

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA**



TESE DE DOUTORADO

**Corte de Bolsa de Sangue e Medição de Elasticidade de
Hemácias com Laser Infravermelho**

Diógenes Soares Moura

Diógenes Soares Moura

Corte de Bolsa de Sangue e Medição de Elasticidade de Hemácias com Laser Infravermelho

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Elétrica. Área de Concentração: Fotônica.

Orientador: Prof. Renato Evangelista de Araujo, *D.Sc.*

Recife, 2016

Catálogo na fonte
Bibliotecária Maria Luiza de Moura Ferreira, CRB-4 / 1469

M929c **Moura, Diógenes Soares.**
Corte de bolsa de sangue e medição de elasticidade de hemácias com laser infravermelho / Diógenes Soares Moura. - Recife: O Autor, 2016.
113 folhas, il.

Orientador: Prof. Renato Evangelista de Araujo, D.Sc.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica, 2016.
Inclui Referências e apêndices.

1. Engenharia Elétrica. 2. Laser infravermelho. 3. Pinça óptica. 4. Ablação a laser. 5. Hemácias. 6. Bolsas de sangue. I. Araujo, Renato Evangelista (Orientador). II. Título.

621.3 CDD (22. ed.) UFPE/BCTG/2016-158



Universidade Federal de Pernambuco
Pós-Graduação em Engenharia Elétrica

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DE DEFESA DE
TESE DE DOUTORADO DE

DIÓGENES SOARES MOURA

TÍTULO

**“CORTE DE BOLSA DE SANGUE E MEDIÇÃO DE ELASTICIDADE DE HEMÁCIAS
COM LASER INFRAVERMELHO”**

A comissão examinadora composta pelos professores: RENATO EVANGELISTA DE ARAUJO, DES/UFPE; EDUARDO FONTANA, DES/UFPE; ADRIANA FONTES, DBR/UFPE; EDILSON LUCENA FALCÃO FILHO, DEF/UFPE e DIEGO JOSE RATIVA MILLAN, DEC/UPE sob a presidência do primeiro, consideram o candidato **DIÓGENES SOARES MOURA APROVADO.**

Recife, 25 de fevereiro de 2016.

CECILIO JOSÉ LINS PIMENTEL

Coordenador do PPGE

RENATO EVANGELISTA DE ARAUJO

Orientador e Membro Titular Interno

ADRIANA FONTES

Membro Titular Externo

EDUARDO FONTANA

Membro Titular Interno

EDILSON LUCENA FALCÃO FILHO

Membro Titular Externo

DIEGO JOSE RATIVA MILLAN

Membro Titular Externo

Dedico este trabalho à mulher da minha vida, Edilene,
que me apoiou incondicionalmente em todos os momentos
e aos meus pais Manoel (*in memoriam*) e Maria,
que me apresentaram ao caminho da honestidade e persistência.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente à minha família, em especial minha mãe e meus irmãos.

À minha esposa Edilene, pela compreensão e encorajamento durante esta empreitada.

Ao Professor Renato E. de Araújo pela orientação, disponibilidade e atenção dada durante todo o período do doutorado.

Aos professores do Departamento de Física da UFPE, Edilson L. Falcão Filho, Anderson Gomes e Cid Araújo, por ter cedido os Laboratórios para realização dos experimentos.

À Professora Adriana Fontes pela contribuição e discussões importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Óptica Biomédica e Imagens: Carlos, Christian, Diego César, Diego Rátiva, Fábio, Marcos, Paulo, Wendell, Wellington pelas ajudas e contribuições tanto na realização dos experimentos como em discussões. Agradeço também ao amigo Elias, que sempre me ajudou tirando dúvidas e encorajando durante todo o doutorado.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Engenharia Elétrica, que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos colegas do Colégio de Aplicação.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

À todos que, direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

*"Deixe o futuro dizer a verdade, e avaliar cada um de acordo
com seus trabalhos e suas conquistas".*

(Nikola Tesla)

Resumo

O presente trabalho explora a utilização de lasers na região do infravermelho do espectro eletromagnético em aplicações biomédicas. O uso dos lasers na indústria, para processamento de materiais e em aplicações médicas, como a realização de cirurgias, têm atraído grande interesse nas últimas décadas. Neste trabalho, laser infravermelho foi explorado no corte de bolsas de sangue e no desenvolvimento de sistema de avaliação de elasticidade de hemácias baseado em técnica de aprisionamento óptico. No corte de bolsas de sangue foram determinados os parâmetros da ablação como tempo de perfuração, taxa de ablação e diâmetro dos furos para diferentes fluências e taxas de repetição do laser. Neste trabalho foram utilizados laser pulsados no regime de femtossegundos, com comprimento de onda de 800 nm, com taxa de repetição de 10 Hz e 1 KHz. Os resultados mostraram uma dependência do processo de ablação com o aumento da fluência e da taxa de repetição do laser. Além disso, foram avaliados os resíduos gasosos emitidos durante o processo de ablação das bolsas. A avaliação dos parâmetros de ablação à laser de bolsas de sangue consiste em um estudo pioneiro e introduz um novo direcionamento no processo de corte das mesmas. No desenvolvimento de um sistema para avaliação automática de elasticidade de hemácias aprisionadas opticamente foram utilizados lasers contínuos nos comprimentos de onda de 785 nm e 1064 nm. O sistema permite obter o valor da elasticidade de uma célula em 20 segundos, o que imprime uma redução significativa do tempo do processo de avaliação ($60 \times$) comparada ao método convencional. O sistema automático pode ajudar a expandir as aplicações de pinças ópticas em Hematologia e Hemoterapia. Além disto, o sistema construído foi utilizado para avaliar danos em hemácias aprisionadas opticamente. Foi verificada uma dependência da elasticidade das células com o comprimento de onda, potência do laser incidente e com tempo de aprisionamento da hemácia. Observou-se que as hemácias, após 2 minutos de exposição ao laser de 785 nm tornaram-se até $\sim 104\%$ menos deformáveis que as hemácias controle. A exposição ao laser de 1064 nm de 2 minutos a 10 mW induziu um aumento de até $\sim 20\%$ na rigidez celular. Atribuiu-se a dependência do comprimento de onda dos danos ópticos à absorção do laser pela hemoglobina. As modificações observadas nas propriedades elásticas das células estudadas estabelecem novos limites para aplicações utilizando lasers em hemácias.

Palavras-chave: Laser infravermelho. Pinça óptica. Ablação a laser. Hemácias. Bolsas de sangue.

Abstract

This work explores the use of lasers in the infrared region of the electromagnetic spectrum in biomedical applications. The use of lasers in industry for materials processing and in medical applications, such as in surgeries, have attracted great interest in recent decades. In this work, infrared lasers were explored in blood bags cutting and in the development of a red blood cells elasticity evaluation system based on optical trapping technique. For the blood bags cutting process, ablation parameters such as drilling time, ablation rate and ablation diameter for different laser fluence and repetition rates were determined. In this work we used pulsed laser in femtosecond regime, with a wavelength of 800 nm, with repetition rate of 10 Hz and 1 KHz. The results showed a dependence of the ablation process with laser fluence and repetition rate. In addition, the waste gases emitted during the blood bags ablation process were evaluated. The evaluation of the blood bag laser ablation parameters consists of a pioneering study and introduces a new direction in the blood bag cutting process. In the development of a system for automatic evaluation elasticity of optically trapped red blood cells (RBCs), continuous laser at a wavelength of 785 nm and 1064 nm were used. The system allows to obtain the value of cell elasticity in 20 seconds, establishing a significant reduction in the assessment process time ($\times 60$) compared to the conventional method. The automated system can help expand the applications of optical tweezers in Hematology and Hemotherapy. In addition, the constructed system was used to evaluate damage to red blood cells optically trapped. A dependence of the cells elasticity with the wavelength and power laser and with cell time trapping was observed. The results shows that the red blood cells was up to $\sim 104\%$ less deformable after 2 minutes of 785 nm laser exposition. The 2 minutes exposure to 10 mW of 1064 nm laser induced an increase up to $\sim 20\%$ on cell rigidity. We ascribed the wavelength dependence of the optical damages to the laser absorption by the hemoglobin. Moreover, the increase of RBCs rigidity could be associated to initial changes optically caused in the hemoglobin after irradiation. The results establish new limits for laser applications in RBCs, by identifying considerable modifications on their elastic properties.

Keywords: Infrared laser. Optical tweezer. Laser ablation. Red blood cells. Blood bags.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
2. ABLAÇÃO DE BOLSAS DE SANGUE.....	24
2.1 Fundamentos da ablação a laser	24
2.1.1 Ablação induzida por plasma (AIP)	30
2.1.2 Ionização multifotônica	30
2.1.3 Ionização avalanche.....	31
2.1.4 Fotorrupção	32
2.1.5 Ablação com pulsos ultracurtos.....	33
2.1.6 Ablação de PVC	35
2.2 Materiais e métodos para avaliação de cortes de bolsas de sangue	36
2.2.1 Amostras	36
2.2.2 Sistema para corte e determinação de tempo de perfuração de bolsas de sangue	36
2.2.3 Determinação do tempo de perfuração das bolsas de sangue.....	38
2.2.4 Determinação do diâmetro do feixe.....	39
2.2.5 Resíduos gasosos da ablação das bolsas de sangue	42
2.3 Resultados e discussões	44
2.3.1 Caracterização das amostras	44
2.3.2 Tempo de perfuração das amostras de bolsas de sangue.....	44
2.3.3 Profundidade de ablação e taxa de ablação	48
2.3.4 Diâmetro das perfurações	51
2.3.5 Estudo dos resíduos gasosos durante o processo de ablação.....	54
3. AVALIAÇÃO DE ELASTICIDADE DE HEMÁCIAS	58
3.1 Pinças ópticas	61
3.1.1 Princípio de funcionamento da pinça óptica.....	62
3.1.2 Componentes básicos da pinça óptica	66
3.1.3 Modelo hidroelástico	70
3.1.4 Danos por pinça óptica	71
3.2 Materiais e métodos para avaliação de elasticidade de hemácias	73
3.2.1 Amostras	73
3.2.2 Montagem da pinça óptica com laser de comprimento de onda 1064 nm	74
3.2.3 Montagem da pinça óptica com laser de comprimento de onda 785 nm	80
3.3 Resultados e discussões	80
3.3.1 Avaliação do sistema automático para medição de elasticidade de hemácias	80

3.3.2	Avaliação de dano óptico em hemácias aprisionadas opticamente através de medição de elasticidade	85
4.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	92
4.1	Conclusões	92
4.2	Perspectivas futuras	93
4.2.1	Aplicação do sistema de medição automática de elasticidade de hemácias em hemoglobinopatias.....	93
4.2.2	Associação do sistema de pinça óptica a um sistema de microcirurgia celular	95
	REFERÊNCIAS.....	97
	APÊNDICES	107
A.	Resultados preliminares do sistema de fotoporação de células	107
B.	Publicações e participações em eventos	113

Lista de Figuras

Figura 3.1: Dependência dos mecanismos de ablação a laser com a intensidade e o tempo de exposição.	25
Figura 3.2: Temperaturas críticas para ocorrência de necrose celular.	26
Figura 3.3: Localização dos efeitos térmicos em tecido biológicos.	26
Figura 3.4: Diagrama de energia e mecanismo de fotoablação.	27
Figura 3.5: Energias de dissociação de algumas ligações moleculares e energia do fóton de alguns lasers.	28
Figura 3.6: Mecanismo de absorção multifotônica seguida por ionização avalanche.	31
Figura 3.7: Distinção entre os processos de ablação induzida por plasma e fotorruptura (tecido da córnea).	32
Figura 3.8: Distinção entre ablação utilizando lasers pulsados de nanossegundos (esquerda) e com pulsos ultracurtos (direita).	33
Figura 3.9: Ablação a laser em substratos de cobre. (a) 2 pulsos laser de 4,5 ns. (b) 10 pulsos laser de 4,5 ns. (c) 8 pulsos laser de 500 fs. (d) 40 pulsos laser de 500 fs.	34
Figura 3.10: Estrutura química do PVC. (a) Monômero cloreto de vinila. (b) Policloreto de vinila.	35
Figura 3.11: <i>Shutter</i> construído com HD de notebook.	37
Figura 3.12: Painel frontal do software de controle para medida do tempo de perfuração das amostras de PVC.	38
Figura 3.13: Arranjo experimental para ablação de bolsas de sangue e medidas do tempo de perfuração.	39
Figura 3.14: Principais parâmetros de um feixe gaussiano	40
Figura 3.15: Arranjo experimental para determinação do diâmetro do laser.	41

Figura 3.16: Dependência da potência com o deslocamento da lâmina na posição focal.	42
Figura 3.17: Arranjo experimental para ablação de bolsas de sangue e análise de resíduos gasosos através de: (a) FTIR (b) medidas do pH.....	43
Figura 3.18: Imagem de uma amostra de bolsa de sangue obtida pela técnica de tomografia por coerência óptica (direita) e diagrama indicando procedimento de iluminação da amostra (esquerda).	44
Figura 3.19: Tempo de perfuração para diferentes fluências.Taxa de repetição de 1 KHz.....	45
Figura 3.20: Tempo de perfuração para diferentes fluências.Taxa de repetição de 10 Hz.....	46
Figura 3.21: Dependência do tempo de perfuração das bolsas de sangue com a fluência incidente para as taxas de repetição: (a) 1 KHz. (b) 10 Hz.	47
Figura 3.22: Ablação de bolsa de sangue com diferentes números de pulso e fluência de 12,6 J/cm ²	48
Figura 3.23: Profundidade de ablação em função do número de pulsos para fluência de 12,6 J/cm ²	49
Figura 3.24: Profundidade de ablação em função do número de pulsos para fluência de 12,6 J/cm ²	50
Figura 3.25: Representação dos furos de entrada e saída após perfuração.....	51
Figura 3.26: Imagem de microscopia óptica das superfícies ablacionadas (entrada do feixe) para diferentes fluências e taxa de repetição de 1 KHz.	52
Figura 3.27: Imagem de microscopia óptica das superfícies ablacionadas (saída do feixe) para diferentes fluências e taxa de repetição de 1 KHz.	52
Figura 3.28: Diâmetro de entrada (▼) e de saída (■) de bolsas de sangue perfuradas em função da fluência incidente.	53
Figura 3.29: Diâmetro de entrada das superfícies ablacionadas em função do número de pulsos para fluência de 12,6 J/cm ² e taxa de repetição de 1 KHz.	54

Figura 3.30: pH relativo em função da fluência.	55
Figura 3.31: Espectro FTIR: (a) HCl na forma gasosa. (b) Resíduos gasosos da ablação para fluência de $12,4 \text{ J/cm}^2$	56
Figura 4.1: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de hemácias normais.....	58
Figura 4.2: Hemácia aspirada através de uma micropipeta de diâmetro interno $1,3 \text{ }\mu\text{m}$	59
Figura 4.3: Citometria de torção magnética em hemácias. (a) Imagem de campo claro. (b) Imagens de microscopia eletrônica de varredura de hemácias com esferas ferromagnéticas ligadas. (c) Princípios da citometria de torção magnética.	60
Figura 4.4: Raios incidente e refratado por uma partícula de índice de refração $n_1 > n_2$	63
Figura 4.5: (a) Trajetória de dois raios simétricos, de mesma intensidade, que se encontrariam com o eixo z na posição z_0 se não sofressem desvio devido à partícula, com $z_0 > 0$ acima do centro da partícula ($n_1 > n_2$). (b) Diagrama representando as forças sobre a partícula e a trajetória dos raios.	64
Figura 4.6: (a) Trajetória de dois raios simétricos, de mesma intensidade, que se encontrariam com o eixo z na posição z_0 se não sofressem desvio devido à partícula, com $z_0 < 0$ abaixo do centro da partícula ($n_1 > n_2$). (b) Diagrama representando as forças sobre a partícula e a trajetória dos raios.	65
Figura 4.7: Trajetória de dois raios antissimétricos, de intensidades diferentes e o diagrama representando as forças sobre a partícula e a trajetória dos raios.....	66
Figura 4.8: Componentes básicos de um sistema de pinça óptica.....	67
Figura 4.9: Telescópio formado pela associação de duas lentes convergentes, resultando em (a) feixe colimado f (ampliação do telescópio 1:1), (b) feixe colimado (ampliação do telescópio 2:1), (c) feixe divergente e (d) feixe convergente.	68
Figura 4.10: Abertura numérica para diferentes valores de α ($n = 1$).	69
Figura 4.11: Modelo geométrico da hemácia na câmara.....	70

Figura 4.12: Espectro de absorção da água (H ₂ O), hemoglobina (Hb) e oxihemoglobina (HbO ₂).	72
Figura 4.13: Dependência com o comprimento de onda do dano óptico em <i>E. coli</i> (círculos sólidos) e células CHO (linha sólida) avaliado a partir da LD ₅₀ (eixo do lado esquerdo) e a partir da eficiência de clonagem em células CHO (círculos abertos) (eixo do lado direito)...	73
Figura 4.14: Montagem experimental da pinça óptica com o laser de 1064 nm.	74
Figura 4.15: Diagrama das etapas de medição automática da elasticidade de hemácias em tempo real.	76
Figura 4.16: Detecção de pontos não pertencentes à borda da célula.	79
Figura 4.17: Painel de controle do software de medição da elasticidade das hemácias em tempo real.	79
Figura 4.18: Imagem original de uma hemácia aprisionada pela pinça óptica sendo esticada com velocidade de 140 μm/s.	81
Figura 4.19: Etapas do processo de segmentação. (a) componente azul da imagem original, (b) equalização de histograma, (c) filtro de média (5 x 5), (d) filtro laplaciano, (e) dilatação, (f) binarização, (g) erosão, (h) célula segmentada com bordas detectadas.	81
Figura 4.20: (a) Histograma da região da imagem 104 x 50 (canto superior direito) da componente azul da imagem original. (b) Histograma equalizado da região da imagem 104 x 50 e imagem de saída (canto superior direito) após equalização de histograma.	82
Figura 4.21: Hemácia esticada em diferentes velocidades.	84
Figura 4.22: Deformação da hemácia em função do tempo.	84
Figura 4.23: Comprimento da hemácia versus tempo de medição para velocidade de 245 μm/s, comprimento de onda 1064 nm e potência incidente de 140 mW.	85
Figura 4.24: Comprimento da hemácia versus tempo de medição para velocidade de 160 μm/s, comprimento de onda 785 nm e potência incidente de 75 mW.....	86

Figura 4.25: Deformação das hemácias em função da velocidade para diferentes tempos de aprisionamento ($\lambda = 1064$ nm).....	88
Figura 4.26: Deformação das hemácias em função da velocidade para diferentes tempos de aprisionamento ($\lambda = 1064$ nm).....	89
Figura 4.27: Deformação das hemácias em função da velocidade para diferentes tempos de aprisionamento ($\lambda = 785$ nm e potência de 10 mW).....	90
Figura 5.1: Deformação em função da velocidade para hemácias de doadores normais (controle), portadores de anemia falciforme e talassemia ($\lambda = 1064$ nm).	94
Figura A.1: Arranjo experimental do sistema de manipulação e microcirurgias de células. .	108
Figura A.2: Painel de controle do sistema de microcirurgia celular	108
Figura A.3: Espectros de absorção e emissão dos QDs estabilizados com cisteamina.	109
Figura A.4: Imagens de microscopia de células da mucosa bucal observada com objetiva de 10x (a) pela técnica de DIC. (b) Marcada com CdTe-cisteamina e observada com objetiva de 10x por microscopia de fluorescência. (c) Imagem de hemácia marcada com CdTe-cisteamina e observada com objetiva de 100 x.....	110
Figura A.5: Intensidade de fluorescência em função da potência do laser.....	111
Figura A.6: Intensidade de fluorescência em função do deslocamento do foco do microscópio em células da mucosa bucal marcadas com CdTe-cisteamina (objetiva de 100 x).....	111

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Tempos médios de perfuração das amostras de bolsas de sangue para cada fluência. Taxas de repetição de 1 KHz e 10 Hz.	47
Tabela 2.2: Taxas de ablação para cada fluência para taxas de repetição de 1 KHz e 10 Hz. .	49
Tabela 3.1: Elasticidade obtida pelo sistema automático e pelo método convencional para doadores controle e portadores de anemia falciforme.	83
Tabela 3.2: Elasticidade das hemácias para diferentes potências, comprimentos de onda e tempos de aprisionamento.	91
Tabela 4.1: Elasticidade das hemácias para o grupo controle, portadores de anemia falciforme e talassemia.....	95

Lista de Abreviaturas e Siglas

- AFM – Atomic Force Microscopy (*Microscopia de força atômica*)
- AIP – Plasma-induced ablation (Ablação induzida por plasma)
- ArF – Argon Fluoride (Fluoreto de Argônio)
- CCD - Coupled Charge Device (Dispositivo de Carga Acoplada)
- CdTe – Telureto de cádmio
- CHO- Chinese hamster ovary (ovário de hamster Chinês)
- CO₂ – Dióxido de Carbono
- CW – Continuous wave (Onda contínua)
- DIC - Differential interference contrast (contraste por interferência diferencial)
- EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
- FTIR - Fourier transform infrared spectroscopy (espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier)
- Hb – Hemoglobina
- HCl – Ácido clorídrico
- HD – Hard disk (disco rígido)
- IR – Infrared (Infravermelho)
- KrF – Krypton Fluoride (Fluoreto de Criptônio)
- Laser – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação)
- LASIK - laser-assisted in situ keratomileusis (ceratotomia lamelar pediculada associada à ceratectomia fotorrefrativa)
- NA – Numerical aperture (Abertura numérica)
- Nd:YAG – Neodymium:doped yttrium aluminium garnet (Neodímio: granada de ítrio e alumínio)
- Nd:YLF – Neodymium-doped yttrium lithium fluoride (Neodímio: fluoreto de lítio-ítrio)
- Nd:YVO₄ – Neodymium-doped yttrium orthovanadate (Vanadato de Ítrio dopado com Neodímio)
- OCT - Optical coherence tomography (tomografia por coerência óptica)
- OMTC - Optical Magnetic Twisting Cytometry (Citometria óptica de torção magnética)
- OT - Optical Tweezer (pinça óptica)
- PC – Policarbonato
- PE – Polietileno

pH - potencial de Hidrogênio

PMMA – Poly(methyl methacrylate) (Polimetilmetacrilato)

PRK – photorefractive keratectomy (ceratectomia fotorrefrativa)

PVC – Polyvinyl chloride (Cloro de Polivinila)

QD – quantum dots (pontos quânticos)

RBCs – red blood cells (hemácias)

RGB – red-green-blue (vermelho-verde-azul)

Ti – Titânio

TM – Transversal mode (Modo transversal)

UV – Ultravioleta

WD – Working distance (Distância de trabalho)

XeCl – Xenônio-Cloro

XeF – Xenônio-Flúor

ZAT – Zona afetada termicamente

Lista símbolos

h	Constante de Planck
ν	Frequência
E_{cin}	Energia cinética
λ	Comprimento de onda
I	Intensidade
α	Coefficiente de absorção
I_{th}	Intensidade de limiar
R	Taxa de absorção multifotônica
σ	Seção de choque
E_g	Energia de ionização
N	Densidade de elétrons
β	Taxa de ionização avalanche
τ_t	Tempo de relaxamento térmico
τ	Largura do pulso laser
L_D	Comprimento de difusão térmica
L_0	Comprimento de penetração óptica
D_t	Difusividade térmica
F	Fluência
F_{th}	Fluência de limiar
d	Taxa de ablação
e	Espessura
τ_R	Taxa de repetição
t_p	Tempo de perfuração
$w(z)$	Raio do feixe laser
w_0	Cintura do feixe
Z_R	Comprimento Rayleigh
Θ	Divergência do feixe laser
D	Diâmetro
f	Distância focal
P	Potência incidente
$P_{máx}$	Potência máxima
erf	Função erro

fs	Femtosegundos
n	Índice de refração
p	Momento linear
NA	Abertura numérica
F	Força
η	Viscosidade
W	Largura da célula
K	Constante elástica
μ	Elasticidade aparente
v	Velocidade
L	Comprimento
ΔL	Deformação da célula

1. INTRODUÇÃO

A partir do desenvolvimento do laser por Maiman em 1960 [1] diversas aplicações surgiram nos mais variados ramos da ciência e tecnologia. Merecem destaque as aplicações nas áreas militares, medicina, telecomunicações e engenharia. Lasers podem emitir radiação coerente nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. Além disso, existem lasers com diferentes regimes temporais de operação, como o de onda contínua (CW) e os pulsados, com pulsos de largura temporal que se estende de femtossegundos a milissegundos, e com diferentes taxas de repetição (Hz a GHz). Esta grande diversidade de tipos de lasers, possibilita o estabelecimento de diferentes técnicas e aplicações.

