AVALIAÇÃO IN VITRO DE ALTERAÇÕES BIOMECÂNICAS E BIOQUÍMICAS INDUZIDAS POR FÁRMACOS EM CÉLULAS UTILIZANDO MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA E ESPECTROSCOPIA RAMAN. TESE DE DOUTORADO AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, 2019.

SILVA, G. T. ACOUSTIC RADIATION FORCE AND TORQUE ON AN ABSORBING COMPRESSIBLE PARTICLE IN NA INVISCID FLUID. THE JOURNAL OF THE ACOUSTICAL SOCIETY OF AMERICA (2014), 136, 2405.MODELO PROPEP/UFAL;

SILVA, G. T., LOPES, J. H., LEÃO-NETO, J. P., NICHOLS, M. K., & DRINKWATER, B. W. (2019). PARTICLE PATTERNING BY ULTRASONIC STANDING WAVES IN A RECTANGULAR CAVITY. PHYSICAL REVIEW APPLIED, 11(5), [054044].

SILVA, G.T.; *THE JOURNAL OF THE ACOUSTICAL SOCIETY OF AMERICA* 2014, 136, 2405.

SISHAN CUI, SHUO ZHANG, AND SHUHUA YUE RAMAN SPECTROSCOPY AND IMAGING FOR CANCER DIAGNOSIS. JOURNAL OF HEALTHCARE ENGINEERING. VOLUME 2018, ARTICLE ID 8619342, 11 PAGES. [HTTPS://DOI.ORG/10.1155/2018/8619342S](https://doi.org/10.1155/2018/8619342)

SPENGLER, J. F., JEKEL, M., CHRISTENSEN, K. T., ADRIAN, R. J., HAWKES, J. J., & COAKLEY, W. T. (2000). OBSERVATION OF YEAST CELL MOVEMENT AND AGGREGATION IN A SMALL-SCALE MHZ-ULTRASONIC STANDING WAVE FIELD. BIOSEPARATION, 9(6), 329–341. [HTTPS://DOI.ORG/10.1023/A:1011113826753](https://doi.org/10.1023/A:1011113826753)

T. LAURELL, F.P.; NILSSON, A. CHIP INTEGRATED STRATEGIES FOR ACOUSTIC SEPARATIONS AND MANIPULATIONS OF CELLS AND PARTICLES. CHEMICAL SOCIETY REVIEWS, V. 36, P.492-506, 2007.

TEHRANIROKH, M.; KOUZANI, A. Z.; FRANCIS, P. S.; KANWAR, J. R. *BIOMICROFLUIDICS* 2013, 7, 051502.

TORR, G.R. THE ACOUSTIC RADIATION FORCE. AMERICAN JOURNAL OF PHYSICS, V. 52, P. 402-408, 1984.

TSAO, C.-W. POLYMER MICROFLUIDICS: SIMPLE, LOW-COST FABRICATION PROCESS BRIDGING ACADEMIC LAB RESEARCH TO COMMERCIALIZED PRODUCTION. MICROMACHINES, MULTIDISCIPLINARY DIGITAL PUBLISHING INSTITUTE, V. 7, N. 12, P. 225, 2016.

ZAMARRENHO, L.; LOBO, A.O.; MARTINS, E.S.F.; MARTIN, A.A.; PACHECO, M.T.T. DIAGNÓSTICO DE TUMOR HEPÁTICO HUMANO UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA RAMAN. IX ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E V ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO- UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA, SP. (2005).