Várias são as aplicações de lasers na indústria para processamentos de materiais, tais como: soldagem [2,3], corte [2,4,5], perfuração [2,6], microfabricação [2,7], deposição [2,8,9]. Já na medicina pode-se citar a utilização de lasers em processos cirúrgicos, diagnósticos e tratamentos de doenças. Em várias dessas aplicações utilizam-se lasers para destruir e remover material. Este processo é conhecido como ablação. Ablação pode ocorrer através da vaporização do material após este atingir um certo valor de temperatura, pela quebra direta das ligações químicas ou até mesmo através da geração de plasma com posterior explosão coulombiana. O que vai definir o mecanismo de ablação é a intensidade aplicada, o comprimento de onda e o tempo de exposição do material ao mesmo [10].

Vários materiais podem ser ablacionados utilizando-se lasers. Dentre estes materiais podemos citar madeira, metais, vidros e polímeros. Mesmo os materiais transparentes podem sofrer ablação, uma vez que dependendo da intensidade, processos não lineares, como absorção multifotônica, passam a ser relevantes, fazendo com que o material absorva a radiação.

Dentre os polímeros explorados na ablação a laser destacam-se o polimetilmetacrilato (PMMA) [11,12,13,14], o polietileno (PE) [15,16], o policarbonato (PC) [14] e o cloreto de polivinila (PVC) [9,17,18], pois possuem diversas aplicações na indústria e na área médica. O PVC está presente em diversos materiais médico-hospitalares, sendo o principal constituinte das bolsas utilizadas para armazenar sangue refrigerado e plasma sanguíneo congelado. Em particular, para cortar bolsas de plasma congelado, na indústria de hemoderivados o instrumento de corte fica em contato direto com o plasma sanguíneo, aumentando o risco de contaminação dessa substância [19]. A utilização de lasers no corte de bolsas com plasma congelado pode ser uma alternativa para diminuir tal risco [20].

Ainda nas ciências da vida podemos citar a utilização de lasers para realização de microcirurgia celular [21,22], microscopia [23], aprisionamento e manipulação de células e organismos vivos [24,22]. O aprisionamento de partículas utilizando um único feixe altamente focalizado foi possível após os trabalhos de Ashkin [25,26]. Este sistema ficou conhecido como pinça óptica.

A pinça óptica é uma ferramenta que se utiliza da transferência de momento de fótons da luz para capturar e manipular partículas dielétricas, além de células, organismos microscópicos e moléculas. A primeira observação de que a luz pode exercer forças sobre um corpo foi feita por Johannes Kepler no século XVII. Este observou que a cauda de um cometa sempre aponta para o lado oposto do sol atribuindo tal fato à pressão de radiação exercida pela luz do sol. Porém, só com o advento do laser que se tornou possível obter forças suficientes para aprisionar e manipular partículas em escalas nano e microscópica. Nos primeiros trabalhos, o aprisionamento óptico e levitação de partículas foram realizados utilizando a pressão de radiação exercida pela luz e feixes contrapropagantes. Em 1986 [25], Ashkin e colaboradores demonstraram que era possível aprisionar partículas utilizando-se apenas um feixe altamente focalizado.

A utilização da pinça óptica para manipulação de sistemas biológicos foi demonstrada por Ashkin em 1987 em que foi utilizado um laser de Argônio com comprimento de onda em 514 nm para aprisionar vírus e bactérias [26]. No mesmo ano foi demonstrado que a utilização de lasers na região do infravermelho para aprisionamento de células e organismos causava menos dano que o laser na região visível [24]. No aprisionamento de materiais biológicos através de pinças ópticas, o comprimento de onda é um parâmetro fundamental, uma vez que existe uma janela de transparência relativa na região do infravermelho próximo (~750-1200 nm), localizada na região entre a absorção de proteínas no visível e a absorção da água no infravermelho [27].

Dentre as principais aplicações da pinça óptica em sistemas biológicos destaca-se a medição de forças da ordem de piconewtons [27,28,29], alongamento de DNA [28,30,31,32], obtenção de propriedades elásticas de células e microrganismos [33,34,35,36], classificação de células [37,38], fusão de células [39,40], fertilização in vitro [41]. Em particular, a determinação de propriedades mecânicas de hemácias utilizando pinças ópticas tem atraído bastante atenção [33,42,35]. O interesse em estudar tais propriedades reside no fato de que as hemácias necessitam deformar-se para passar por vasos menores que seu diâmetro. Alterações nessas propriedades elásticas podem ser um indicativo de patologias como anemias. O estudo dessas propriedades utilizando pinças ópticas têm se mostrado promissor, uma vez que é

possível analisar as propriedades elásticas de células individuais, além de não oferecer contato físico com a célula.

Sistemas de pinças ópticas podem ser encontrados comercialmente [43,44]. Contudo, a determinação da elasticidade de células usando esta técnica fotônica consiste em um procedimento laborioso de análise de dados e imagens envolvendo um tempo longo para obtenção de resultados quantitativos. Dessa forma a automatização de um sistema de pinça óptica para determinação de propriedades elásticas de hemácias em tempo real pode tornar a técnica ainda mais atraente e difundida.

Este trabalho tem por objetivo explorar lasers na região do infravermelho em aplicações biomédicas. Para tal, as seguintes metas foram estabelecidas: 1) Avaliar o uso de lasers de femtossegundos para o corte de bolsas de sangue. 2) Desenvolver um sistema baseado em pinça óptica, que permita avaliar a elasticidade de hemácias automaticamente e estudar a influência do aprisionamento óptico na elasticidade de células.

A presente tese está organizada em 4 capítulos. No capítulo 2 é introduzido o processo de ablação a laser e os principais mecanismos de ablação, destacando a ablação a laser de PVC. Nesta parte do trabalho foram avaliados parâmetros e características do corte de bolsas de sangue com laser de femtossegundos, o que consiste em um estudo pioneiro e introduz um direcionamento inovador no processo de corte de bolsas de sangue. No capítulo 3 são discutidas algumas técnicas para medição de propriedades elásticas de hemácias, destacando a pinça óptica, ferramenta utilizada neste trabalho. Além disso, são apresentados os fundamentos teóricos referentes ao processo de aprisionamento óptico de células. Nesta parte do trabalho é apresentado o desenvolvimento de um sistema de pinça óptica para avaliação automática da elasticidade de hemácias. O sistema desenvolvido possibilitou a avaliação de danos em células vermelhas aprisionadas opticamente. Esta avaliação foi realizada explorando diferentes comprimentos de onda, potências ópticas e tempo de aprisionamento. No capítulo 4 são apresentadas as conclusões e as perspectivas futuras, destacando as aplicações do sistema construído na avaliação de hemoglobinopatias e os resultados preliminares do desenvolvimento de um sistema de microcirurgia celular para fotoporação de células.

2. ABLAÇÃO DE BOLSAS DE SANGUE

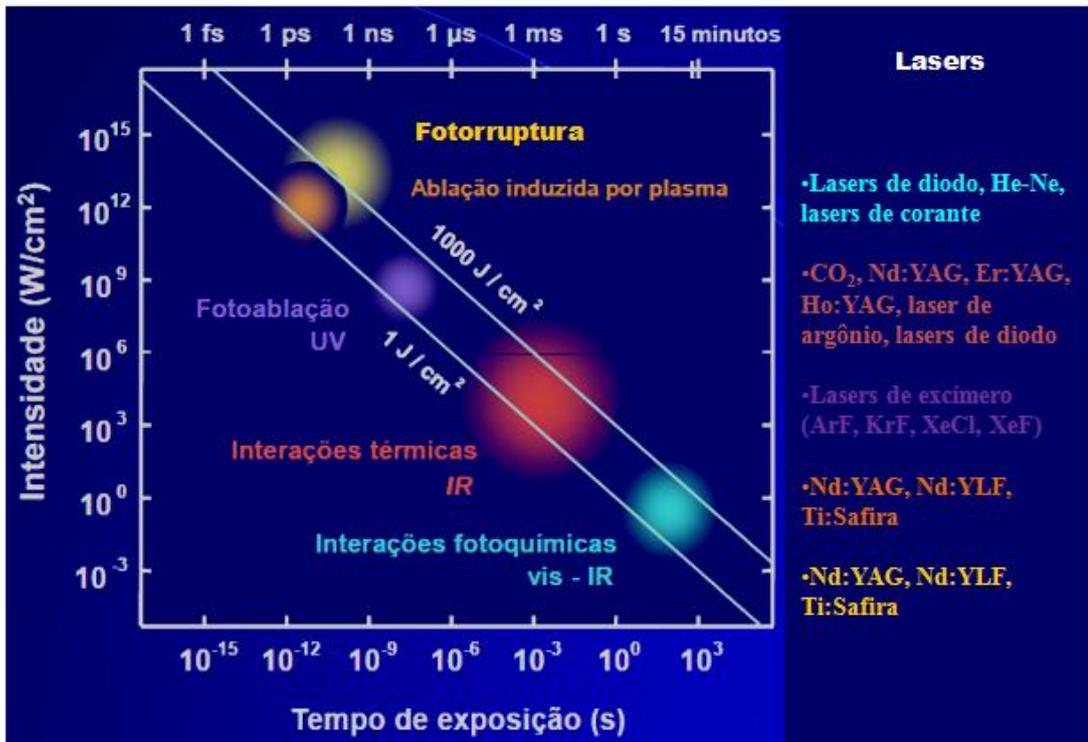
Neste capítulo são abordados mecanismos de ablação a laser e alguns processos de interação de lasers com materiais sólidos e tecidos biológicos, dando ênfase ao mecanismo de ablação induzida por plasma. É discutido também o processo de ionização multifotônica e apresentado um modelo de ablação com pulsos ultracurtos. Além disso, são apresentados e discutidos os procedimentos experimentais, a instrumentação desenvolvida para ablação de bolsas de sangue e os resultados obtidos.

2.1 Fundamentos da ablação a laser

Ablação a laser consiste no processo de remoção de material de uma amostra com a incidência de um feixe laser. O primeiro relato da ablação a laser surgiu dois anos após sua invenção. Breech e Cross [45] utilizaram um laser de rubi para ablacionar metais e caracterizar a composição elementar da amostra através do espectro de emissão do plasma formado durante a ablação. Atualmente diversas aplicações na área da indústria e medicina tem utilizado ablação a laser para processamento de materiais, dentre essas aplicações destaca-se corte [2,4,5] e perfuração a laser [2,6], microfabricação [2,7], soldagem [2,3], microcirurgia celular [21,22].

Os mecanismos de ablação irão depender de diversos parâmetros do laser, como comprimento de onda, largura temporal do pulso, taxa de repetição, parâmetros de irradiação como tempo de exposição, densidade de energia, etc. Propriedades ópticas e térmicas do material como coeficiente de absorção, coeficiente de espalhamento, capacidade térmica, coeficiente de difusão térmica são determinantes no processo de ablação. Os mecanismos de interação do laser com materiais que podem gerar ablação são interação fototérmica, fotoablação, ablação induzida por plasma (AIP) e fotorruptura [10]. A Figura 2.1 relaciona os mecanismos de ablação com a intensidade do laser e o tempo de exposição.

Figura 2.1: Dependência dos mecanismos de ablação a laser com a intensidade e o tempo de exposição.

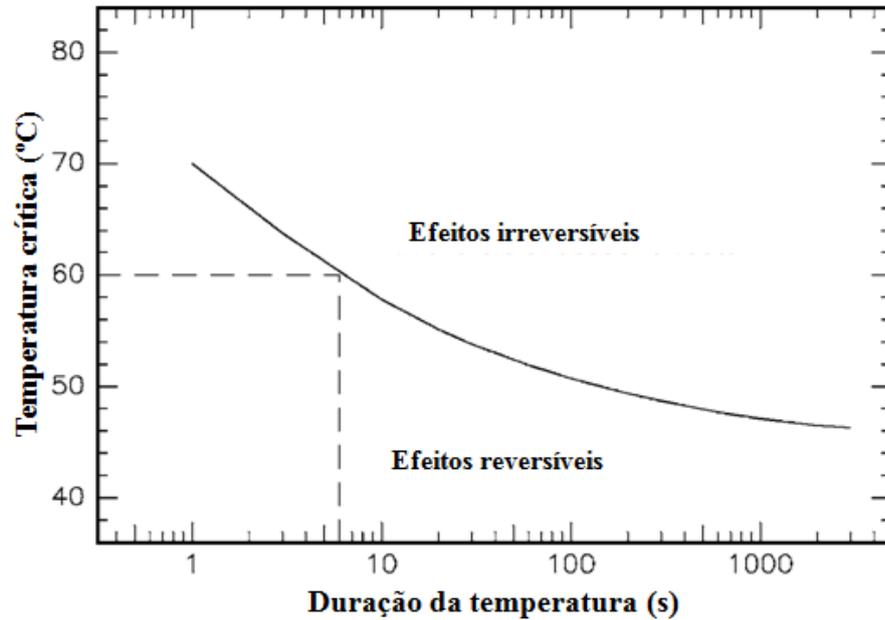


Fonte: adaptado de [10].

As interações térmicas iniciam-se após poucos microssegundos a alguns minutos e intensidades entre 10 e 10^6 W/cm^2 . Tais interações podem provocar coagulação, carbonização, fusão e/ou vaporização do material e podem ser alcançadas utilizando-se lasers no regime CW ou pulsado. A geração do calor, sua propagação e o efeito provocado dependem dos parâmetros de incidência do laser e das propriedades ópticas e térmicas do material [10,46].

O calor depositado pode causar danos reversíveis ou irreversíveis ao tecido biológico, isto depende da temperatura alcançada e do tempo que o tecido permanece nesta temperatura como mostrado no gráfico da Figura 2.2.

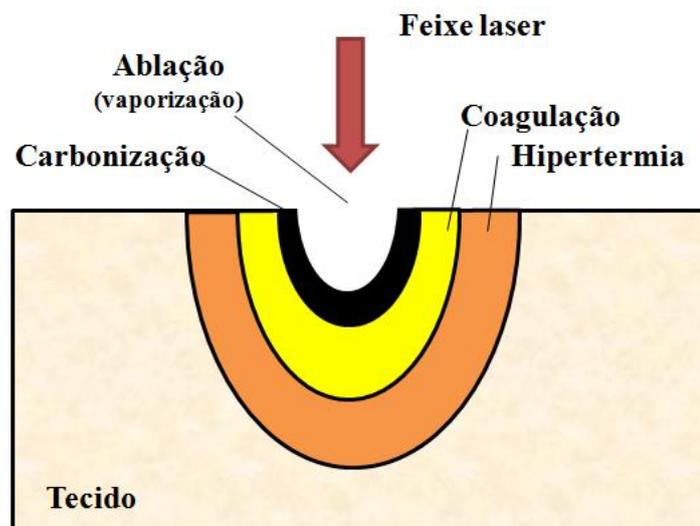
Figura 2.2: Temperaturas críticas para ocorrência de necrose celular.



Fonte: retirado de [10].

No gráfico da Figura 2.2 é possível observar, por exemplo, que para uma temperatura de 60 °C e tempos de exposição maiores que 6 segundos levará o tecido a sofrer danos irreversíveis como carbonização e vaporização. A localização e a extensão espacial de cada efeito térmico dependem da temperatura alcançada localmente durante e após a exposição ao laser. A Figura 2.3 ilustra a localização destes efeitos em tecidos biológicos.

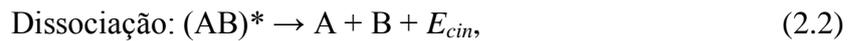
Figura 2.3: Localização dos efeitos térmicos em tecido biológicos.



Fonte: adaptado de [10].

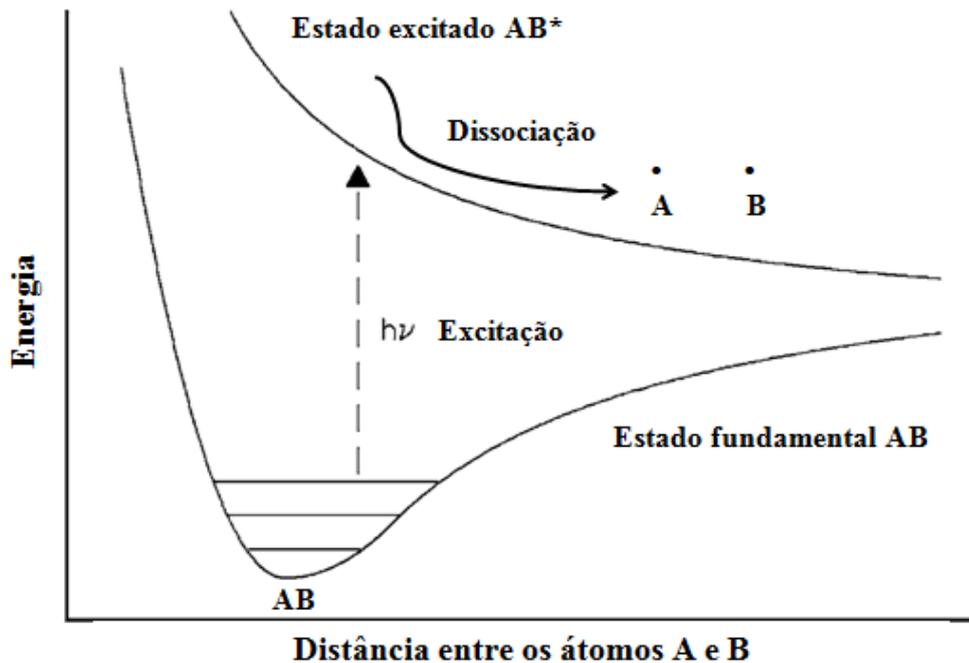
Quando intensidades entre 10^7 e 10^{10} W/cm^2 são atingidas por pulsos com duração de nanossegundos e comprimento de onda na região do ultravioleta o mecanismo de ablação dominante é a fotoablação. Este processo de ablação foi descoberto por Srinivasan e Mayne-Banton [47]. Neste mecanismo, a energia do fóton incidente é suficiente para quebrar as ligações químicas ocasionando ablação do material.

Para compreender o mecanismo de fotoablação, considere uma molécula formada por dois átomos A e B que estão ligados quimicamente. A absorção de um fóton na região do UV pode levar a molécula para um estado excitado AB^* não estável. Neste caso a molécula pode dissociar-se. O processo de fotoablação pode ser entendido como constituído de dois, passos, descritos nas equações (2.1) e (2.2) [10].



$h\nu$ é a energia do fóton incidente e E_{cin} é a energia cinética adquirida pelos átomos. A Figura 2.4 apresenta um diagrama de estados de energia para uma molécula diatômica e indica o processo de fotoablação.

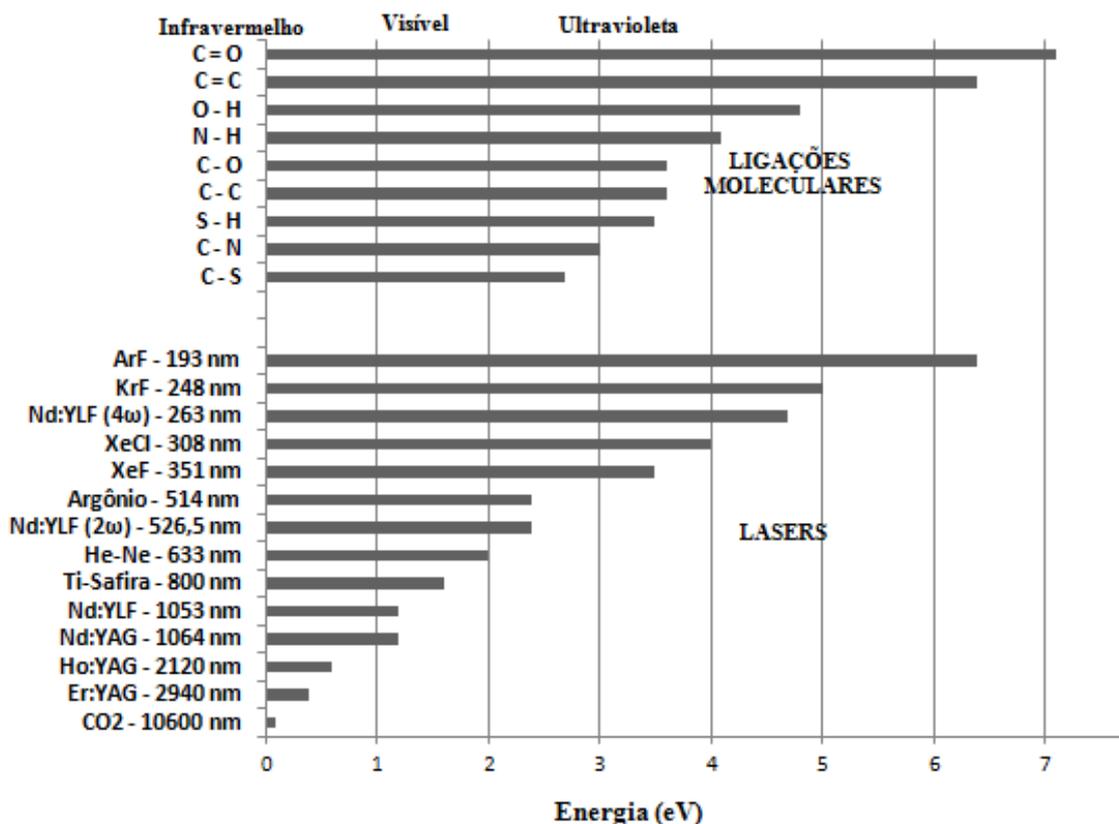
Figura 2.4: Diagrama de energia e mecanismo de fotoablação.



Fonte: adaptado de [10].

Os lasers mais utilizados na fotoablação são os de excímero (ArF – $\lambda = 193$ nm, KrF – $\lambda = 248$ nm, XeCl – $\lambda = 263$ nm, XeF – $\lambda = 308$ nm), pois a energia do fóton é maior que a energia típica de dissociação das ligações moleculares. Pelo gráfico da Figura 2.5 pode-se observar a energia do fóton de diferentes lasers e a energia de dissociação de algumas ligações químicas.

Figura 2.5: Energias de dissociação de algumas ligações moleculares e energia do fóton de alguns lasers.



Fonte: adaptado de [2].

É possível observar no gráfico da Figura 2.5 que os lasers com comprimento de onda na região do ultravioleta possuem energia do fóton maior que a energia de dissociação de diversas ligações químicas, já os lasers na região do visível e infravermelho não possuem energia suficiente para quebrar as ligações químicas.

Uma das principais aplicações da fotoablação utilizando lasers de excímero são as cirurgias refrativas da córnea [48]. Em particular, as duas principais técnicas utilizadas para correção de miopia são a ceratectomia fotorrefrativa (PRK) e ceratotomia lamelar pediculada associada à ceratectomia fotorrefrativa (LASIK). Em ambas as técnicas o laser é utilizado para remover parte do tecido da córnea e remodelá-la, diminuindo seu poder de refração [49]. Na técnica PRK o laser é focalizado diretamente na superfície da córnea, enquanto que na

LASIK uma fina camada da superfície da córnea (lamela) é cortada com um microcerátomo ou com um laser de femtossegundos. A ablação é realizada em uma camada mais interna da córnea e depois a lamela é recolocada.

Um modelo que descreve o processo de ablação é baseado na lei de Beer-Lambert. Neste modelo relaciona-se a profundidade do material ablacionado com a intensidade do laser, pela relação

$$I(z) = I_0 e^{-\alpha z}, \quad (2.3)$$

em que z é a profundidade em relação a superfície do material, I_0 é a intensidade incidente do laser e α é o coeficiente de absorção do material. Diferenciando a Equação (2.3) com relação a z é obtido

$$-\frac{\partial I}{\partial z} = \alpha I. \quad (2.4)$$

Fotoablação ocorrerá quando certa quantidade de energia por unidade de tempo e volume for absorvida. A condição para ocorrer fotoablação é dada por

$$I(z) \geq I_{th}, \quad (2.5)$$

ou ainda,

$$I_0 e^{-\alpha z} \geq I_{th}, \quad (2.6)$$

onde I_{th} é a intensidade de limiar para ocorrer fotoablação e é determinada pelo número mínimo de ligações que tem que ser dissociadas para acarretar na ejeção do material. Quando $I(z) = I_{th}$ a profundidade de ablação z será dada por

$$z = \frac{1}{\alpha} \ln \left(\frac{I_0}{I_{th}} \right) \quad (2.7)$$

Outros dois processos ocorrem na interação luz-matéria, quando lasers pulsados de alta energia são explorados. Quando densidades de potência excedem 10^{11} W/cm² em sólidos ocorre o fenômeno de ruptura óptica (optical breakdown) [10]. Dois mecanismos podem ocorrer a partir dessa intensidade, ablação induzida por plasma (AIP) e fotorruptura. Nesses dois mecanismos a ablação acontece após a geração de um plasma. Na AIP, absorção multifotônica seguida por ionização avalanche e explosão coulombiana são responsáveis pela ejeção do material. No caso de fotorruptura, ondas de choque estão associadas ao processo

devido a expansão do plasma formado, podendo ocorrer também cavitação e formação de jato. Os processos de ablação induzida por plasma e fotorrupção são discutidos nas seções 2.1.1 e 2.1.4, respectivamente.

2.1.1 Ablação induzida por plasma (AIP)

Na interação de lasers de femtossegundos, com intensidades superiores a 10^{13} W/cm², com materiais, o principal mecanismo de quebra de ligações é a explosão coulombiana que ocorre após a formação de um plasma, este processo é conhecido como ablação induzida por plasma (AIP). AIP também pode ser gerada com laser de nano e picossegundos, neste caso danos térmicos acompanham o processo de ablação do material.

A formação de plasma desempenha um importante papel nas interações de lasers de alta potência com material. Para materiais que são aquecidos pela absorção linear da radiação laser, a formação de plasma é iniciada pela emissão termoiônica de elétrons livres. Porém, através de processos não lineares, AIP pode ser alcançada em materiais transparentes à radiação incidente [10].

Em amostras sólidas, a AIP utilizando lasers de femtossegundos pode ocorrer de diferentes maneiras. Em materiais que possuem elétrons livres, como os metais, a ablação dá-se pelo mecanismo de ionização avalanche.

Para materiais dielétricos a ablação inicia-se com a absorção multifotônica seguida da ionização. Neste caso, a energia de um único fóton não é suficiente para excitar um elétron e ionizar o material. Assim a fotoionização é alcançada quando múltiplos fótons são absorvidos. O processo de absorção multifotônica ocorre para intensidades elevadas que são atingidas focalizando o feixe laser, limitando espacialmente a região focal e, desta forma a formação do plasma acontece em regiões onde o limiar de irradiância para AIP ocorrer for ultrapassado [10].

2.1.2 Ionização multifotônica

No mecanismo de ionização multifotônica, após a absorção de múltiplos fótons pelos átomos e moléculas do material, ocorre sua ionização. A taxa de absorção multifotônica R é dependente da intensidade do laser e pode ser expressa como [50]

$$R = \sigma I^n . \quad (2.8)$$

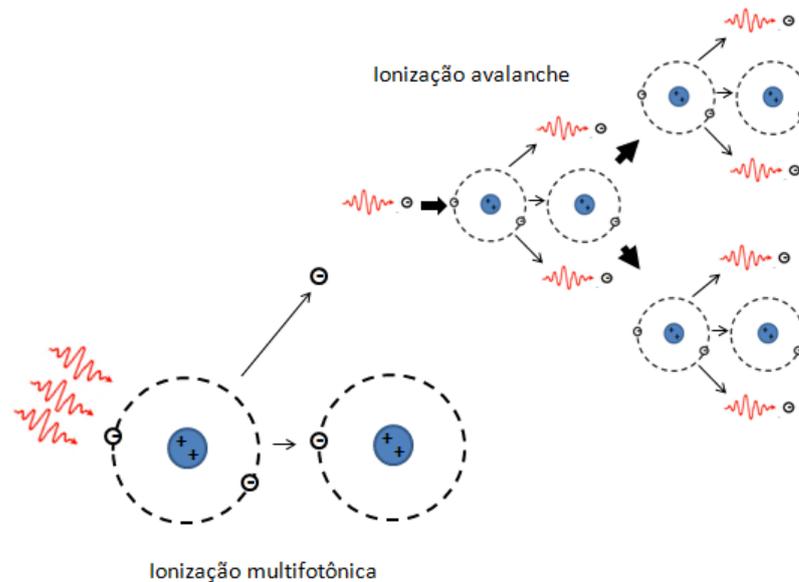
Na equação (2.8), σ é a seção de choque e I a intensidade do laser. O número de fótons n requeridos para ocorrer ionização multifotônica é o menor número que satisfaz a relação $n h \nu > E_g$, onde E_g é a energia de ionização do material e $h \nu$ é a energia do fóton.

O processo de ionização multifotônica também pode ser acompanhado de ionização avalanche.

2.1.3 Ionização avalanche

Ionização avalanche ocorre quando elétrons são acelerados pelo campo elétrico do feixe laser e colidem com os átomos (ou moléculas) do material, arrancando elétrons dele. A energia excedente é transferida por colisão para outro elétron criando outro elétron livre, este processo é conhecido como ionização por impacto. Os elétrons continuam a absorver energia do campo elétrico e ionizar as outras moléculas resultando em um efeito de avalanche [51], como ilustra a Figura 2.6.

Figura 2.6: Mecanismo de absorção multifotônica seguida por ionização avalanche.



Fonte: próprio autor.

Enquanto o campo criado pelo laser estiver presente, a densidade de elétrons, N , aumentará de acordo com

$$\frac{dN}{dt} = \beta N, \quad (2.9)$$

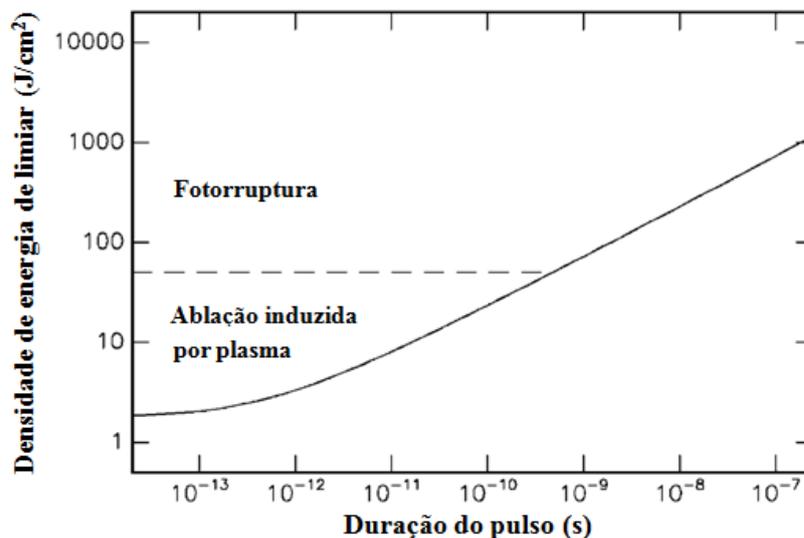
em que β é conhecido como taxa de ionização avalanche [52].

2.1.4 Fotorrupura

Uma vez que tanto no processo de ablação induzida por plasma quanto no de fotorrupura tem-se a geração de plasma às vezes estes mecanismos são difíceis de serem distinguidos [10]. Fotorrupura ocorre quando a densidade de potência atingir valores superiores a 10^{11} W/cm². Tais densidades de potência podem ser atingidas com lasers de duração temporal entre 100 fs e 100 ns. Os efeitos físicos associados à ruptura óptica são a formação de plasma e a geração de ondas de choque. A geração de onda de choque está associada com a expansão do plasma e começa durante sua formação propagando-se para fora do volume focal.

Muitas vezes cavitação e formação de jato estão associadas ao processo de fotorrupura. Cavitação ocorre quando o laser é focalizado dentro do material vaporizando-o e criando bolhas. Quando as bolhas estão próximas à superfície do material e colapsam surge a formação de jato. O gráfico da Figura 2.7 ilustra o comportamento da densidade de energia em função da duração do pulso laser para um tecido da córnea humana, distinguindo os dois processos.

Figura 2.7: Distinção entre os processos de ablação induzida por plasma e fotorrupura (tecido da córnea).



Fonte: retirado de [10].

A ablação induzida por plasma, assim como fotorrupção permitem processar materiais transparentes, tais como polímeros e também tem sido utilizada em diversas cirurgias não invasivas de células, tecidos e órgãos do corpo humano. Dentre as aplicações estão cirurgia de catarata, cirurgias refrativas da córnea, microcirurgia celular.

2.1.5 Ablação com pulsos ultracurtos

Um parâmetro importante na interação do feixe laser com o material é tempo de relaxamento térmico, que está relacionado com a dissipação do calor após a incidência do pulso laser. O tempo de relaxamento térmico τ_t , dado pela equação (2.10), é obtido quando o comprimento de difusão térmica $L_D = \sqrt{D_t \tau}$ (onde D_t é a difusividade térmica do material e τ é a largura do pulso) for igual ao comprimento de penetração óptica L_0 [53,10]. Esse parâmetro obedece a relação

$$\tau_t = \frac{L_0^2}{4D_t} . \quad (2.10)$$

Para pulsos lasers com duração $\tau > \tau_t$ o calor se difunde para além do comprimento de penetração óptica criando uma grande zona afetada termicamente (ZAT). Porém se $\tau < \tau_t$ a região aquecida é menor, fazendo com que a ablação seja mais restrita espacialmente, o que reduz os danos ao material. A Figura 2.8 mostra a diferença entre a ablação utilizando pulsos de nanossegundos e pulsos com largura de duração inferior a picossegundos.

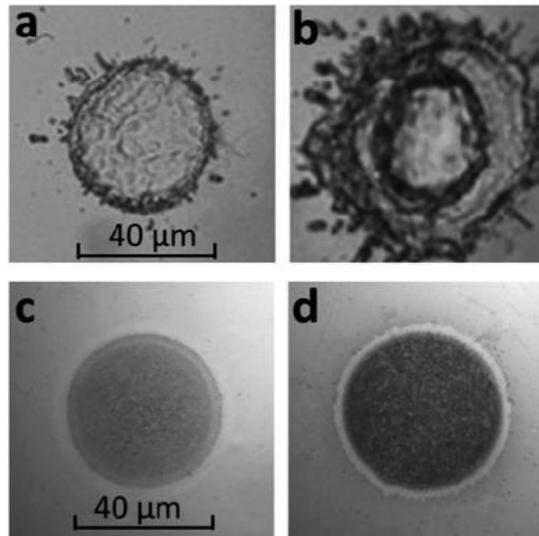
Figura 2.8: Distinção entre ablação utilizando lasers pulsados de nanossegundos (esquerda) e com pulsos ultracurtos (direita).



Na ablação com lasers de nanossegundos estão presentes microtrincas e fragmentos do material na superfície, além disso, é possível perceber o aparecimento de uma ZAT. Já na ablação com lasers de femtossegundos, na maioria dos casos, não surgem microtrincas e

fragmentos do material na superfície. Como em lasers de femtossegundos, a largura temporal do pulso é menor que o tempo de difusão térmica, a ZAT é reduzida significativamente. A Figura 2.9 mostra substratos de cobre ablacionados com lasers de nanossogundos e femtosegundos.

Figura 2.9: Ablação a laser em substratos de cobre. (a) 2 pulsos laser de 4,5 ns. (b) 10 pulsos laser de 4,5 ns. (c) 8 pulsos laser de 500 fs. (d) 40 pulsos laser de 500 fs.



Fonte: retirado de [54].

As Figuras 2.9 a e b mostram superfícies de cobre ablacionadas com um laser nanosssegundos, com comprimento de onda 1064 nm, taxa de repetição 2 Hz e largura temporal do pulso igual a 4,5 ns. Na ablação com laser de nanosssegundos, há tempo suficiente para o calor propagar-se e causar fusão e depois vaporização do material. Desta forma, o processo de ablação pode ser considerado como alterações transitórias do estado sólido para líquido e, finalmente, para o estado de vapor. Neste caso é possível observar a grande ZAT (Figuras 2.9 a e b).

As Figuras 2.9 c e d mostram superfícies de cobre que foram ablacionados com um laser de femtossegundos, com comprimento de onda 1030 nm, taxa de repetição 2 Hz e largura temporal do pulso igual a 500 fs. Já na ablação com laser de femtossegundos a ZAT é reduzida significativamente, como mostrado nas Figuras 2.9 c e d.

Outros dois parâmetros importantes em ablação de materiais a laser é a taxa de ablação (profundidade de ablação por pulso laser) e a fluência de limiar ou limiar de dano (densidade de energia mínima para ocorrer ablação). A partir de um modelo, conhecido como modelo unidimensional de duas temperaturas, é possível relacionar esses parâmetros com os parâmetros de irradiação [53]. Este modelo foi originalmente proposto para metais [55].

Aqui será tratado apenas o caso em que o tempo de duração do pulso da ordem de femtossegundos. Desta forma é possível encontrar a taxa de ablação d da expressão[53]

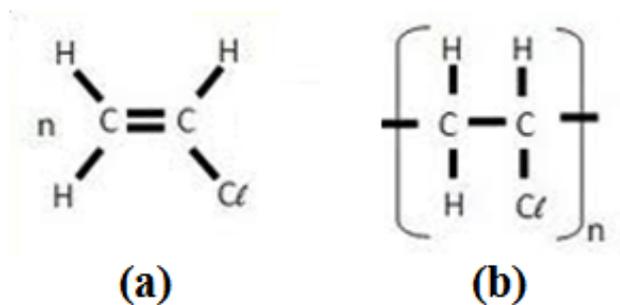
$$d = \frac{z}{n} = \frac{1}{\alpha} \ln \left(\frac{F}{F_{th}} \right), \quad (2.11)$$

Em (2.11) z é a profundidade de ablação, α é o coeficiente de absorção efetivo do material, n é o número de pulsos, F e F_{th} são as fluências, incidente e de limiar, respectivamente.

2.1.6 Ablação de PVC

Policloreto de vinila - PVC (nome IUPAC policloroeteno), de fórmula molecular $(C_2H_3Cl)_n$ é um polímero sintético obtido a partir da polimerização do monômero cloreto de vinila. A estrutura química do PVC é mostrada na Figura 2.10. O PVC possui diversas aplicações na indústria sendo um dos principais polímeros utilizados na fabricação de materiais médico-hospitalares como cateteres e bolsas para acondicionamento de sangue e plasma sanguíneo congelado.

Figura 2.10: Estrutura química do PVC. (a) Monômero cloreto de vinila. (b) Policloreto de vinila.



Em temperaturas acima de 200 °C o PVC sofre pirólise, sendo um dos principais produtos de sua decomposição térmica o ácido clorídrico - HCl. A decomposição térmica do PVC pode ser compreendida em duas etapas principais em que na primeira ocorre desidrocloração que resulta na liberação de HCl acompanhada da formação de cadeias poliênicas. Na segunda etapa após certa quantidade de cloro ter sido liberada as moléculas de polieno rearranjam-se e através de ciclização e ligações cruzadas formam hidrocarbonetos aromáticos e resíduos carbonáceos [56].

O processamento de PVC utilizando lasers também pode gerar materiais tóxicos devido ao efeito térmico induzido pelo laser. O corte de PVC com laser de CO₂ foi estudado por Vassie et. al [57], eles perceberam que durante a exposição ao laser eram gerados materiais tóxicos como benzeno e ácido clorídrico. A presença de HCl no corte com laser de CO₂ de PVC e outros polímeros com cloro em sua estrutura também tem sido relatada [58,59]. O HCl também foi observado no corte de PVC com laser pulsado no regime de nanossegundos [60]. Por esta razão, decidimos estudar a ablação de PVC com laser de femtossegundos, retirado de bolsas de sangue.

2.2 Materiais e métodos para avaliação de cortes de bolsas de sangue

2.2.1 Amostras

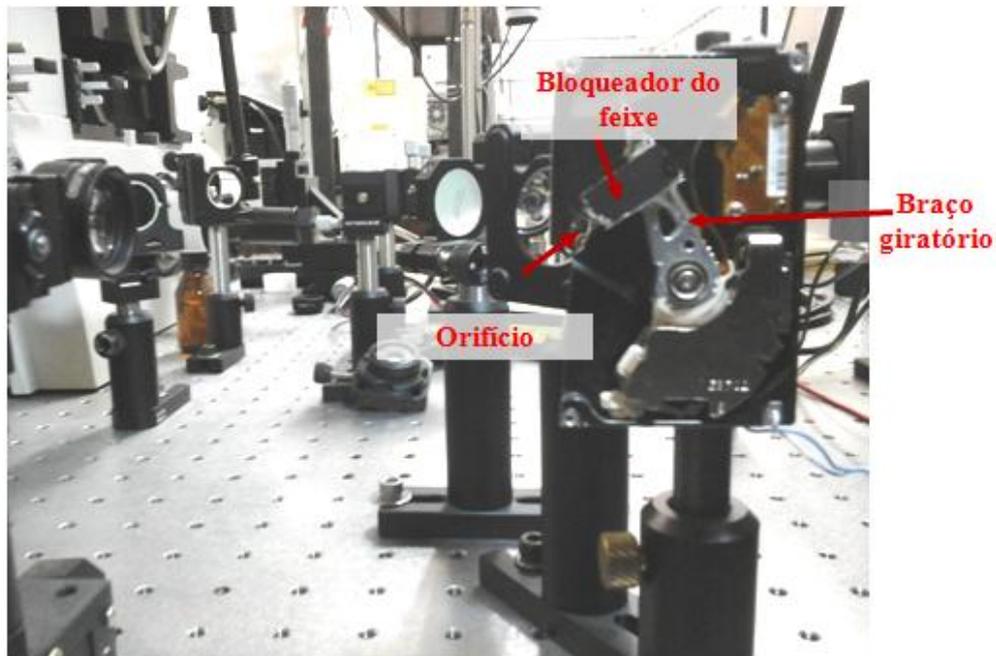
As amostras de Cloreto de polivinil (PVC) flexível e semitransparente foram retiradas de bolsas de sangue (Fresenius HemoCare Brasil, Fresenius Kabi Compoflex convencional). A espessura da amostra e a profundidade de ablação foi medida pela técnica de tomografia por coerência óptica – OCT (Ganamed, Thorlabs). Os diâmetros das perfurações foram analisados através de um microscópio óptico (Nikon – Eclipse TE2000) e um software de processamento de imagens (NI Vision – National Instruments).

2.2.2 Sistema para corte e determinação de tempo de perfuração de bolsas de sangue

Para realização dos experimentos de ablação em bolsas de sangue foi utilizado um laser de Ti:Safira com amplificador regenerativo (Libra-Coherent) com comprimento de onda centrado em 800 nm e pulsos de duração de 100 fs.

O tempo de exposição do laser na amostra foi controlado por um bloqueador (*shutter*) construído com um HD (descartado) de notebook. No braço giratório foi colado um pedaço de alumínio pintado de preto para evitar reflexões do feixe. Dependendo do circuito de controle, esse *shutter* pode alcançar tempos de respostas menores que 1 μ s [61]. Para controlar o *shutter* foi utilizado a plataforma de prototipagem eletrônica Arduino Mega que possui um microcontrolador ATmega 2560. O sentido de rotação do *shutter* “abre e fecha” foi controlado por uma ponte H através do CI L298N. O menor tempo de resposta (tempo para abrir e fechar) obtido para o *shutter* foi de 10 ms. A Figura 2.11 mostra uma foto do *shutter* construído.

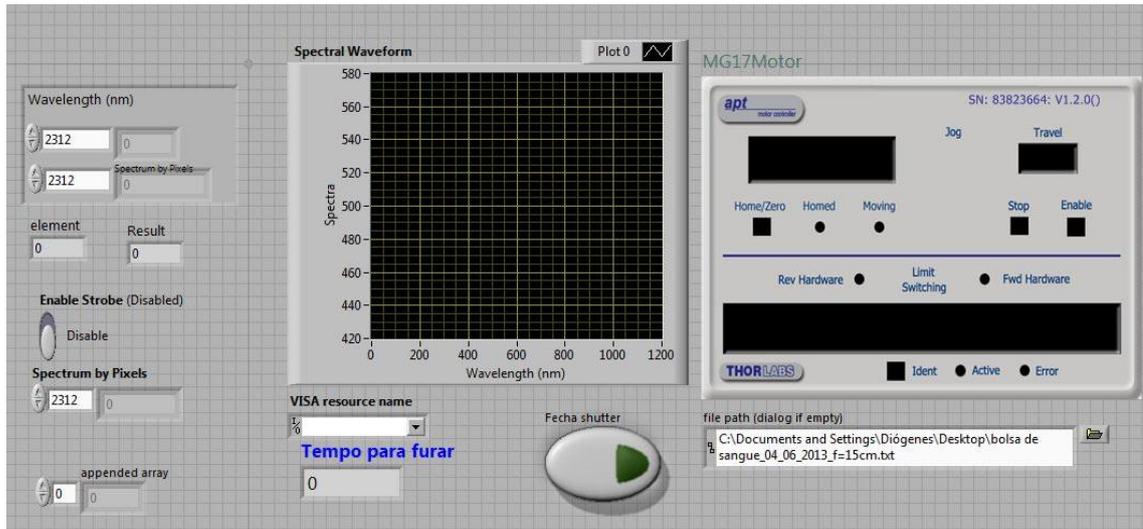
Figura 2.11: *Shutter* construído com HD de notebook.



Fonte: próprio autor.

Para determinação do tempo de perfuração em diferentes fluências um detector foi posicionado após a amostra. Inicialmente o *shutter* foi aberto e quando a amostra era perfurada completamente o detector enviava um sinal para o “*shutter*” fechar, e o tempo de perfuração foi determinado. O detector utilizado foi um espectrômetro Ocean Optics HR2000+ que detectava o sinal do laser. Após a amostra ser perfurada, a intensidade do sinal aumentava e a partir de certo valor de intensidade o software enviava um comando para o *shutter* fechar. O tempo entre a abertura do *shutter* e o seu fechamento determinava o tempo de perfuração. Um sistema de varredura construído com atuadores motorizados (Z825B - Thorlabs) e controladores de motores (T-CUBE – Thorlabs) permitia o deslocamento da amostra perpendicularmente e paralelamente a direção de incidência do feixe laser. Todo o controle foi realizado através da plataforma de programação Labview (National Instruments). O painel frontal do software de controle está mostrado na Figura 2.12.

Figura 2.12: Painel frontal do software de controle para medida do tempo de perfuração das amostras de PVC.



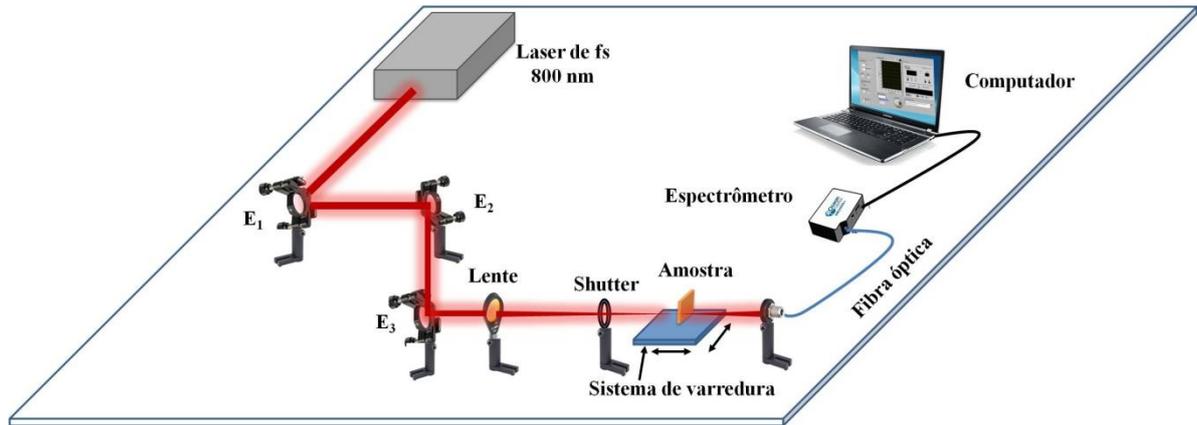
Fonte: próprio autor.

Na Figura 2.12 é mostrado o painel de controle para medida das amostras de PVC. A partir dele era possível controlar o *shutter* e os motores do sistema de varredura, assim como monitorar a intensidade do sinal no espectrômetro. O tempo de perfuração medido conforme descrito acima era gravado em um arquivo em formato *.txt* para posterior análise.

2.2.3 Determinação do tempo de perfuração das bolsas de sangue

Para determinação do tempo de perfuração das bolsas de sangue foram realizadas 200 perfurações para cada fluência incidente. O feixe foi focalizado através de uma lente de distância focal de 50 cm e incidiu perpendicularmente à superfície da amostra. As potências médias do laser variaram de 120 mW à 710 mW. A fluência foi variada de 2,1 até 12,6 J/cm² utilizando-se filtros de densidade neutra. Neste intervalo de fluência foram alcançadas intensidades de pico entre $2,1 \cdot 10^{13}$ e $1,3 \cdot 10^{14}$ W/cm² suficientes para ablacionar a amostra por ablação induzida por plasma e/ou fotorrupção. A taxa de repetição do laser utilizada foi de 10 Hz e 1 KHz. Foram realizadas 200 perfurações em cada amostra para cada fluência. Na Figura 2.13 está ilustrado o arranjo experimental para medições do tempo de perfuração das bolsas de sangue.

Figura 2.13: Arranjo experimental para ablação de bolsas de sangue e medidas do tempo de perfuração.



Fonte: próprio autor.

A taxa de ablação, que é definida como a razão entre a profundidade de ablação e o número de pulsos incidentes pode ser obtida a partir da equação (2.12).

$$d = \frac{e}{\tau_R \cdot t_p}, \quad (2.12)$$

onde d é a taxa de ablação, e é a espessura da amostra, τ_R (em Hertz) é a taxa de repetição do laser e t_p (em segundos) é o tempo para perfurar a amostra.

2.2.4 Determinação do diâmetro do feixe

Para ablação das amostras de PVC incidiu-se perpendicularmente à superfície da amostra um feixe com perfil gaussiano. Um feixe gaussiano em seu modo fundamental TEM_{00} , possui uma distribuição de irradiância $I(r, z)$ dada por

$$I(r, z) = I_0 e^{-\frac{2r^2}{w^2(z)}}, \quad (2.13)$$

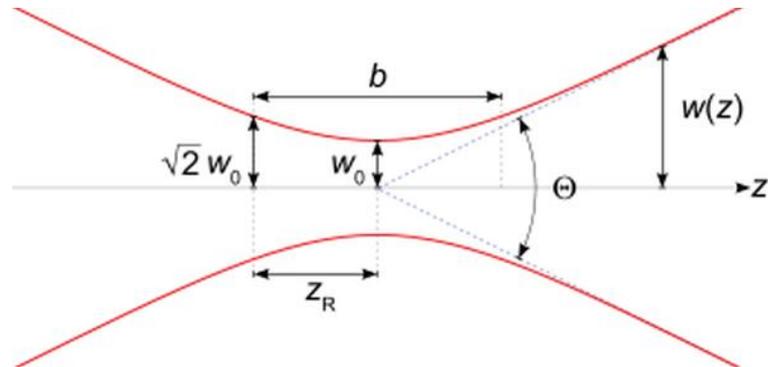
onde I_0 é a irradiância inicial e $w(z)$ é o raio do feixe e $2w(z)$ é o diâmetro do feixe a uma distância z a partir da saída do laser. O raio do feixe varia com z de acordo com

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \frac{z}{z_R}}, \quad (2.14)$$

onde $z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda}$, é o comprimento Rayleigh que determina o comprimento pelo qual o feixe propaga-se sem divergir significativamente. w_0 é a de cintura do feixe que representa o raio

mínimo que o feixe pode ter ao longo do seu percurso. A Figura 2.14 representa esquematicamente um feixe gaussiano detalhando cada parâmetro descrito acima.

Figura 2.14: Principais parâmetros de um feixe gaussiano



Na Figura 2.14 $\Theta = \lambda/\pi w_0$ representa a divergência do feixe para $z \gg z_R$.

Para um feixe gaussiano focalizado através de uma lente o diâmetro do feixe pode ser obtida de

$$2w_0 = \frac{4\lambda}{\pi} \left(\frac{f}{D} \right), \quad (2.15)$$

onde D é o diâmetro do feixe ao incidir na lente e f é a distância focal da lente.

O feixe laser foi focalizado através de uma lente de 50 cm. Esta lente foi escolhida para induzir um comprimento Rayleigh maior que a espessura da amostra. O diâmetro do feixe antes da lente foi de 6 mm. Através dos parâmetros de incidência e das equações discutidas acima foram obtidos teoricamente o raio mínimo do feixe $w_0 = 42\mu\text{m}$ e o comprimento Rayleigh $z_R = 0,7$ mm.

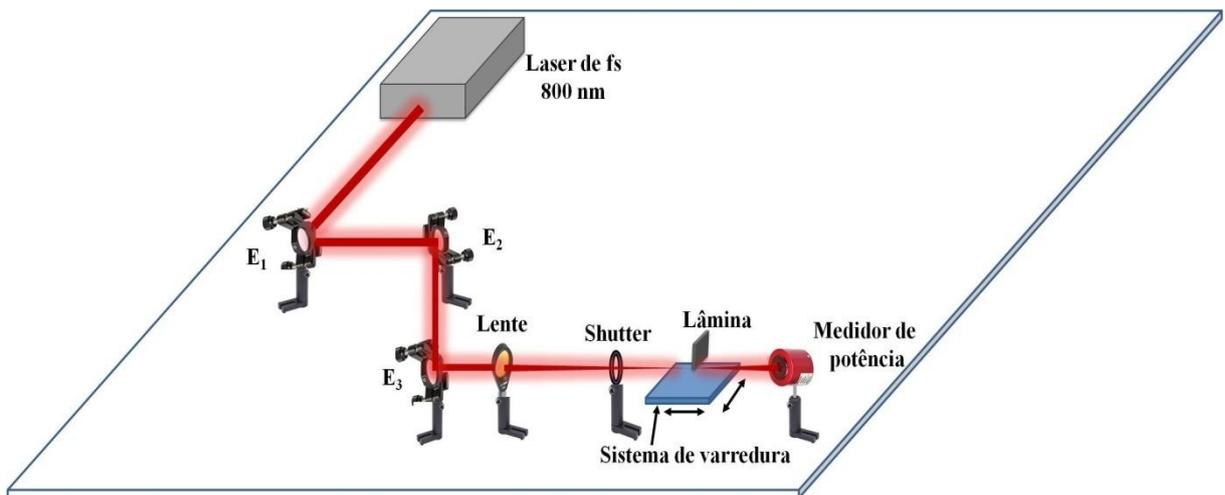
Experimentalmente existem alguns métodos para determinar a cintura do feixe [62,63,64]. Um dos mais utilizados é conhecido como método da lâmina (knife-edge) [64]. Neste método uma lâmina é transladada perpendicularmente à direção de propagação do feixe laser. Um detector é colocado após a amostra. Inicialmente a intensidade medida pelo detector é mínima, posição na qual o feixe está bloqueado completamente pela lâmina. À medida que a lâmina desloca-se, a intensidade medida pelo detector aumenta gradativamente até atingir seu valor máximo, posição na qual a lâmina não bloqueia mais o feixe. A relação entre a potência e o deslocamento é dada por [65]

$$P = \frac{P_{m\acute{a}x}}{2} \left[\operatorname{erf} \left(\frac{\sqrt{2}(x - x_0)}{w} \right) \right]. \quad (2.16)$$

P é a potência medida, $P_{m\acute{a}x}$ a potência máxima quando o feixe do laser não está bloqueado pela amostra, x representa a posição da lâmina em relação a posição inicial x_0 e erf é representada a função erro de Gauss [65].

A Figura 2.15 representa o arranjo experimental para a determinação do diâmetro do laser na região de corte.

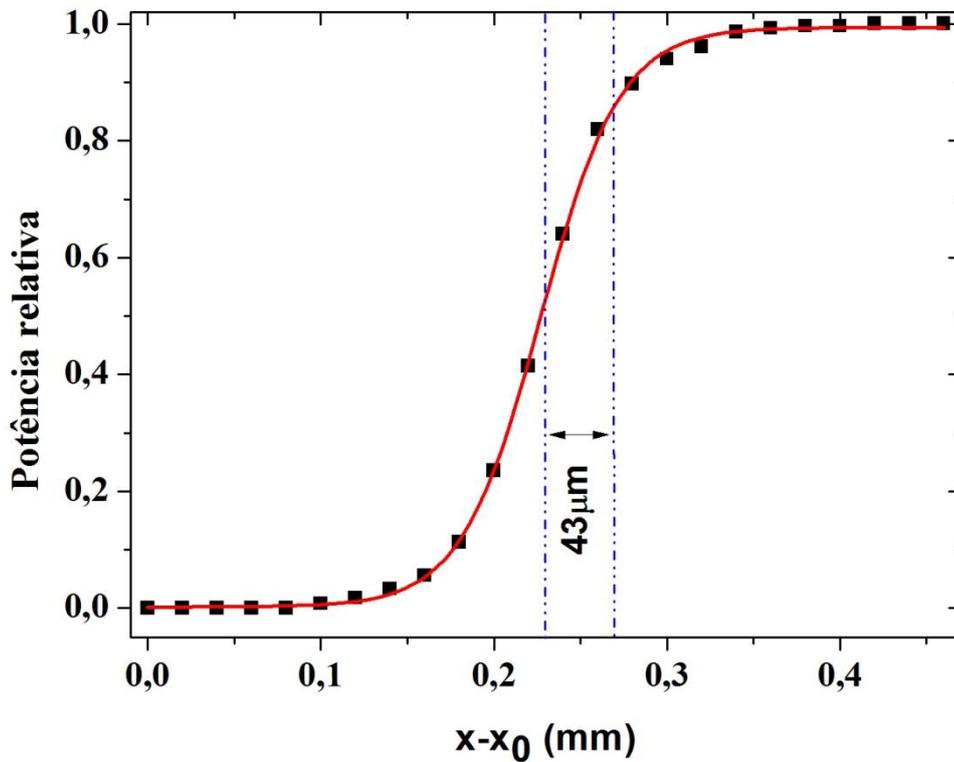
Figura 2.15: Arranjo experimental para determinação do diâmetro do laser.



Fonte: próprio autor.

O feixe laser foi direcionado na lâmina utilizando-se espelhos (E_1 , E_2 e E_3) que refletem no comprimento de onda de 800 nm e focalizado na lâmina por uma lente de distância focal igual a 50 cm. A lâmina foi deslocada por um sistema de varredura com passos de 200 μm na posição perpendicular à direção de incidência do feixe. A potência transmitida foi medida por um medidor de potência (Thorlabs - PMD100 - sensor S302C). As medições também foram realizadas em várias posições ao longo da direção do feixe e a posição focal foi determinada quando o raio do feixe medido foi mínimo. A Figura 2.16 mostra o gráfico da potência relativa em função da posição da lâmina.

Figura 2.16: Dependência da potência com o deslocamento da lâmina na posição focal.



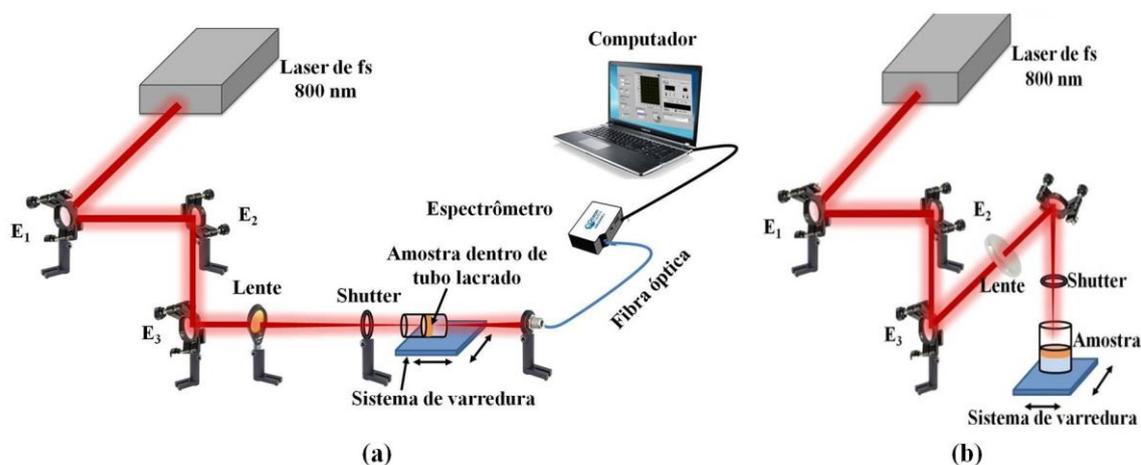
Fonte: próprio autor.

O raio mínimo do feixe é obtido quando a potência diminui de $1/e^2$ da potência inicial. A partir do ajuste do gráfico da Figura 2.16, o raio do laser na posição focal da lente foi determinado como sendo $43 \mu\text{m}$. Este valor é muito próximo do determinado a partir da equação (2.15) que foi $42 \mu\text{m}$.

2.2.5 Resíduos gasosos da ablação das bolsas de sangue

Para avaliar os resíduos gasosos durante a ablação de PVC com laser de femtossegundos foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento as amostras foram colocadas em tubos de ensaio que foram lacrados, conforme mostrado na Figura 2.17 (a).

Figura 2.17: Arranjo experimental para ablação de bolsas de sangue e análise de resíduos gasosos através de: (a) FTIR (b) medidas do pH.



Fonte: próprio autor.

Foram realizadas 100 perfurações em cada amostra para fluências variando de 2,1 até $12,6 \text{ J/cm}^2$ e para cada fluência foram realizadas três repetições. Após 1 h das perfurações os tubos foram levados a um espectrômetro FTIR (VERTEX 70 – Bruker) e os espectros de transmissão em função do número de onda foram coletados e gravados.

No segundo experimento as amostras foram colocadas em tubos de vidro com uma das extremidades abertas contendo 8 mL de água destilada deionizada conforme indicado na Figura 2.17 (b). As amostras foram presas por um anel de plástico com diâmetro menor que o diâmetro do tubo.

A Figura 2.17 (b) mostra o arranjo experimental para ablação das bolsas de sangue e medição do pH da água contida no tubo. Uma das superfícies da amostra ficou em contato com a água e a outra em contato com o ar. Este sistema experimental analisa indiretamente os resíduos da ablação da bolsa absorvidos pela água. O pH da água foi medido antes e depois da perfuração das amostras utilizando um pHmetro calibrado (Hanna Instruments – pH21). O eletrodo do pHmetro foi mergulhado na água contida no tubo e esperava-se cerca de 1 minuto até o pH estabilizar. Após cada medição, o eletrodo era lavado novamente com água deionizada.

Antes da perfuração as amostras foram deixadas por 10 minutos na água e o pH foi medido novamente para verificar se a introdução da amostra causava alguma alteração no mesmo. Foram realizadas 100 perfurações nas amostras para fluências entre 2,1 e $12,6 \text{ J/cm}^2$ e

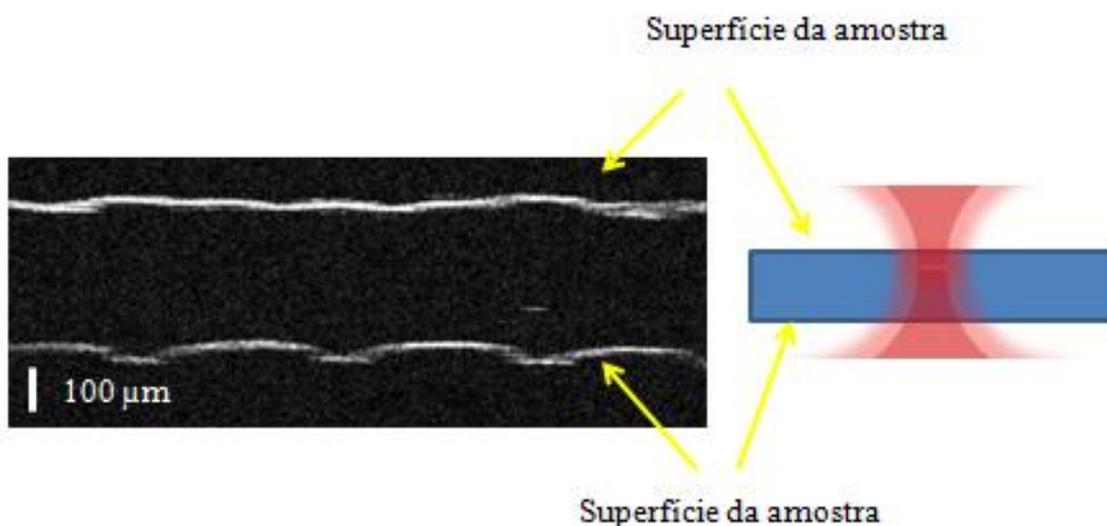
para cada fluência foram realizadas três repetições, com os tempos de exposição do laser na amostra determinados pelas medidas feitas anteriormente.

2.3 Resultados e discussões

2.3.1 Caracterização das amostras

A Figura 2.18 mostra a imagem de OCT de uma amostra de bolsa de sangue. As partes em branco da imagem, representam as superfícies da bolsa. O feixe laser foi focalizado na superfície superior da bolsa.

Figura 2.18: Imagem de uma amostra de bolsa de sangue obtida pela técnica de tomografia por coerência óptica (direita) e diagrama indicando procedimento de iluminação da amostra (esquerda).



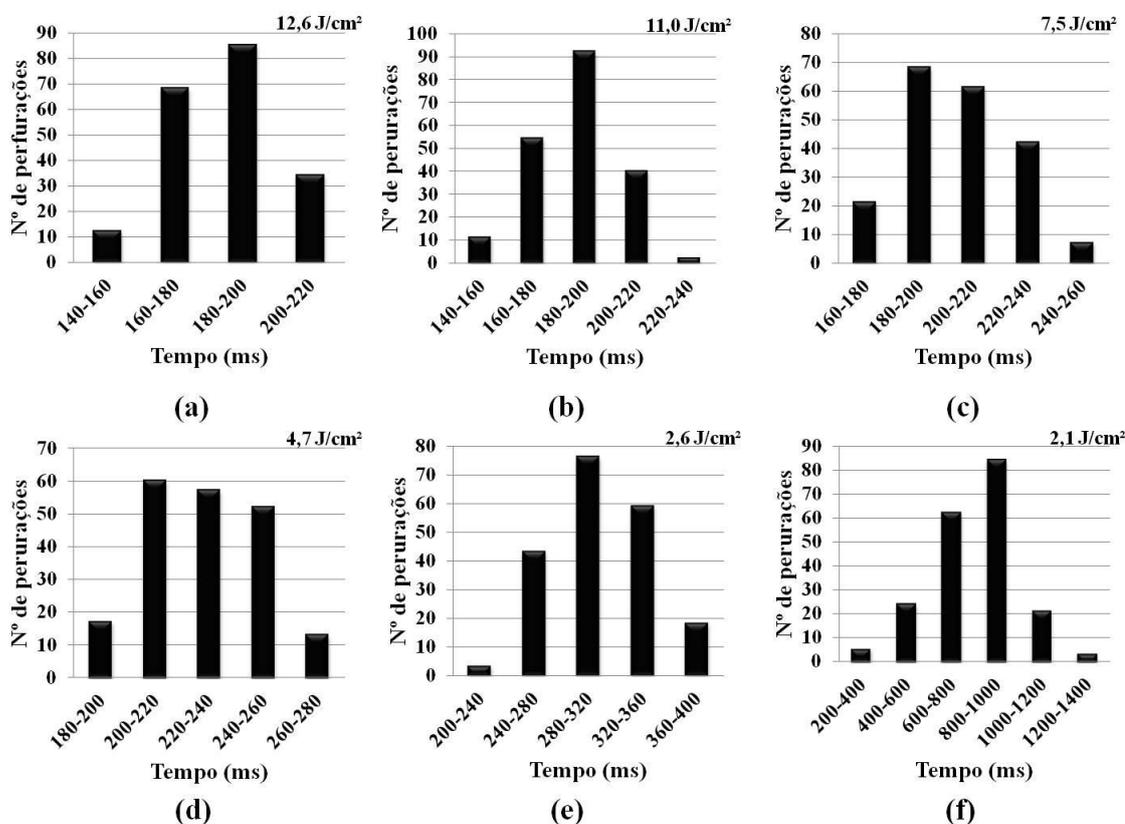
Fonte: próprio autor.

A partir das imagens de diferentes amostras e em diferentes posições da mesma amostra, a espessura da bolsa foi determinada como sendo aproximadamente 370 µm.

2.3.2 Tempo de perfuração das amostras de bolsas de sangue

O tempo de perfuração das bolsas de sangue foi determinado como descrito na seção 2.2.3. A fluência do laser foi variada entre 2,1 e 12,6 J/cm² e taxas de repetição do laser de 1 KHz e 10 Hz. A Figura 2.19 indica o tempo de perfuração, em milissegundos, para cada fluência utilizando a taxa de repetição de 1 KHz.

Figura 2.19: Tempo de perfuração para diferentes fluências. Taxa de repetição de 1 KHz.

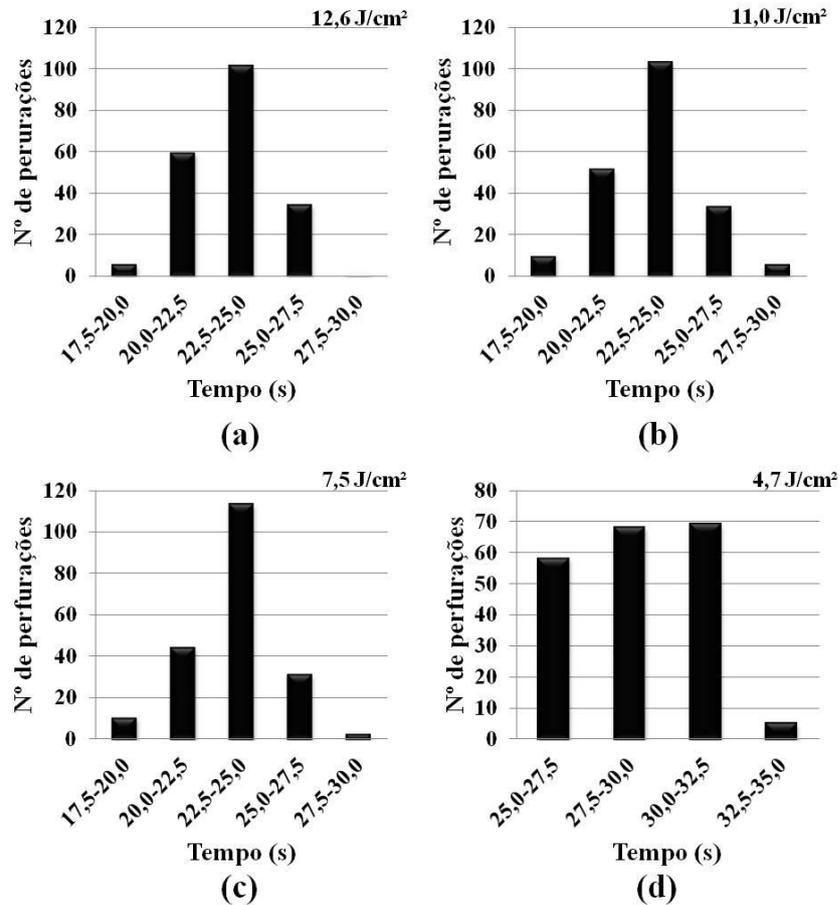


Fonte: próprio autor.

A partir da Figura 2.19 é possível observar que para as fluências de 12,6 J/cm², 11,0 J/cm² e 7,5 J/cm² a maior parte das perfurações levou um tempo entre 180 e 200 ms. Nos demais casos, ou seja, 4,7 J/cm², 2,6 J/cm² e 2,1 J/cm² a maior parte das perfurações levaram um tempo de 200 à 220 ms, 280 à 320 ms e 800 à 1000 ms, respectivamente.

A Figura 2.20 indica o tempo de perfuração, em segundos, para cada fluência utilizando a taxa de repetição de 10 Hz.

Figura 2.20: Tempo de perfuração para diferentes fluências. Taxa de repetição de 10 Hz.



Fonte: próprio autor.

A partir da Figura 2.20 é possível observar que para as fluências de $12,6 J/cm^2$, $11,0 J/cm^2$ e $7,5 J/cm^2$ a maior parte das perfurações levaram um tempo entre 22,5 e 25,0 segundos. Já para fluência de $4,7 J/cm^2$ a quase totalidade das perfurações levaram um intervalo de tempo entre 25,0 e 32,5 segundos.

A Tabela 2.1 apresenta os tempos médios de perfuração para as taxas de repetição de 1 KHz e 10 Hz.

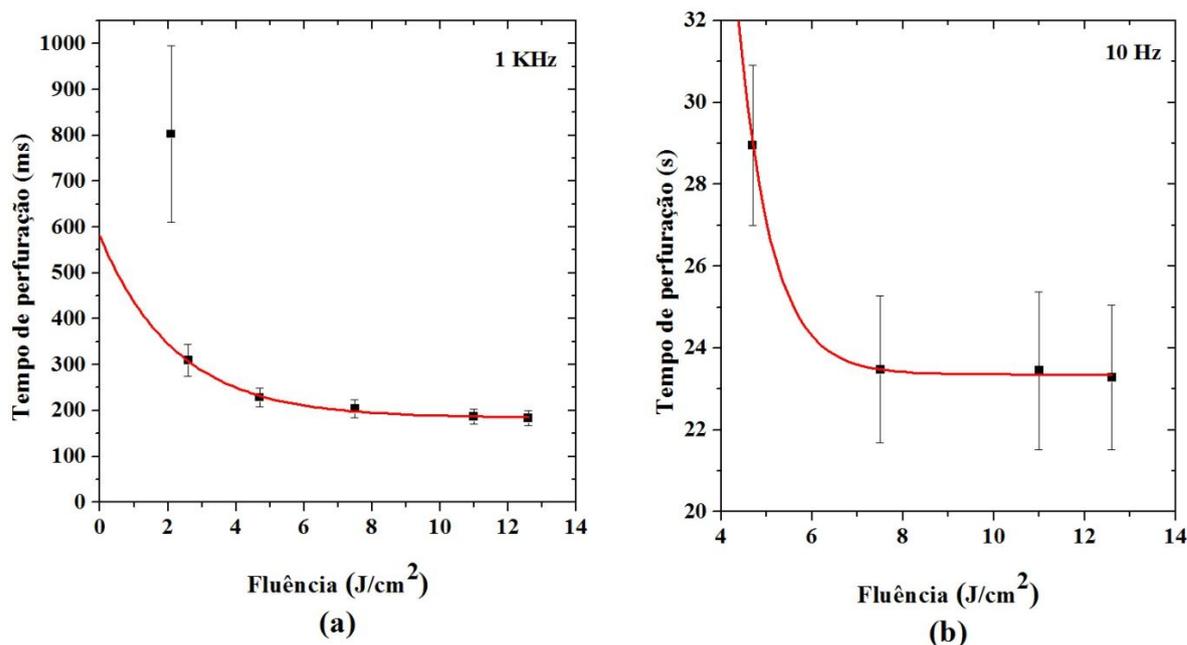
Tabela 2.1: Tempos médios de perfuração das amostras de bolsas de sangue para cada fluência. Taxas de repetição de 1 KHz e 10 Hz.

Fluência (J/cm^2)	Tempo médio de perfuração	
	(s)	(s)
	1 kHz	10 Hz
2,1	$0,8 \pm 0,2$	-
2,6	$0,3 \pm 0,03$	-
4,7	$0,2 \pm 0,02$	23 ± 2
7,5	$0,2 \pm 0,02$	23 ± 2
11,0	$0,19 \pm 0,02$	24 ± 2
12,6	$0,18 \pm 0,02$	29 ± 2

Fonte: próprio autor.

Os erros associados aos tempos, na Tabela 2.1, foram obtidos pelo desvio padrão entre as duzentas perfurações realizadas, para cada fluência do laser. É possível observar a partir dos resultados da Tabela 2.1 que os tempos de perfuração para fluências entre 7,5 e 12,6 J/cm^2 são próximos. Já para a fluência de 2,1 J/cm^2 esse tempo é cerca de 2,5 vezes maior que para a fluência de 2,6 J/cm^2 (1 kHz). A Figura 2.21 mostra o comportamento do tempo de perfuração em função da fluência incidente do laser.

Figura 2.21: Dependência do tempo de perfuração das bolsas de sangue com a fluência incidente para as taxas de repetição: (a) 1 KHz. (b) 10 Hz.



Fonte: próprio autor.

Verifica-se pelo gráfico da Figura 2.21 uma dependência não linear do tempo de perfuração com a fluência aplicada. A linha em vermelho é um ajuste exponencial dado por

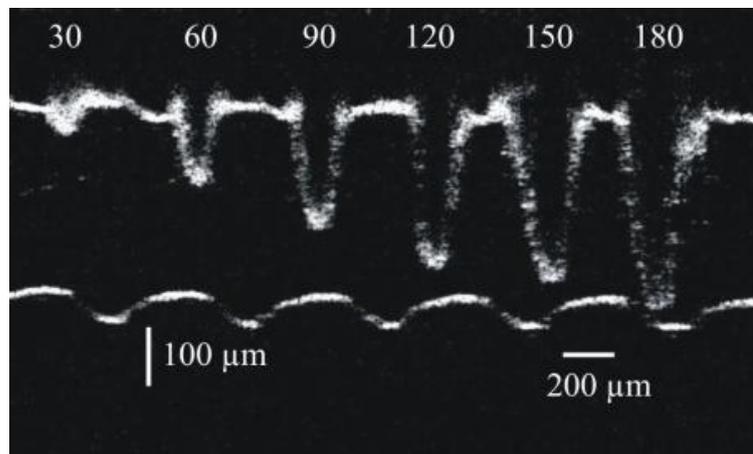
$$t(F) = A_0 + A_1 e^{-\frac{F}{F_{th}}}, \quad (2.17)$$

onde A_0 e A_1 são constantes de ajustes e F_0 é a fluência mínima para perfuração da amostra. O valor obtido para o tempo de perfuração (803 ms) para fluência de $2,1 \text{ J/cm}^2$ não é considerado no ajuste da equação (2.17), o que indica uma limitação para o modelo utilizado de ablação a laser. Este resultado pode ser explicado devido ao fato de o material absorver a radiação laser não linearmente e desta forma o tempo de perfuração vai depender da intensidade do laser aplicada

2.3.3 Profundidade de ablação e taxa de ablação

A profundidade de ablação em função do número de pulsos foi determinada para a fluência de $12,6 \text{ J/cm}^2$ e taxa de repetição de 1 KHz. A Figura 2.22 apresenta a imagem de OCT para ablação de bolsa de sangue utilizando diferentes números de pulsos.

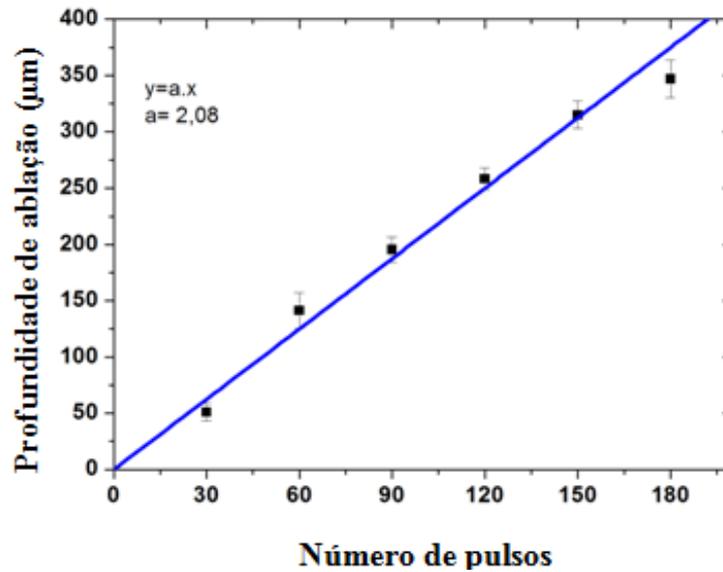
Figura 2.22: Ablação de bolsa de sangue com diferentes números de pulso e fluência de $12,6 \text{ J/cm}^2$.



Fonte: próprio autor.

A partir da Figura 2.22 é possível notar o comportamento da profundidade de ablação com o número de pulsos incidente, tal fato pode ser confirmado a partir do gráfico da Figura 2.23, que relaciona a profundidade de ablação como função do número de pulsos para a fluência de $12,6 \text{ J/cm}^2$.

Figura 2.23: Profundidade de ablação em função do número de pulsos para fluência de $12,6 \text{ J/cm}^2$.



Fonte: próprio autor.

Na Figura 2.23 cada ponto do gráfico corresponde a média de 25 valores obtidos para a profundidade de ablação e as barras de erro correspondem ao desvio padrão entre as 25 medições. Pode-se observar a dependência linear da profundidade de ablação com o número de pulsos. A inclinação da relação linear entre o número de pulsos e a profundidade de ablação depende da fluência aplicada e da taxa de repetição do laser [13,66].

A partir do gráfico da Figura 2.23 também é possível determinar a taxa de ablação, razão entre a profundidade de ablação e o número de pulsos, através da inclinação da reta. Para a fluência de $12,6 \text{ J/cm}^2$ a taxa de ablação é de aproximadamente $2,1 \text{ µm/pulso}$.

A taxa de ablação foi determinada a partir da equação (2.12) e estão representadas para diferentes fluências e para as taxas de repetição de 1 KHz e 10 Hz na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Taxas de ablação para cada fluência para taxas de repetição de 1 KHz e 10 Hz.

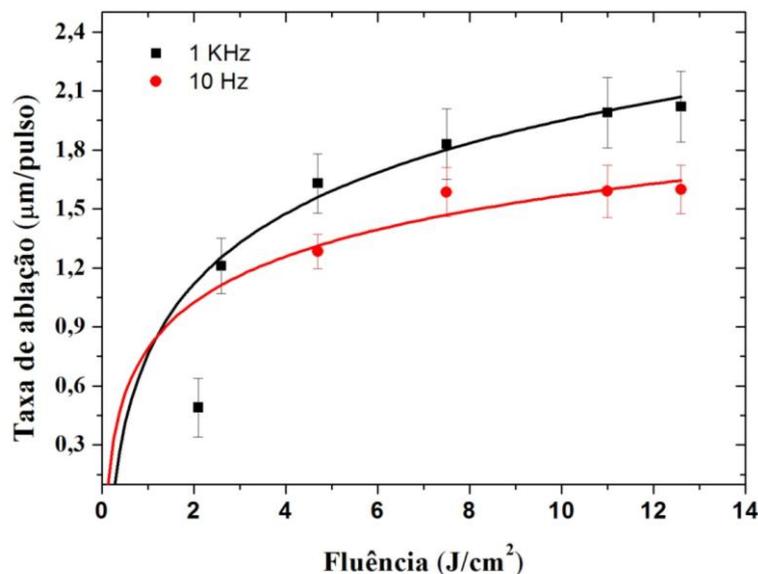
Fluência (J/cm^2)	Taxa de ablação (µm/pulso)	
	1 KHz	10 Hz
2,1	$0,5 \pm 0,1$	-
2,6	$1,2 \pm 0,1$	-
4,7	$1,6 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$
7,5	$1,8 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,1$
11,0	$2,0 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,1$
12,6	$2,0 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,1$

Fonte: próprio autor.

Os erros associados aos tempos, na Tabela 2.2, foram obtidos pelo desvio padrão entre as duzentas perfurações realizadas, para cada fluência do laser. A partir dos resultados apresentados na Tabela 2.2 é possível perceber um aumento na taxa de ablação com o aumento da fluência aplicada até chegar a uma região de saturação. Observa-se também que a taxa de ablação é maior para a taxa de repetição do laser de 1 KHz que de 10 Hz. A dependência da taxa de ablação em polímeros para diferentes taxas de repetições do laser têm sido relatada na literatura utilizando-se lasers com comprimento de onda na região do ultravioleta [16,67,68] e infravermelho [16,69]. Lee e colaboradores [16] mostraram que a taxa de ablação para polietileno (PE) é maior em taxas de repetição do laser maiores. Para fluências variando de 1 a 10 J/cm² os autores obtiveram taxas de ablação entre 0,8 e 1,8 μm/pulso ($\tau_R = 10$ Hz, $\lambda = 266$ nm) e 0,5 e 2,0 μm/pulso ($\tau_R = 10$ Hz, $\lambda = 800$ nm), enquanto que para 1 KHz os resultados obtidos variavam de 1,2 a 3,0 μm/pulso ($\lambda = 266$ nm) e 0,5 a 2,5 μm/pulso ($\lambda = 800$ nm). O aumento na taxa de ablação com o aumento da taxa de repetição do laser pode estar relacionado com efeitos térmicos cumulativos[16,67,68].

A dependência da taxa de ablação com a fluência e com a taxa de repetição do laser é mostrada na Figura 2.24.

Figura 2.24: Profundidade de ablação em função do número de pulsos para fluência de 12,6 J/cm².



Fonte: próprio autor.

No gráfico da Figura 2.24 as linhas sólidas representam os ajustes a partir da equação (2.12). O valor obtido para o tempo de perfuração (0,5 μm/pulso) para fluência de 2,1 J/cm² não é considerado no ajuste. Para fluência de 2,4 J/cm², por exemplo, obtém taxas de ablação

de 1,2 $\mu\text{m}/\text{pulso}$ e 1,1 $\mu\text{m}/\text{pulso}$ para taxas de repetição de 1 KHz e 10 Hz, respectivamente. Em particular, usando laser de excímero com comprimento de onda de 248 nm, a taxa de ablação, em PVC, foi determinada como sendo 0,65 $\mu\text{m}/\text{pulso}$ [70]. Este resultado mostra que o processo de ablação induzida por plasma com laser de femtossegundos no infravermelho de geração de plasma é mais eficiente na ablação de PVC do que o processo de fotoablação, pois a taxa de ablação obtida foi quase o dobro que o obtido na referência [70]. Além disso, para a fluência de 12,6 J/cm^2 obtém-se uma taxa de ablação de 2,0 $\mu\text{m}/\text{pulso}$ através do gráfico da Figura 2.24. Este valor é muito próximo que o obtido através do ajuste linear do gráfico da Figura 2.23 que foi de 2,1 $\mu\text{m}/\text{pulso}$. A partir dos ajustes da Figura 2.24 é possível determinar também a fluência de limiar F_0 , que é o menor valor de fluência para ocorrer ablação no material. Os valores obtidos para a fluência de limiar foram de 220 mJ/cm^2 para a taxa de repetição de 1 KHz e 95 mJ/cm^2 para 10 Hz.

2.3.4 Diâmetro das perfurações

As amostras foram completamente perfuradas e os diâmetros de entrada e saída foram medidos utilizando microscopia óptica. A Figura 2.25 ilustra os furos de entrada (superfície superior) e de saída (superfície inferior) após a bolsa de sangue ser completamente perfurada.

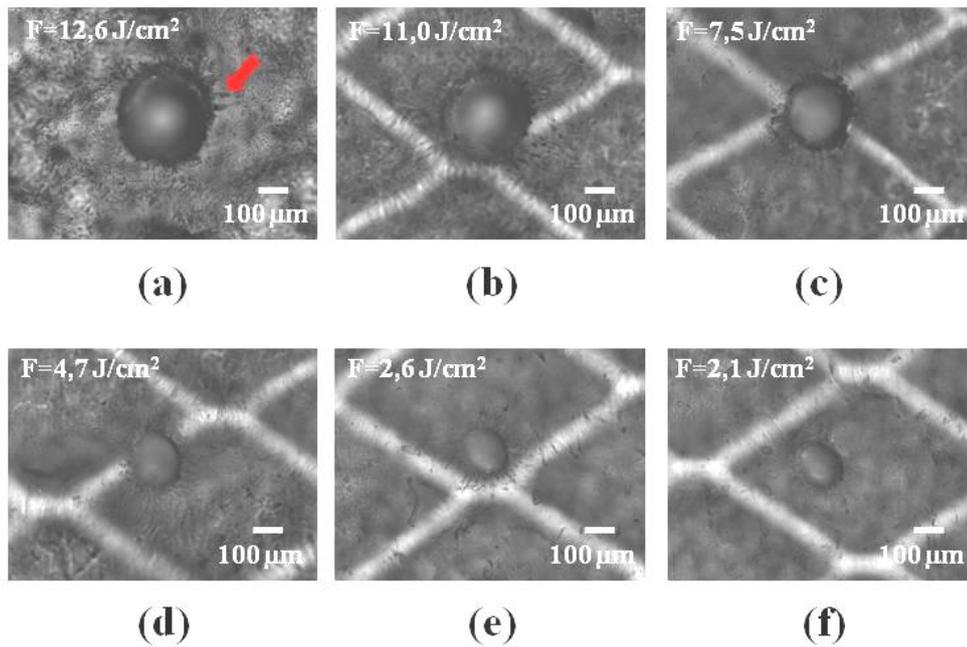
Figura 2.25: Representação dos furos de entrada e saída após perfuração.



Fonte: próprio autor.

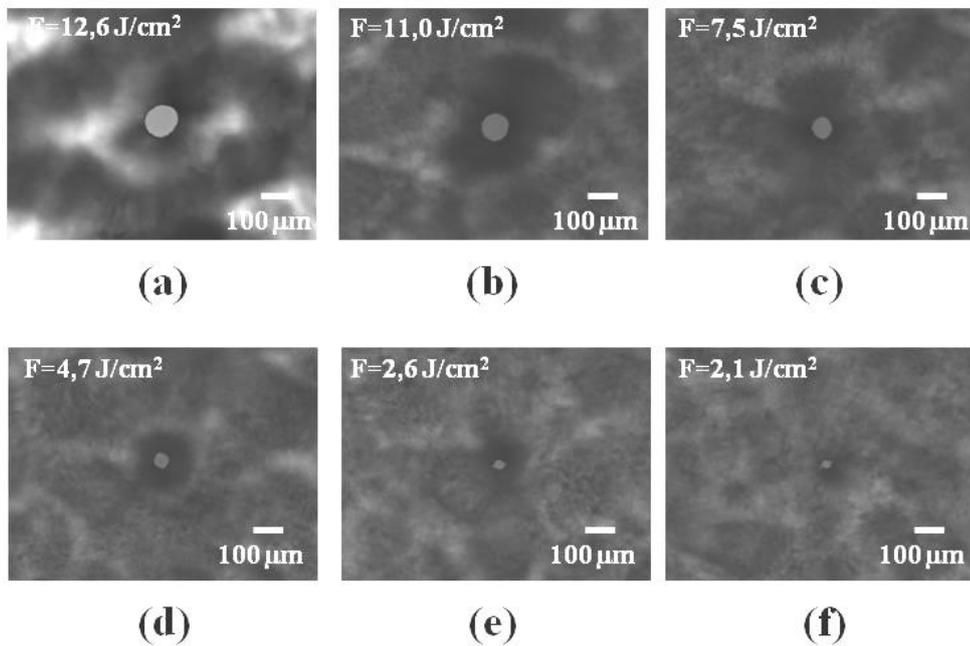
As Figura 2.26 e Figura 2.27 mostram as imagens de microscopia óptica dos diâmetros de entrada e de saída, respectivamente, das amostras perfuradas para diferentes fluências utilizando a taxa de repetição de 1 KHz.

Figura 2.26: Imagem de microscopia óptica das superfícies ablacionadas (entrada do feixe) para diferentes fluências e taxa de repetição de 1 KHz.



Fonte: próprio autor.

Figura 2.27: Imagem de microscopia óptica das superfícies ablacionadas (saída do feixe) para diferentes fluências e taxa de repetição de 1 KHz.

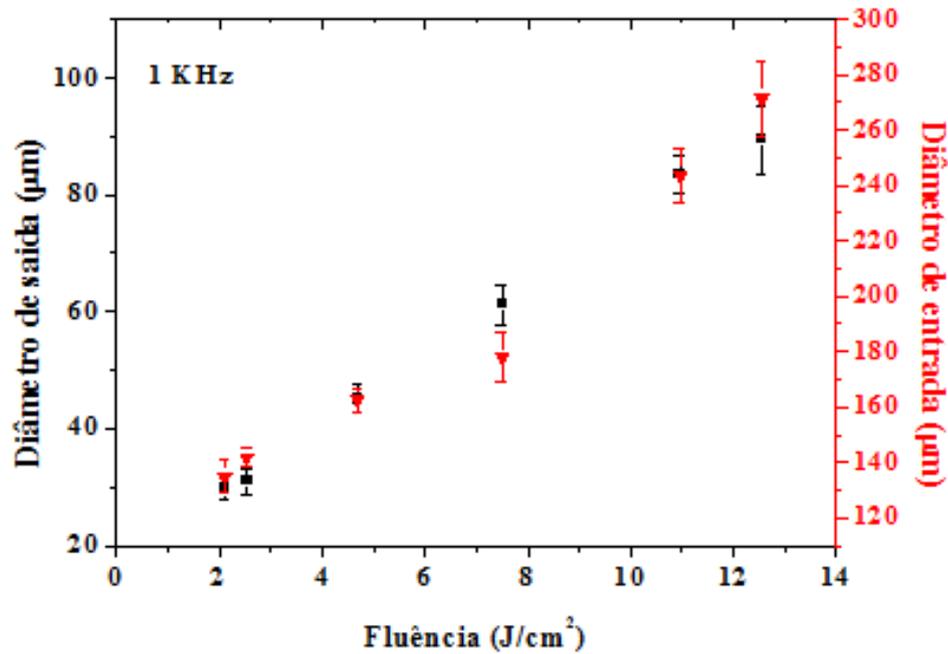


Fonte: próprio autor

A partir das Figura 2.26 e Figura 2.27 é possível notar uma diminuição do diâmetro da superfície ablacionada quando a fluência incidente diminui. Também é possível perceber a presença de material redepositado na superfície do material, indicado pela seta vermelha na

Figura 2.26 (a), principalmente para fluências maiores. O comportamento do diâmetro de entrada e de saída das amostras perfuradas em função da fluência é mostrado na Figura 2.28.

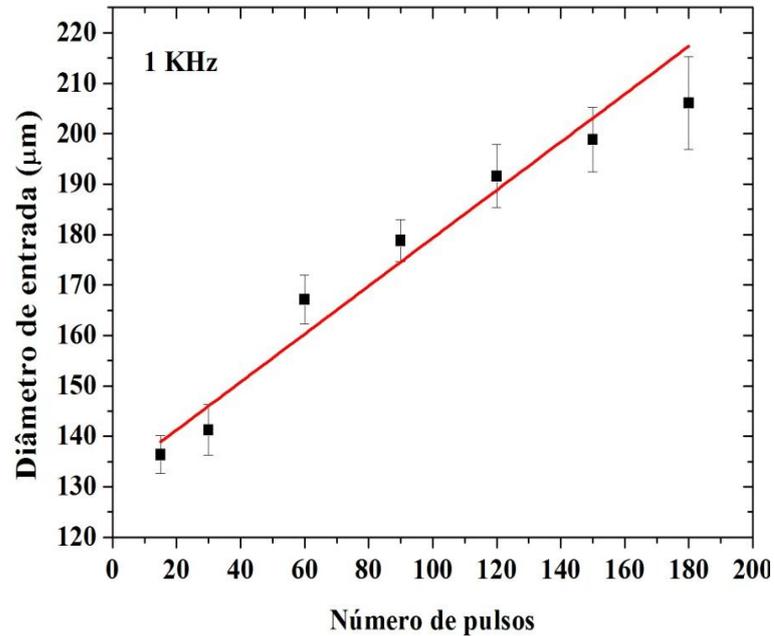
Figura 2.28: Diâmetro de entrada (▼) e de saída (■) de bolsas de sangue perfuradas em função da fluência incidente.



Fonte: próprio autor.

A partir da Figura 2.28 é possível perceber um comportamento semelhante do diâmetro do furo de saída e entrada com a variação da fluência incidente. Este resultado indica que a variação da fluência não interfere significativamente na morfologia interna das microperfurações. A Figura 2.29 representa o comportamento do diâmetro de entrada das superfícies ablacionadas em função do número de pulsos para fluência de $12,6 \text{ J/cm}^2$ e taxa de repetição de 1 KHz.

Figura 2.29: Diâmetro de entrada das superfícies ablacionadas em função do número de pulsos para fluência de $12,6 \text{ J/cm}^2$ e taxa de repetição de 1 KHz.



Fonte: próprio autor.

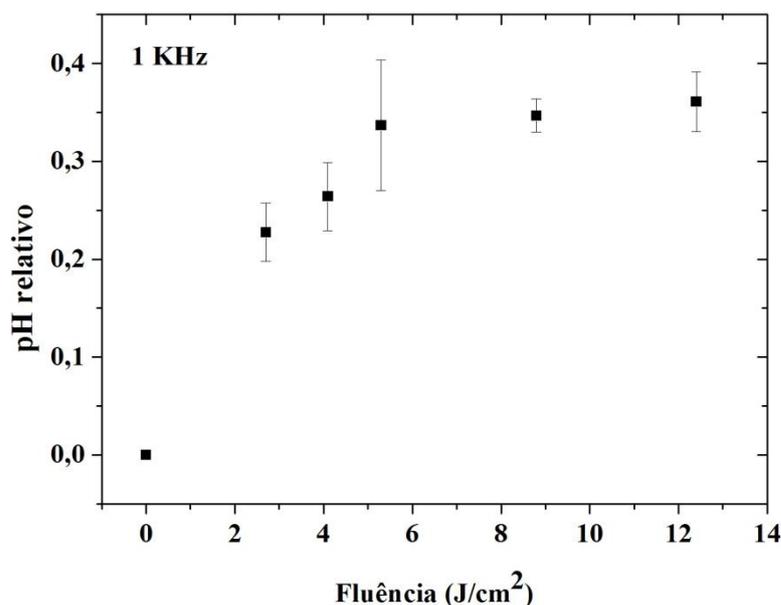
Na Figura 2.29 cada ponto do gráfico corresponde a média de 10 valores obtidos para os diâmetros de entrada e saída e as barras de erro correspondem ao desvio padrão entre as 10 medições. Pode-se observar a dependência linear da profundidade de ablação com o número de pulsos.

2.3.5 Estudo dos resíduos gasosos durante o processo de ablação

Conforme já mencionado, para a avaliação dos resíduos liberados com a ablação do PVC, foi analisado o pH do volume de água sob a amostra (configuração experimental da Figura 2.17 b). A Figura 2.30 mostra o gráfico do comportamento da variação relativa do pH (pH relativo) em função da fluência aplicada. O pH relativo é definido pela equação (2.18).

$$pH_{relativo} = \frac{pH_{antes} - pH_{depois}}{pH_{antes}} \quad (2.18)$$

Figura 2.30: pH relativo em função da fluência.

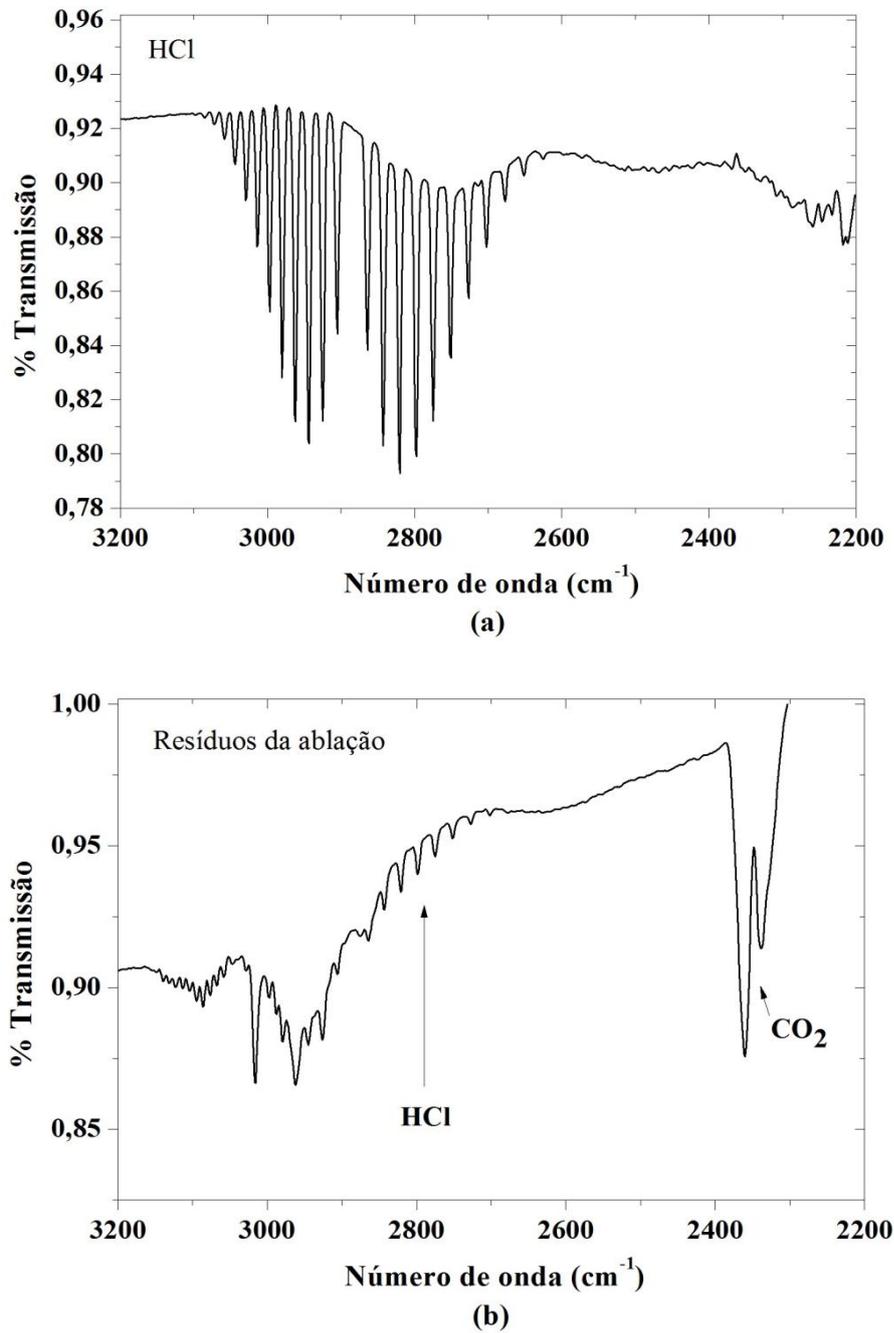


Fonte: próprio autor.

Na Figura 2.30, cada ponto do gráfico corresponde a média de 4 valores obtidos para os pHs, antes e depois da ablação, e as barras de erros correspondem ao desvio padrão entre as 4 medições. Pelo gráfico da Figura 2.30 pode-se perceber que o pH reduz com o aumento da fluência, indicando que o processo de ablação de PVC por laser de femtossegundos gera resíduos na água. Considerando que o HCl é o principal resíduo que altera o pH da amostra, a concentração de resíduo foi determinada. Os resultados obtidos após perfuração da amostra (~250 pulsos) indicou que a concentração de HCl diminuiu de $3,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L ($24,3 \cdot 10^{-9}$ mols) para $0,6 \cdot 10^{-6}$ mol/L ($0,8 \cdot 10^{-9}$ mols) quando a fluência diminuiu de $12,4 \text{ J/cm}^2$ para $2,7 \text{ J/cm}^2$. Estes valores são menores que os obtidos na ablação de PVC com laser de CO₂ nos mesmos intervalos de fluência [59].

Os resíduos gasosos resultantes da ablação foram avaliados por espectroscopia FTIR. Para tal, a configuração experimental indicada na Figura 2.17 a foi utilizada e as amostras, em recipiente lacrado, foram avaliadas. A Figura 2.31 apresenta os espectros obtidos do HCl em sua forma gasosa (a) e dos resíduos gasosos do processo de ablação (b).

Figura 2.31: Espectro FTIR: (a) HCl na forma gasosa. (b) Resíduos gasosos da ablação para fluência de 12,4 J/cm².



Fonte: próprio autor.

A Figura 2.31 mostra o espectro FTIR dos resíduos gasosos após a ablação das bolsas de sangue com laser de femtossegundos para uma fluência de 12,4 J/cm². É possível observar os picos referentes ao HCl e CO₂ indicando a presença desses gases. Para fluências mais baixas não foi possível observar esses picos no espectro FTIR devido as limitações do espectrômetro utilizado.

Neste capítulo foram avaliados alguns parâmetros da ablação a laser de bolsas de sangue como tempo de perfuração, taxa de ablação e diâmetro dos furos para diferentes fluências e taxas de repetição do laser. Estes parâmetros mostraram uma dependência com o aumento da fluência e da taxa de repetição do laser. Na taxa de repetição de 10 Hz o tempo de perfuração foi maior que 20 segundos, o que indica que o corte das bolsas com lasers de fs nessa taxa de repetição é inapropriado para um processo industrial. Pois neste caso o corte completo de uma bolsa levaria um tempo de alguns minutos. Já na taxa de repetição de 1 KHz pôde-se constatar que o tempo de perfuração não variou muito entre as fluências de 4,7 e 12,6 J/cm². Neste caso seria mais viável fazer o corte com a fluência de 4,7 J/cm², pois para fluências menores a emissão de HCl é menor, como foi constatado nas medições de pH. A avaliação dos parâmetros de ablação à laser de bolsas de sangue consiste em um estudo pioneiro e introduz um novo direcionamento no processo de corte delas.

3. AVALIAÇÃO DE ELASTICIDADE DE HEMÁCIAS

As hemácias, também chamadas de eritrócitos, são células do sangue produzidas principalmente pela medula óssea por um processo denominado eritropoiese. Após atingir a maturação, as hemácias de humanos normais tornam-se células anucleadas e possuem uma forma discóide bicôncava com diâmetro variando entre 6 e 8 μm e espessura entre 2,0 e 2,5 μm [71]. A Figura 3.1 mostra uma imagem de microscopia eletrônica de varredura de hemácias normais.

Figura 3.1: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de hemácias normais.



Fonte: retirado de [71].

A cor vermelha das hemácias deve-se a alta concentração de hemoglobina, proteína cuja principal função é transportar oxigênio através dos vasos sanguíneos para os tecidos. As hemácias permanecem em média 120 dias na corrente sanguínea e durante este tempo necessitam passar por vasos menores que seu diâmetro. Para passar por tais microvasos e desempenhar sua função de transporte de oxigênio, as hemácias deformam-se e depois retornam a sua forma original [71,72].

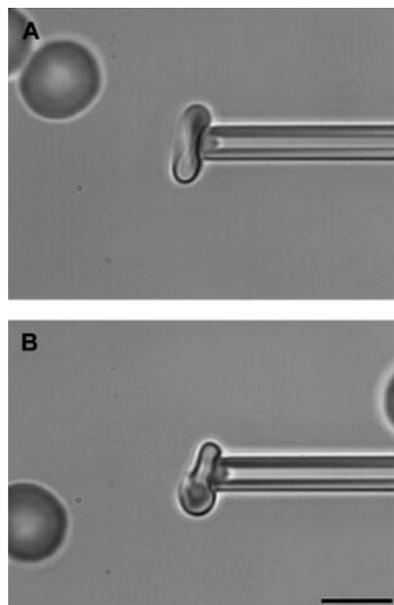
A capacidade de deformação dos eritrócitos depende, principalmente, de sua geometria, das propriedades viscosas do conteúdo citoplasmático e das propriedades viscosas da membrana plasmática [72]. A diminuição na capacidade de deformação das hemácias pode comprometer a entrega de oxigênio aos tecidos.

Várias técnicas têm sido utilizadas para avaliar as propriedades elásticas de hemácias. Estas técnicas podem ser classificadas em técnicas que medem a elasticidade utilizando o sangue completo ou suspensões de hemácias diluídas, fornecendo um valor médio, e em técnicas que permitem avaliar a elasticidade de células individuais [72]. Com relação ao

primeiro grupo de técnicas podemos citar métodos viscosimétricos como a ectacitometria [73]. A grande desvantagem dessas técnicas é a possibilidade de poder avaliar, apenas as propriedades elásticas de um grande grupo de células, não permitindo mostrar diferenças nessas propriedades de uma determinada população como, por exemplo, em células velhas e jovens presentes na corrente sanguínea. O segundo grupo de técnicas permite avaliar as propriedades elásticas de uma única célula. Destacam-se a aspiração por micropipeta, microscopia de força atômica (AFM), citometria óptica de torção magnética (Optical Magnetic Twisting Cytometry - OMTTC) e pinças ópticas (Optical Tweezers – OT) [72,73].

A técnica de aspiração por micropipeta foi uma das primeiras para avaliar as propriedades mecânicas de hemácias. Consiste em sugar uma única hemácia através de um tubo capilar com uma determinada pressão. A técnica permite medir propriedades geométricas (área superficial e volume) e elásticas (módulo de cisalhamento, flexão e compressibilidade superficial), porém tais medidas dependem do diâmetro da pipeta usada nos experimentos [72]. A Figura 3.2 mostra uma hemácia sendo aspirada por uma micropipeta.

Figura 3.2: Hemácia aspirada através de uma micropipeta de diâmetro interno 1,3 μm .



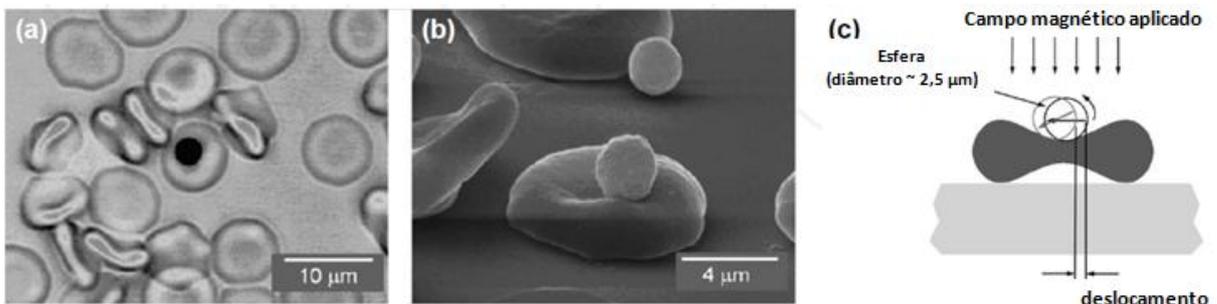
Fonte: retirado de [74].

Propriedades mecânicas de células também podem ser medidas utilizando-se a técnica de microscopia de força atômica (AFM – atomic force microscopy). Essa técnica consiste em varrer a superfície da amostra por uma ponteira (sonda). A interação entre a superfície da

amostra e a ponteira, corresponde à força entre os átomos da amostra e aqueles da ponta que digitaliza a sua superfície. A ponteira é fabricada sob um cantilever flexível. A interação entre a amostra e a ponteira causa a flexão ou torção do cantilever de uma forma proporcional à força de interação. Um laser que está focalizado no cantilever detecta qualquer flexão ou torção deste e o feixe refletido é direcionado para um fotodetector. A deflexão do cantilever devido à interação com a superfície da amostra durante a varredura é traduzida em uma imagem tridimensional da superfície.

Outra técnica que tem sido utilizada para analisar propriedades elásticas de células é conhecida como citometria óptica de torção magnética. Nesta técnica microesferas ferromagnéticas são incorporadas à superfície celular e interagem com um campo magnético externo aplicado. Dependendo do campo magnético aplicado, as microesferas podem apresentar movimento de rotação e translação, aplicando um torque na membrana da célula. A Figura 3.3 mostra imagens de hemácias com esferas ferromagnéticas acopladas.

Figura 3.3: Citometria de torção magnética em hemácias. (a) Imagem de campo claro. (b) Imagens de microscopia eletrônica de varredura de hemácias com esferas ferromagnéticas ligadas. (c) Princípios da citometria de torção magnética.



Fonte: retirado de [73].

As medições de propriedades elásticas de células também são realizadas utilizando pinça óptica [75,42,33,76,34,77,78,79,80]. A vantagem desta técnica com relação às citadas anteriormente é que não há nenhum contato físico da amostra com o instrumento de medição, pois utiliza-se um feixe de luz laser altamente focalizado na amostra que permite o aprisionamento e manipulação da mesma. Além disso, é possível associá-la a sistemas onde simula-se os vasos sanguíneos, como dispositivos microfluídicos, dando uma característica mais real a medição [81,82] e a sistemas que permitem acompanhar mudanças bioquímicas em tempo real [83]. Uma abordagem mais detalhada desta técnica é feita na seção 3.1.

As técnicas acima citadas têm sido utilizadas para avaliar algumas patologias que afetam diretamente as propriedades elásticas das hemácias tais como malária [84,85,86,87], anemia falciforme [42], talassemia [78,88].

A desvantagem das técnicas que avaliam as propriedades elásticas de células individuais em relação às técnicas de filtragem e viscosimétricas é que se torna necessário realizar várias medições para obter um valor médio da propriedade elástica desejada. Para superar esse problema alguns trabalhos têm sido publicados para automatizar e realizar as medições em tempo real [75] permitindo resultados mais rápidos. Desta forma, o uso de pinças ópticas para medir propriedades elásticas de hemácias consiste de uma ferramenta limpa, pois o laser não oferece nenhum contato físico com a amostra e versátil devido a possibilidade de associá-las a outras técnicas.

3.1 Pinças ópticas

A pinça óptica é uma ferramenta que se utiliza da transferência de momento de fótons da luz para capturar e manipular partículas dielétricas, além de células e organismos microscópicos. A primeira observação de que a luz pode exercer forças sobre um corpo foi feita por Johannes Kepler no século XVII. Este observou que a cauda de um cometa sempre aponta para o lado oposto do Sol atribuindo tal fato à pressão de radiação exercida pela luz do Sol. Porém, só com o advento do laser que se tornou possível obter forças suficientes para aprisionar e manipular partículas em escalas nano e microscópica. Os primeiros trabalhos neste campo foram realizados por Ashkin na década de 1970 [89,90]. Nesses primeiros trabalhos o aprisionamento e levitação de partículas era feito utilizando a pressão de radiação exercida pela luz. Em 1986 [25] Ashkin e colaboradores demonstraram que era possível aprisionar partículas utilizando-se apenas um feixe altamente focalizado. Esse sistema ficou conhecido como pinça óptica.

Neste capítulo é feita uma descrição das principais técnicas de medição de propriedades elásticas de hemácias. É apresentada a técnica de pinça óptica e os principais componentes para sua construção. Além disso, são apresentados e discutidos os procedimentos experimentais e a instrumentação desenvolvida para medição da elasticidade de hemácias. Primeiramente são descritas todas as etapas para o desenvolvimento do sistema de manipulação das hemácias. Posteriormente também são apresentadas e descritas as etapas para o desenvolvimento do software de medição. Por último são apresentados e discutidos os resultados obtidos utilizando o sistema.

Nas seções 3.1.1 e 3.1.2 são descritos os princípios básicos de funcionamento da pinça óptica e os requisitos para a montagem e alinhamento do sistema, respectivamente.

3.1.1 Princípio de funcionamento da pinça óptica

A física envolvida no aprisionamento óptico de partículas pode ser entendida através de dois modelos teóricos diferentes. Para partículas com diâmetro muito maior que o comprimento de onda da luz ($D \gg \lambda$), regime da óptica geométrica, pode-se utilizar a luz como raios luminosos, para explicar o funcionamento da pinça. Quando o diâmetro das partículas for menor que o comprimento de onda da luz ($D \ll \lambda$), regime de Rayleigh, um modelo baseado na teoria eletromagnética é utilizado, também chamado de modelo da força de Lorentz. Este modelo é baseado na força de Lorentz exercida pela luz nos átomos da partícula aprisionada. Nesta tese é descrito o funcionamento da pinça óptica a partir do modelo dos raios ópticos. Para mais detalhes do funcionamento da pinça óptica no regime de Rayleigh, ver a referência [91].

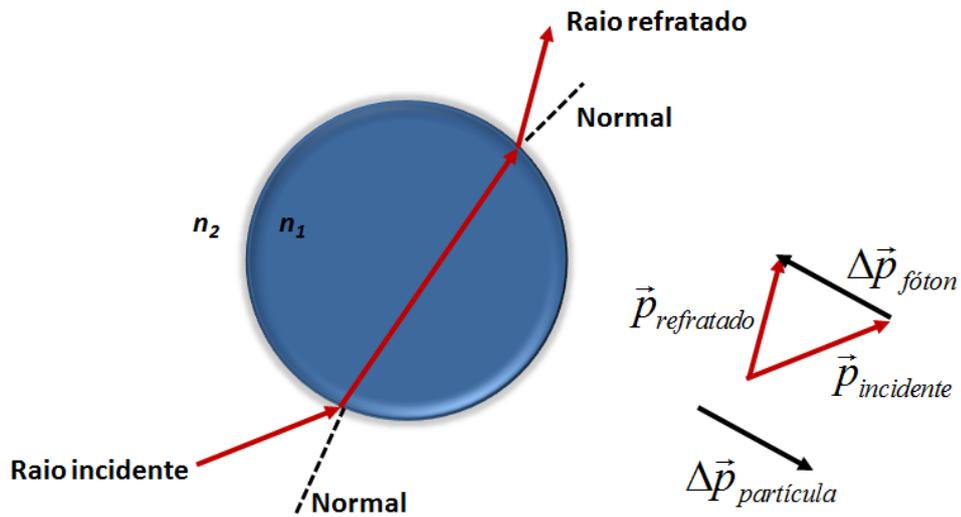
Consideremos um raio de luz que incide sobre uma partícula dielétrica esférica com índice de refração n_1 , maior que o índice de refração do meio n_2 que a envolve. Os fótons da radiação incidente possuem um momento linear \vec{p} , cujo módulo é dado por

$$|\vec{p}| = \frac{h}{\lambda}, \quad (3.1)$$

onde h é a constante de Plank e λ é o comprimento da radiação eletromagnética incidente. Ao incidir na partícula, parte da luz será refratada e outra parte será refletida. Os fótons da luz refletida exercem uma força, chamada de força de espalhamento, que empurra o objeto para longe, enquanto os fótons da luz refratada exercem uma força, chamada de força de gradiente, puxando o objeto para a região onde o feixe de luz é mais intenso. O aprisionamento óptico ocorre quando a força de gradiente supera a força de espalhamento [28].

Vamos analisar como um raio luminoso, que sofre refração quando passa por um objeto com índice de refração maior que a do meio, pode exercer força sobre este objeto. Como mostra a Figura 3.4, um raio que incide na partícula de índice de refração n_1 maior que o índice de refração do meio n_2 sofre refração ao entrar e ao sair da partícula [92].

Figura 3.4: Raios incidente e refratado por uma partícula de índice de refração $n_1 > n_2$.

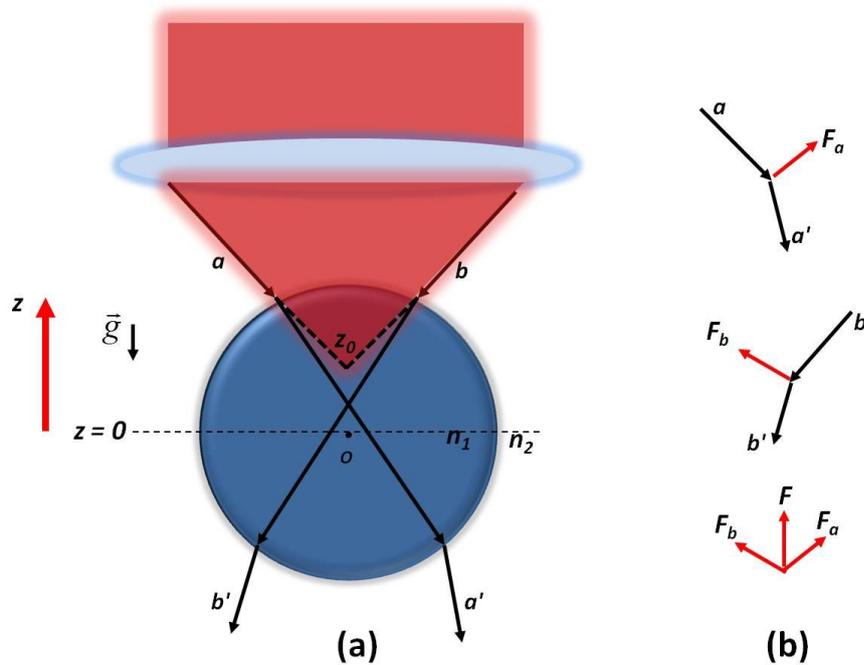


Fonte: próprio autor.

Quando a luz interage com uma partícula esférica, os raios incidentes são desviados de acordo com as leis da refração (desprezaremos a reflexão e absorção pela partícula). O desvio da luz resulta numa mudança no momento do fóton $\Delta\vec{p}_{\text{fóton}}$, provocando uma variação no momento da partícula, de sentido contrário ao da mudança do momento do fóton, dando origem a uma força que atua sobre a partícula.

Para um feixe de luz focalizado a força exercida sobre a partícula devido à refração da luz, chamada de força de gradiente, pode se igualar ou até mesmo superar a força gravitacional que atua sobre ela. Para entendermos como isso é possível, analisaremos os raios nas direções axial e lateral. Na direção axial, consideremos dois raios simétricos a e b , de mesma intensidade, provenientes de um feixe focalizado por uma lente que incide numa partícula esférica de cima para baixo, conforme mostra a Figura 3.5.

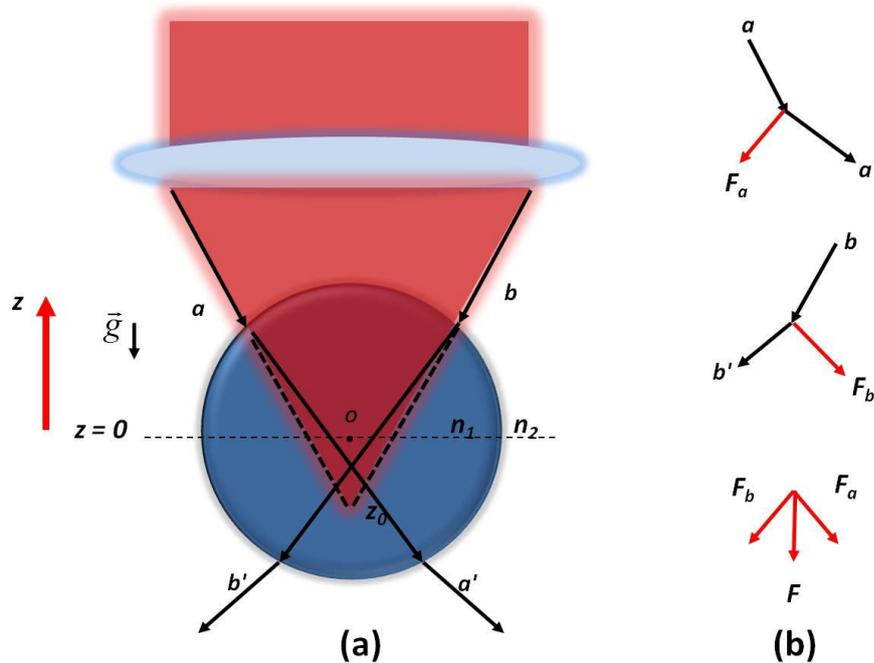
Figura 3.5: (a) Trajetória de dois raios simétricos, de mesma intensidade, que se encontrariam com o eixo z na posição z_0 se não sofressem desvio devido à partícula, com $z_0 > 0$ acima do centro da partícula ($n_1 > n_2$). (b) Diagrama representando as forças sobre a partícula e a trajetória dos raios.



Fonte: próprio autor.

Na Figura 3.5 o ponto O é o centro da partícula ($z = 0$). Caso não existisse a partícula, o feixe seria focalizado em um ponto $z_0 > 0$, porém devido a refração sofrida pelo feixe os dois raios se encontram em uma posição entre z_0 e o ponto O . A força resultante aponta para cima e levará o centro da partícula para o foco do laser. Quando o feixe for focalizado em um ponto $z_0 < 0$, o sentido da força é contrário ao caso $z_0 > 0$, como mostra a Figura 3.6.

Figura 3.6: (a) Trajetória de dois raios simétricos, de mesma intensidade, que se encontrariam com o eixo z na posição z_0 se não sofressem desvio devido à partícula, com $z_0 < 0$ abaixo do centro da partícula ($n_1 > n_2$). (b) Diagrama representando as forças sobre a partícula e a trajetória dos raios.

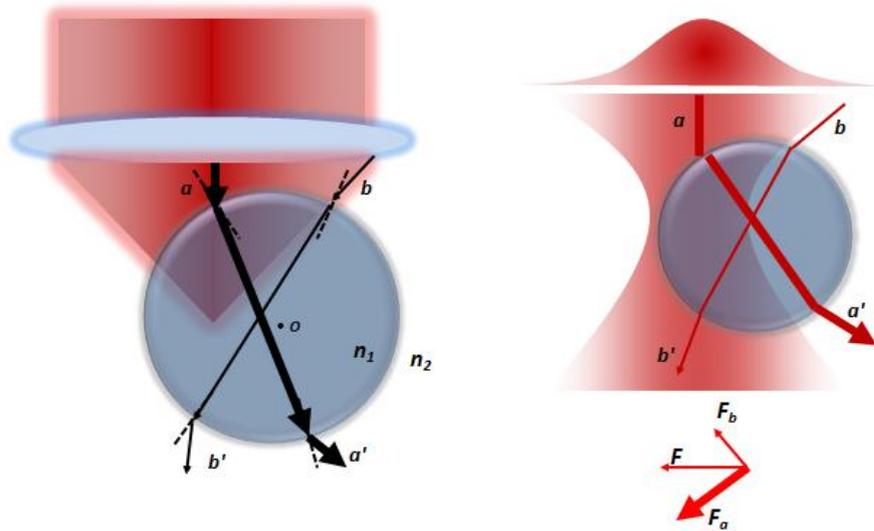


Fonte: próprio autor.

Como mostra a Figura 3.6 se não existisse a partícula espalhadora, o feixe seria focalizado em um ponto $z_0 < 0$, porém devido a refração sofrida pelo feixe os dois raios se encontram em uma posição acima de z_0 . A força resultante aponta no sentido negativo do eixo z e também levará o centro da partícula para o foco do laser.

Na direção lateral, consideremos uma partícula fora do foco do laser e que este possui um feixe com perfil gaussiano, como mostrado na Figura 3.7.

Figura 3.7: Trajetória de dois raios antissimétricos, de intensidades diferentes e o diagrama representando as forças sobre a partícula e a trajetória dos raios.



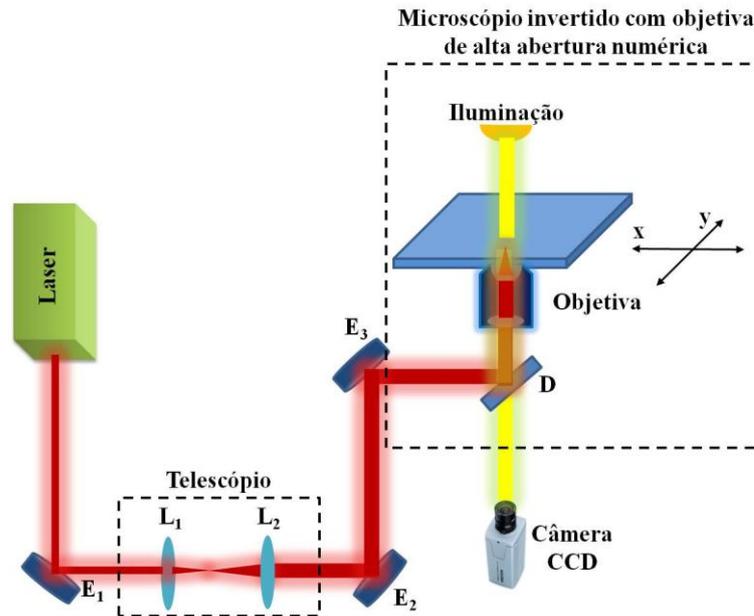
Fonte: próprio autor.

Como os raios a e b têm diferentes intensidades, as mudanças no momento desses raios (Δp_a e Δp_b , respectivamente) diferem em magnitude, causando uma força resultante F na partícula, levando o centro da mesma para onde o feixe é mais intenso, ou seja, para o foco do laser como mostrado na Figura 3.7.

3.1.2 Componentes básicos da pinça óptica

Os principais componentes da pinça óptica são o laser, o telescópio e o microscópio dotado de uma objetiva com alta abertura numérica. Também, é necessário um sistema de captura de imagem para visualizar o objeto aprisionado. A Figura 3.8 ilustra os principais componentes da pinça óptica. É descrito brevemente, a seguir, cada componente do sistema de pinça óptica.

Figura 3.8: Componentes básicos de um sistema de pinça óptica.



Fonte: próprio autor.

lasers

A escolha do laser para aprisionamento óptico depende de vários fatores como, estabilidade na potência, comprimento de onda, qualidade do modo, etc. Os lasers utilizados para aprisionamento óptico apresentam, em sua maioria, o modo gaussiano (TEM_{00}) e devem apresentar baixas flutuações na potência. Instabilidades espaciais podem causar deslocamentos não desejáveis, enquanto flutuações na potência originam variações na força de aprisionamento óptico. O comprimento de onda é um parâmetro fundamental, quando o objeto a ser aprisionado for um material biológico como células e microrganismos. Em geral, células de tecidos biológicos possuem uma "janela de transparência", na região do infravermelho entre 750 nm e 1200 nm, de baixa absorvância ($\alpha \approx 0,1 - 1 \text{ cm}^{-1}$) [27]. Assim espera-se que o uso de lasers no infravermelho em pinças ópticas minimizem os danos induzidos opticamente [27].

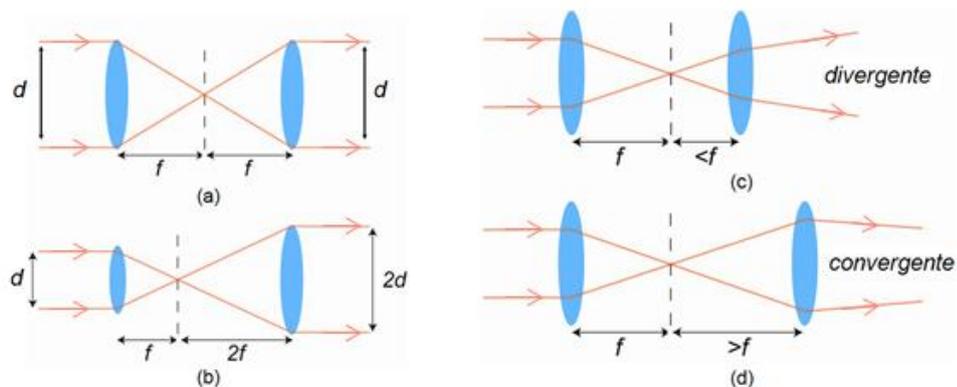
Diversos lasers CW têm sido utilizados na construção de pinças ópticas. Os fatores mencionados acima, assim como o custo irão determinar a escolha do laser. O laser mais utilizado no aprisionamento de materiais biológicos é o Nd:YAG ($\lambda = 1064 \text{ nm}$) e semelhantes Nd:YLF ($\lambda = 1047 \text{ nm}$) e Nd:YVO₄ ($\lambda = 1053 \text{ nm}$). Esses lasers possuem uma boa estabilidade na potência e uma boa qualidade no modo, além disso, conseguem atingir potências de até 10 W, que são mais que suficientes para o aprisionamento de objetos

microscópicos. Lasers de diodo CW também podem ser utilizados em pinças ópticas, e apresentam algumas vantagens como baixo custo, são compactos, além de poderem ser encontrados em diversos comprimentos de onda [28]. Lasers pulsados de Ti-Safira também são empregados no aprisionamento óptico de materiais biológicos [93], mas ainda possuem uma relação custo-benefício alta.

Telescópio

O telescópio, também chamado de expensor de feixe, é um sistema óptico composto de duas lentes, que permite aumentar o diâmetro do feixe luminoso e controlar sua divergência, como mostrado nas Figura 3.9 a e b.

Figura 3.9: Telescópio formado pela associação de duas lentes convergentes, resultando em (a) feixe colimado f (ampliação do telescópio 1:1), (b) feixe colimado (ampliação do telescópio 2:1), (c) feixe divergente e (d) feixe convergente.



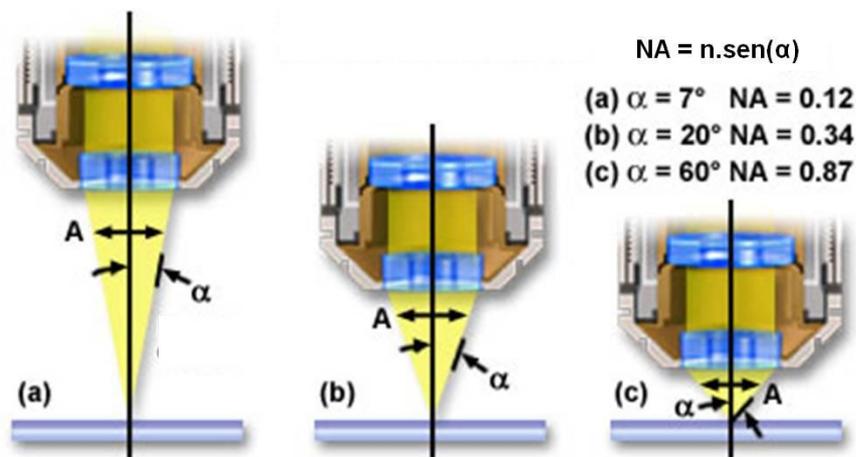
Fonte: adaptado de [94]

A ampliação do telescópio é igual a distância focal da segunda lente dividido pela distância focal da primeira. Mudando a distância entre as duas lentes é possível mudar a ampliação e um feixe colimado pode tornar-se divergente ou convergente (Figura 3.9 c e d, respectivamente). Este controle é útil para modificar a posição axial da armadilha óptica e também para aumentar o diâmetro do feixe para preencher toda a parte traseira da lente objetiva.

Microscópio e lente objetiva

Os microscópios utilizados em pinças ópticas, geralmente são comerciais e podem possuir a configuração vertical (upright) ou invertida. Uma parte importante do microscópio para a construção de uma pinça óptica é a lente objetiva. A escolha da objetiva determina a eficiência do sistema de aprisionamento óptico (força da pinça em função da potência de entrada), que é uma função tanto da transmitância da objetiva para o comprimento de onda do laser e da abertura numérica (NA) da objetiva [28]. A abertura numérica está associada ao poder de captação de luz pela lente objetiva e está relacionada com o ângulo, α , do cone de luz na saída da objetiva. A abertura numérica pode ser determinada matematicamente por $NA = n \cdot \text{sen}\alpha$, em que α é metade da abertura angular do cone de luz e n é o índice de refração do meio. A Figura 3.10 mostra lentes objetivas com diferentes aberturas numéricas.

Figura 3.10: Abertura numérica para diferentes valores de α ($n = 1$).



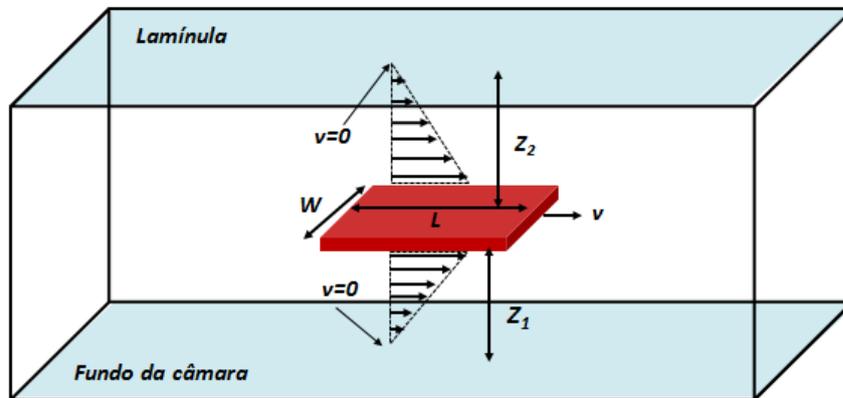
Fonte: adaptado de [95].

Para aumentar a abertura numérica da lente objetiva utilizam-se lentes de imersão em óleo ou água, pois o índice de refração n aumenta. Usualmente, quanto maior NA menor é a distância de trabalho WD (distância entre a saída da lente objetiva e a amostra) da lente. A distância de trabalho da maioria das objetivas de imersão em óleo é muito curta ($\sim 0,2$ mm). Uma objetiva de alta abertura numérica (1,2 – 1,4) é necessária para produzir um gradiente de intensidade suficiente para superar a força de espalhamento e produzir uma armadilha óptica estável. Para aproveitar a máxima abertura numérica é necessário que o feixe do laser preencha toda a parte traseira da objetiva, ressaltando a importância do uso do telescópio no sistema de pinça óptica.

3.1.3 Modelo hidroelástico

Um modelo hidroelástico foi utilizado para medir a elasticidade de hemácias através da pinça óptica. Mais detalhes desse modelo podem ser obtidos na referência [92]. Brevemente, neste modelo o formato da célula é aproximado a um paralelepípedo de espessura desprezível, conforme mostrado na Figura 3.11.

Figura 3.11: Modelo geométrico da hemácia na câmara.



Fonte: adaptado de [92].

Considerando um gradiente linear de velocidades, a força hidrodinâmica pode ser expressa como [92]

$$\vec{F}_{Hidro} = \eta WL \left(\frac{1}{Z_1} + \frac{1}{Z_2} \right) \vec{v} = \eta \frac{WL}{Z_{eq}} \vec{v}, \quad (3.2)$$

onde L é o comprimento, e W a largura da célula, Z_1 e Z_2 representam, respectivamente, a distância da hemácia ao fundo da câmara e ao topo da lamínula na câmara, η é a viscosidade do meio e v é o módulo da velocidade de arraste. Ao ser deslocado pelo fluido a hemácia deforma-se devido à ação da força hidrodinâmica. Uma força restauradora, tipo mola, se opõe ao processo de alongamento. O módulo desta força pode ser expresso por

$$F_{elástica} = K \Delta L = \mu \frac{W}{L} \Delta L, \quad (3.3)$$

onde ΔL é a deformação sofrida pela hemácia, K é a constante elástica e μ é a elasticidade aparente da célula. No equilíbrio, as forças hidrodinâmica e elástica são iguais e usando as equações (3.2) e (3.3) tem-se

$$\eta \frac{WL}{Z_{eq}} v = \mu \frac{W}{L} \Delta L \Rightarrow \Delta L = \frac{\eta L^2}{\mu Z_{eq}} v. \quad (3.4)$$

Assumindo um regime de pequena deformação, $L^2 \approx L_0^2$, onde L_0 é o comprimento da célula não deformada, a equação (3.4) pode ser reescrita como

$$L = L_0 + \frac{\eta L_0^2}{\mu Z_{eq}} v, \quad (3.5)$$

A declividade da reta expressa por (3.5) está relacionado com a elasticidade da célula de acordo com a expressão

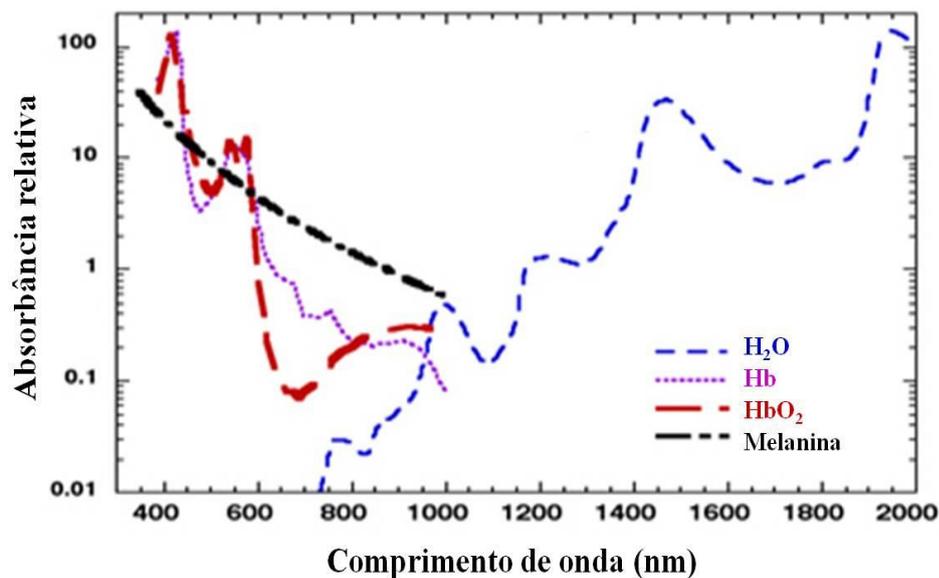
$$\mu = \frac{\eta L_0^2}{a Z_{eq}}, \quad (3.6)$$

3.1.4 Danos por pinça óptica

A pinça óptica para aprisionamento e manipulação de amostras biológicas foi utilizada pela primeira vez por Ashkin [26] utilizando um laser de argônio com comprimento de onda de 514 nm. No mesmo ano percebeu-se que a utilização de lasers na região do infravermelho para aprisionamento de células e organismos causava menos dano que o laser na região visível [24]. A partir daí a grande maioria dos trabalhos para aprisionamento de materiais biológicos através de pinças ópticas utiliza-se de lasers na região do infravermelho próximo [93,42,39,76,34,96,75]

Amostras biológicas absorvem mais na região do visível do que no infravermelho próximo, o que torna esta região do espectro eletromagnético, bastante utilizada em aplicações, em que se quer evitar danos à amostra. No caso de hemácias, a absorção é principalmente devida à elevada concentração de hemoglobina. A Figura 3.12 mostra o espectro de absorção da água (H_2O), hemoglobina (Hb) e oxihemoglobina (HbO_2).

Figura 3.12: Espectro de absorção da água (H₂O), hemoglobina (Hb) e oxihemoglobina (HbO₂).

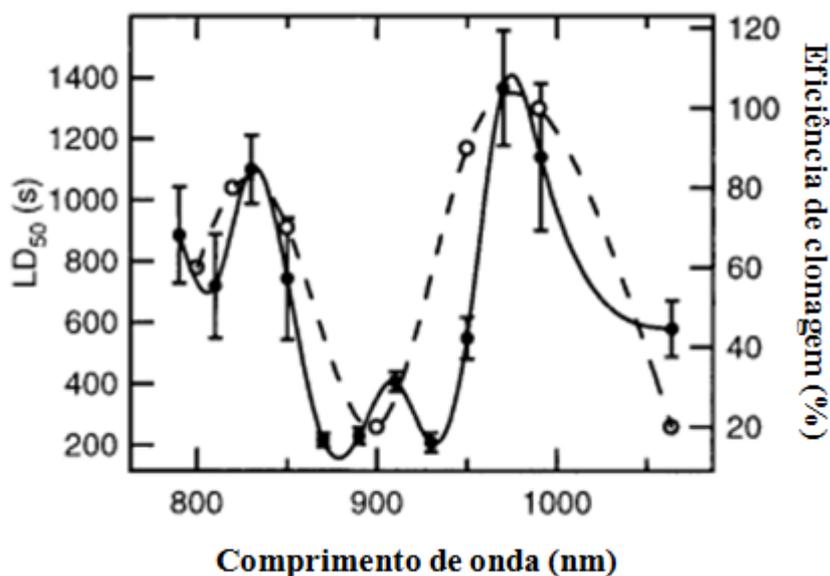


Fonte: adaptado de [97].

Mesmo utilizando-se laser na região do infravermelho, a radiação pode causar danos às amostras biológicas como microrganismos e células [98,76,99] quando aprisionadas, dependendo da potência incidente e do tempo de exposição. Estudos com bactérias *Escherichia coli* e células de ovário de hamster chinês - CHO mostraram que os danos eram mínimos em 970 nm e 830 nm [98]. A Figura 3.13 mostra a dependência com o comprimento de onda da dose letal mediana (LD₅₀)¹ de bactérias *Escherichia coli* e de células CHO e a eficiência de clonagem de células CHO.

¹ dose letal mediana (DL₅₀ ou LD₅₀, do inglês *Lethal Dose*) é a dose necessária de uma dada substância ou tipo

Figura 3.13: Dependência com o comprimento de onda do dano óptico em *E. coli* (círculos sólidos) e células CHO (linha sólida) avaliado a partir da LD₅₀ (eixo do lado esquerdo) e a partir da eficiência de clonagem em células CHO (círculos abertos) (eixo do lado direito).



Fonte: adaptado de [98].

3.2 Materiais e métodos para avaliação de elasticidade de hemácias

Para medição de elasticidade de hemácias foi construída uma pinça óptica e um software que permitia o controle do estágio do microscópio e a visualização dos resultados obtidos. O sistema de medição da elasticidade além de permitir a avaliação das hemácias em tempo real, durante o aprisionamento das células, também armazena os vídeos adquiridos possibilitando posterior reavaliação. Foram montadas duas pinças ópticas com lasers em dois comprimentos de onda na região do infravermelho, mais especificamente em 785 nm e 1064 nm. As amostras utilizadas e os métodos para construção da pinça óptica com laser de comprimento de onda em 1064 nm estão descritos nas seções 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3, respectivamente.

3.2.1 Amostras

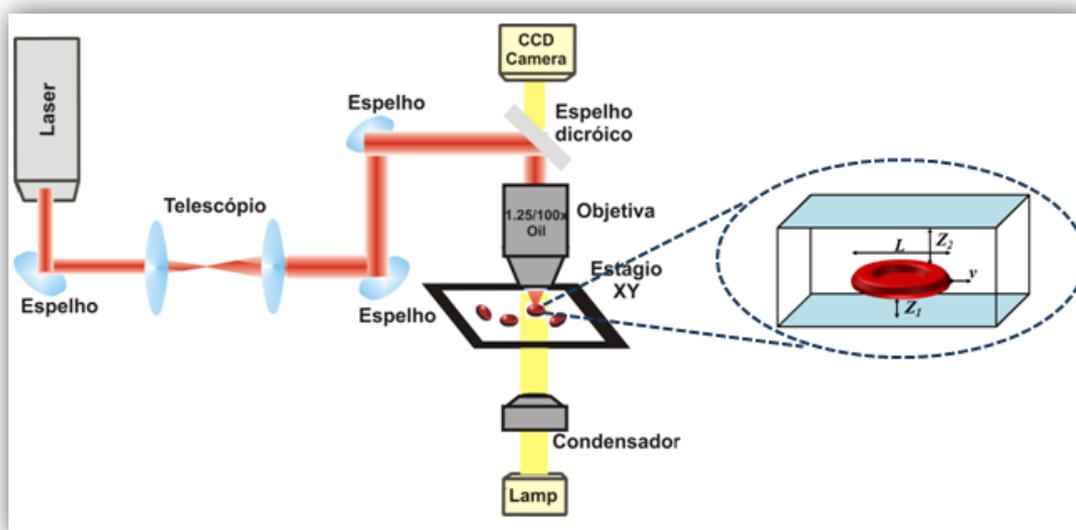
As hemácias utilizadas neste trabalho foram coletadas de doadores normais em dois tubos de 5 mL vacutainer, um contendo anticoagulante EDTA, ácido etilenodiamino tetraacético, e o outro sem solução anticoagulante. Os dois tubos foram levados até uma centrífuga. O sangue com tubo contendo EDTA foi centrifugado em rotação de 3500 rpm durante 5 minutos, enquanto o outro tubo foi centrifugado em rotação de 5000 rpm durante 5

minutos. As hemácias, obtidas a partir do tubo de sangue com EDTA, foram diluídas no soro do próprio doador na proporção (0,5 μL / 500 μL).

3.2.2 Montagem da pinça óptica com laser de comprimento de onda 1064 nm

Para montagem de uma das pinças ópticas foi utilizado um laser de Nd:YAG (IPG Photonics, EUA) que opera no regime de onda contínua (CW) com comprimento de onda de 1064 nm e potência óptica máxima de saída de 5 W. O sistema de pinça óptica montado é ilustrado na Figura 3.14.

Figura 3.14: Montagem experimental da pinça óptica com o laser de 1064 nm.



Fonte: próprio autor.

O feixe laser foi direcionado para um microscópio (Zeiss-Axiolab) vertical (upright) através de espelhos que refletem o comprimento de onda utilizado. Um espelho dicróico que reflete a luz na região do infravermelho e transmite na região do visível foi colocado de forma que o feixe do laser incidisse formando um ângulo de 45° com o mesmo. Dessa forma o feixe era direcionado para uma lente objetiva de imersão em óleo, com abertura numérica de 1.25 e aumento de 100 x que foi utilizada para aprisionar as hemácias e também para a formação das imagens das amostras. A amostra foi iluminada por uma lâmpada de mercúrio e a imagem formada pela lente objetiva foi capturada por uma câmera CCD (Samsung, SCC-131) conectada ao computador por de uma placa de captura (Pinnacle - Studio Movieboard 14 HD

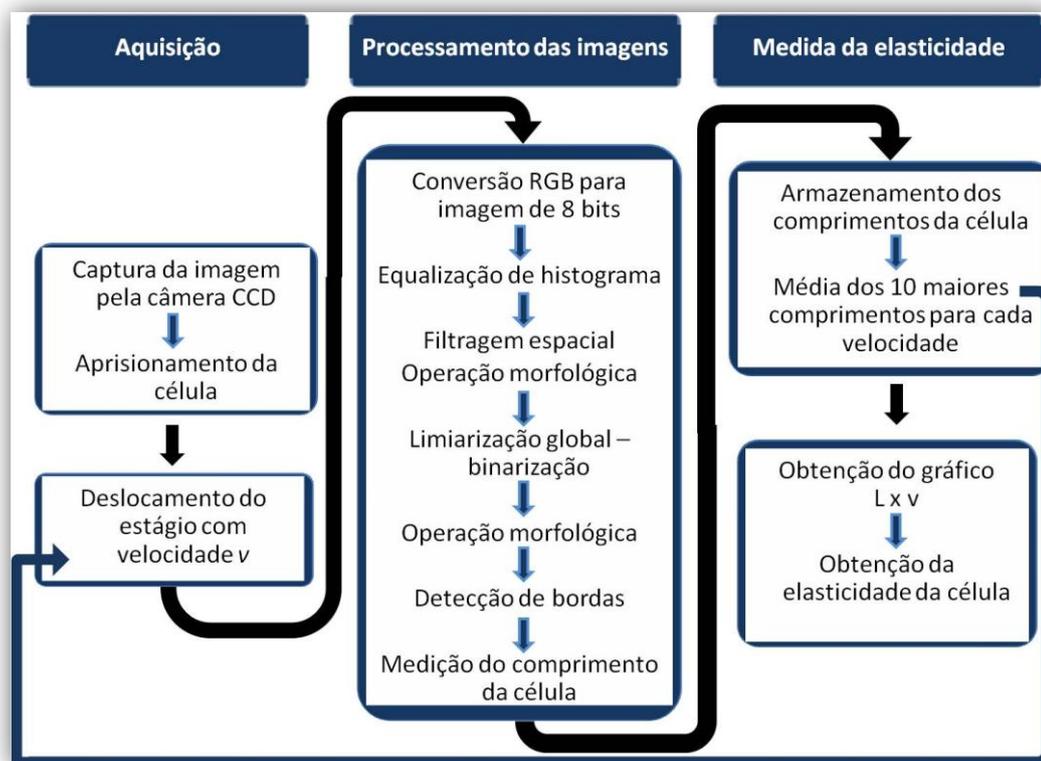
PCI). Um telescópio formado por duas lentes L_1 e L_2 de mesma distância focal $f_1 = f_2 = 5$ cm foi utilizado para controlar a posição na direção axial em que o laser era focalizado. O laser foi focalizado numa posição de $10 \mu\text{m}$ acima do fundo da lamínula onde a célula era aprisionada e depois levada a uma posição $Z_l = 50 \mu\text{m}$ (metade da profundidade da câmara) para que não se chocasse com outras células durante seu deslocamento. A imagem do lado direito da Figura 3.14 é uma ampliação da célula na câmara que possui uma profundidade de $100 \mu\text{m}$.

O microscópio utilizado foi equipado com um estágio motorizado e um controlador (Prior Scientific –ProScan II) que podia ser manipulado por um joystick ou utilizando o computador, pela porta RS232. Com o controlador foi possível deslocar o estágio com passos não menores que $0,01 \mu\text{m}$ e alcançar velocidades de até 150 mm/s .

As medições foram realizadas com uma potência do laser de aproximadamente 140 mW , na amostra. O estágio foi deslocado com velocidades pré-definidas entre 140 e $315 \mu\text{m/s}$. Como a célula estava presa pela pinça, à medida que o estágio deslocava-se, o fluido aplicava uma força de arrasto hidrodinâmico na célula deformando-a. Com o aumento da velocidade, o comprimento da hemácia aumentava. As velocidades foram escolhidas de tal forma que a hemácia sofresse deformações maiores que o tamanho do pixel e, ao ser deformada voltasse para seu comprimento inicial.

O software de controle e medição da elasticidade foi desenvolvido utilizando a plataforma de programação Labview. O software é constituído de três partes: aquisição, processamento das imagens e por fim análise estatística e medição da elasticidade. O diagrama da Figura 3.15 ilustra as etapas de medição automática da elasticidade das células.

Figura 3.15: Diagrama das etapas de medição automática da elasticidade de hemácias em tempo real.



Fonte: próprio autor.

Aquisição

A captura das imagens foi feita por uma câmera CCD conectada a uma placa de captura como descrito na seção 3.2.2. As imagens foram capturadas com uma resolução de 352 x 240 e os vídeos foram gravados com uma taxa de 30 fps em formato AVI 24 bits. Após o aprisionamento da hemácia com a pinça óptica o estágio deslocava-se com velocidades de 140 $\mu\text{m/s}$, 175 $\mu\text{m/s}$, 210 $\mu\text{m/s}$, 245 $\mu\text{m/s}$, 280 $\mu\text{m/s}$ e 315 $\mu\text{m/s}$. Para cada velocidade o estágio deslocava-se o mesmo comprimento 250 μm . Um tempo de 3 segundos foi definido para o estágio deslocar-se os 250 μm . Este tempo foi definido de tal forma que o estágio parava entre uma velocidade e outra e ainda esperava cerca de 1 segundo para começar a deslocar com a próxima velocidade. Isto permitia que a célula voltasse a seu tamanho inicial.

Processamento das Imagens

Uma etapa importante na análise de uma imagem é a segmentação, que consiste em subdividir uma imagem em regiões ou objetos que a compõem [100]. Para separar a célula do restante da imagem usando a etapa de segmentação diversas etapas foram realizadas,

mostradas no diagrama da Figura 3.15. Primeiramente a imagem foi convertida do padrão RGB para uma imagem de 8 bits extraíndo o plano azul (Blue) da imagem RGB. Após esta etapa, uma máscara para demarcar a região onde a célula estava presa foi utilizada criando uma região 104 x 50, isto é necessário para que o processamento não seja feito em toda a imagem, diminuindo também o tempo de processamento.

Após as etapas descritas acima, uma equalização de histograma foi realizada. Para realizar a equalização de histograma considere uma imagem digital de 8 bits, com o número de níveis de intensidade $L = 2^8$. O histograma de uma imagem digital com níveis de intensidade no intervalo $[0, L - 1]$ é uma função discreta $h(r_k) = n_k$, onde r_k é o k-ésimo valor de intensidade dos pixels da imagem original, com $r = 0$ representando o preto, e $r = L - 1$ representando o branco e n_k é o número de pixels da imagem com intensidade r_k e $k = 0, 1, 2, \dots, L - 1$. O histograma normalizado é dado por $p(r_k) = n_k/MN$, onde M e N representam as dimensões da linha e da coluna da imagem, respectivamente. O histograma da imagem normalizado é um gráfico de $p(r_k)$ versus r_k .

A equalização de histograma é realizada mapeando cada pixel da imagem de entrada (imagem original) com intensidade r_k em um pixel correspondente com nível de intensidade s_k na imagem de saída (imagem após equalização de histograma). Os níveis de intensidade dos pixels s_k da imagem de saída são obtidos pela equação (3.7):

$$s_k = T(r_k) = \frac{(L - 1)}{MN} \sum_{j=0}^k n_j. \quad (3.7)$$

A transformação (mapeamento) $T(r_k)$ na equação (3.7) é chamada de equalização de histograma ou linearização de histograma.

A próxima etapa foi reduzir o ruído presente na imagem. Para isso foi utilizado um filtro espacial de média de tamanho 5 x 5. O filtro de média substitui o valor de cada pixel de uma imagem pela média dos níveis de intensidade da vizinhança definida pela máscara. Para uma máscara 5 x 5 o valor da intensidade do pixel será dada por:

$$I = \frac{1}{25} \sum_{k=1}^{25} r_k, \quad (3.8)$$

onde I é a intensidade do pixel após a passagem do filtro.

Por conseguinte, foi utilizado processamento morfológico de imagens para eliminar partes que não pertencem à célula. O processamento morfológico consiste de uma ferramenta para extrair componentes das imagens que são úteis na representação e na descrição da forma de uma região, como bordas [100]. Para uma discussão mais aprofundada de processamento

morfológico de imagens, ver referência [100]. Primeiramente uma operação de dilatação foi realizada na imagem resultante, após a passagem do filtro laplaciano. Antes de outra operação morfológica a imagem foi binarizada, ou seja, transformada em uma imagem binária com pixels de valores 0 e 1.

Consideremos uma imagem $f(x, y)$, composta por objetos escuros (bordas da célula) sobre o fundo claro. Uma maneira de extrair os objetos do fundo é selecionar um limiar de intensidade L_{limiar} , que separa o fundo dos objetos, desta forma qualquer ponto (x, y) na imagem em que $f(x, y) > L_{limiar}$ é chamado de ponto de fundo (região clara); caso contrário, o ponto é chamado ponto objeto (região escura). Esta operação é chamada de limiarização e pode ser definida como:

$$g(x, y) = \begin{cases} 1, & f(x, y) > L_{limiar} \\ 0, & f(x, y) \leq L_{limiar} \end{cases} \quad (3.9)$$

O valor utilizado foi $L_{limiar} = 25$, ou seja, todos os pixels com intensidades maiores que 25 foram substituídos por pixels de valor 1 (branco) e todos os pixels com intensidades maiores ou igual a 25 foram substituídos por pixels de valor zero (preto). Esse valor foi escolhido por remover melhor pontos cinza não pertencentes à célula. A última etapa da segmentação foi utilizar outra operação morfológica conhecida como fechamento na imagem binária resultante, após a limiarização. A operação de fechamento tem por finalidade fundir descontinuidades e eliminar pequenos buracos (pontos pretos que aparecem fora da célula).

Medição da elasticidade das hemácias

Para medir a elasticidade das hemácias foi utilizado o modelo hidroelástico descrito brevemente na seção 3.1.3.

Esta etapa consiste em identificar primeiramente as bordas da hemácia e medir a distância entre as duas extremidades que representa o comprimento da célula em pixels. Para obter a medida em μm , foi feita uma imagem de uma lâmina de calibração (THORLABS). Foi obtido um valor de $1 \mu\text{m} = 7,36$ pixels. Os comprimentos medidos para cada velocidade são exportados e gravados em uma tabela do Excel, classificados por velocidade e ordenados decrescentemente. Apenas os dados da tabela em que a célula encontrava-se com velocidade constante foram utilizados para a obtenção do comprimento médio. O comprimento médio foi obtido pela media aritmética dos 10 maiores comprimentos para cada velocidade. Alguns erros na detecção da borda das células apareciam devido a presença de partículas presentes na

amostra acarretando numa medida não real do comprimento e alterando o comprimento médio conforme mostrado na Figura 3.16.

Figura 3.16: Detecção de pontos não pertencentes à borda da célula.

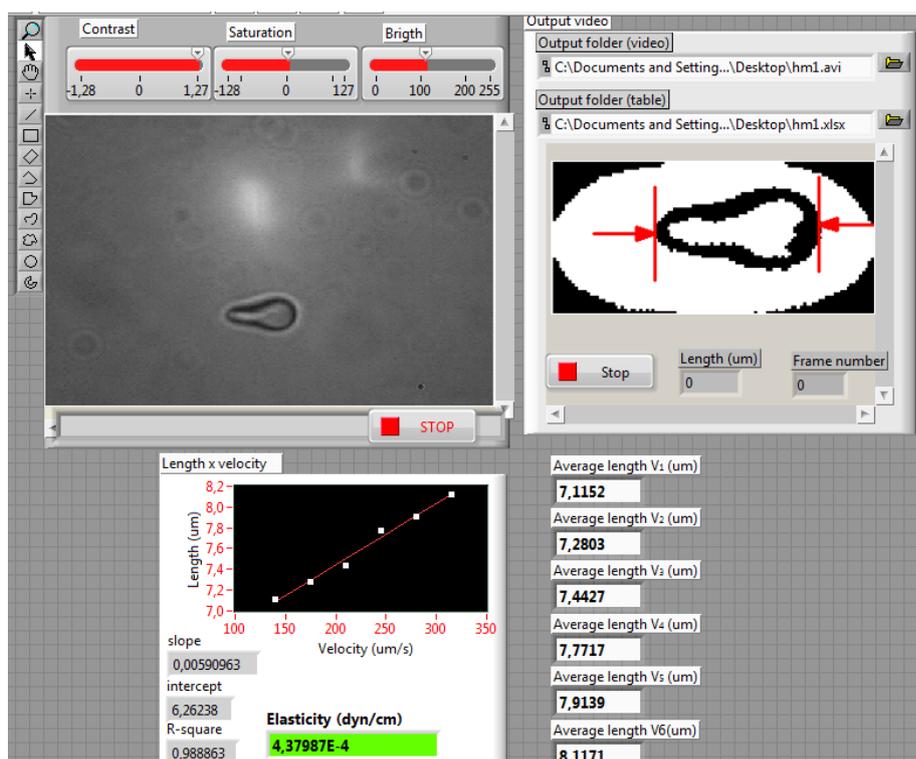


Fonte: próprio autor.

Os valores que divergiam de $0,5 \mu\text{m}$ (valor muito maior que o desvio padrão) da média do comprimento são entendidos pelo software como sendo um erro e esse ponto é descartado automaticamente sendo utilizado o próximo. Desta forma tem-se sempre a utilização de 10 comprimentos para a realização da média em cada velocidade. O valor médio do comprimento é uma função da velocidade e ambos são utilizados na equação (3.5).

A Figura 3.17 mostra o Painel de controle do software para medição da elasticidade das hemácias em tempo real.

Figura 3.17: Painel de controle do software de medição da elasticidade das hemácias em tempo real.



Fonte: próprio autor.

3.2.3 Montagem da pinça óptica com laser de comprimento de onda 785 nm

O aparato experimental da pinça óptica utilizando o laser com comprimento de onda 785 nm é basicamente o mesmo descrito na seção 3.2.2 com pequenas diferenças. A pinça foi montado utilizando um laser de diodo (TOPTICA – XTRA II). O feixe foi expandido aproximadamente 4 x por um telescópio formado por duas lentes convergentes de distância focal 2,5 e 10,0 cm para preencher completamente a parte de trás da lente objetiva. O feixe foi direcionado para um espelho dicróico que reflete no comprimento de onda do laser incidente e transmite a luz visível. O espelho dicróico reflete o feixe laser para uma objetiva de 60x de aumento e abertura numérica de 1.4, presente em um microscópio invertido (OLYMPUS - IX71). As medições foram realizadas com uma potência do laser de aproximadamente 75 mW, na amostra. As imagens eram capturadas por uma câmera CCD (Samsung – SDC 415) conectada a uma placa de captura (Pinnacle - Studio Movieboard 14 HD PCI). O software de captura e medição da elasticidade foi o mesmo, porém algumas adaptações como a conversão de pixels para μm e ajustes na luminosidade foram necessários.

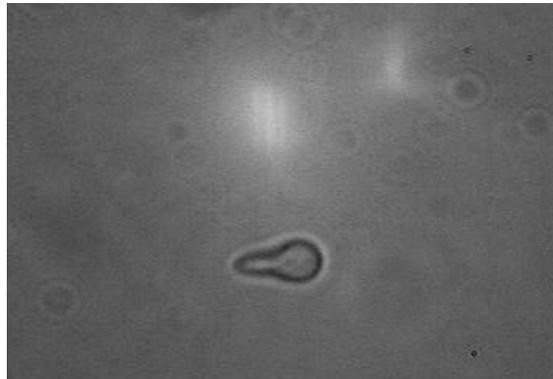
3.3 Resultados e discussões

Nesta seção foram apresentados e discutidos os resultados referentes à avaliação do sistema construído para medição da elasticidade de hemácias. Além disso, foram avaliados a dependência do comprimento da célula com o tempo de medição, a dependência da elasticidade com a potência incidente e com o tempo de aprisionamento (tempo que a célula fica presa pela pinça óptica).

3.3.1 Avaliação do sistema automático para medição de elasticidade de hemácias

A Figura 3.18 mostra a imagem de uma hemácia aprisionada pela pinça óptica e sendo esticada com uma velocidade constante de $140 \mu\text{m/s}$.

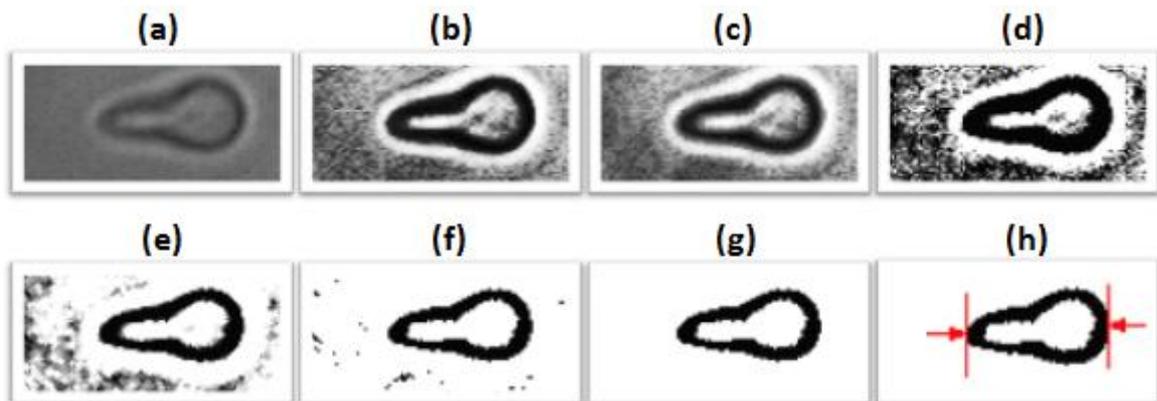
Figura 3.18: Imagem original de uma hemácia aprisionada pela pinça óptica sendo esticada com velocidade de $140 \mu\text{m/s}$.



Fonte: próprio autor.

A imagem da Figura 3.18 possui um tamanho de 352×240 que foi reduzido para 104×50 , como descrito na seção 3.2.2. Além disso, apenas o plano azul da imagem RGB (Figura 3.19 (a)) foi utilizado, isto melhorou o processamento das imagens e diminuiu o tempo de processamento. Todas as etapas do processamento das imagens estão ilustradas na Figura 3.19.

Figura 3.19: Etapas do processo de segmentação. (a) componente azul da imagem original, (b) equalização de histograma, (c) filtro de média (5×5), (d) filtro laplaciano, (e) dilatação, (f) binarização, (g) erosão, (h) célula segmentada com bordas detectadas.



Fonte: próprio autor.

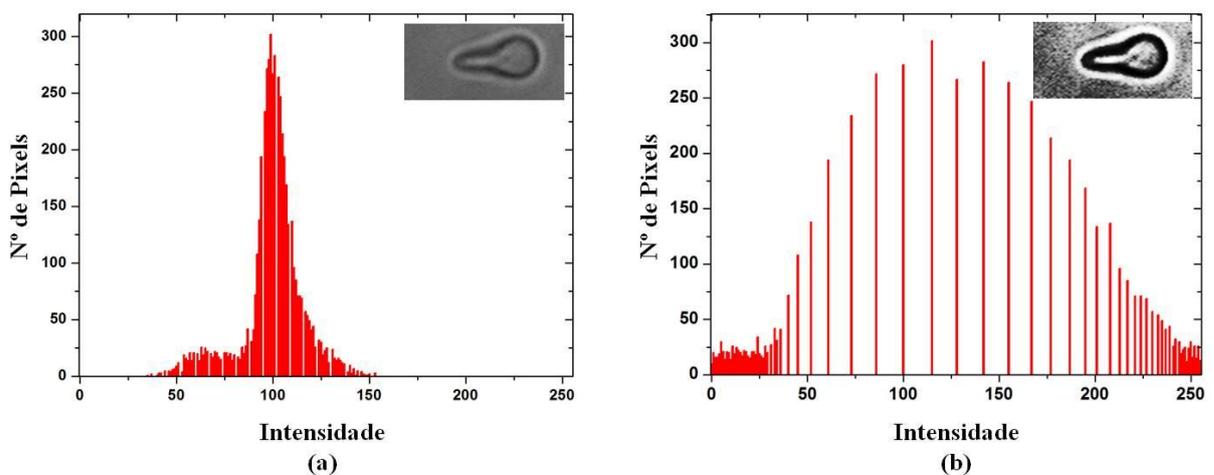
A equalização de histograma resulta em um aumento no contraste da imagem original Figura 3.19 (b). O resultado da utilização filtro de média gera uma imagem com perda da nitidez, pois reduz as transições abruptas presentes na imagem. Como os ruídos normalmente consistem em transições abruptas nos níveis de intensidade eles são reduzidos como mostrado

na Figura 3.19 (c). Um efeito indesejado na utilização deste filtro é o borramento das bordas da imagem, pois estas também consistem em transições abruptas nos níveis de intensidade. Como a detecção da borda é fundamental na medição do comprimento da célula foi utilizado um filtro laplaciano, que por ser um operador diferencial realçou as descontinuidades de intensidade (Figura 3.19 (d)).

A operação morfológica de dilatação permite unir pixels separados por um determinado tamanho. É possível perceber que os pixels brancos na imagem da Figura 3.19 (e) foram unidos diminuindo a região escura ao redor da célula. A operação de limiarização resultou em uma imagem binária como mostrado na Figura 3.19 (f). A Figura 3.19 (f) apresenta ainda, alguns pixels pretos fora da célula, esses pontos foram removidos utilizando a operação morfológica de erosão que diminui ou remove os pontos da imagem menores que um valor pré-definido com relação ao tamanho do pixel. Após esta etapa obtém-se como resultado a imagem da Figura 3.19 (g) que mostra a célula segmentada. Foi utilizado um filtro detector de bordas para identificar a transição entre o fundo da imagem (região branca) e as bordas da célula (região preta) e medir a distância entre os extremos da célula, conforme mostrado na Figura 3.19 (h).

As Figura 3.20 (a) e (b) mostram o histograma da componente azul da imagem original e o histograma depois de equalizado, respectivamente.

Figura 3.20: (a) Histograma da região da imagem 104 x 50 (canto superior direito) da componente azul da imagem original. (b) Histograma equalizado da região da imagem 104 x 50 e imagem de saída (canto superior direito) após equalização de histograma.



Fonte: próprio autor.

É possível perceber um aumento no contraste da imagem com o histograma equalizado Figura 3.20(b) em relação ao da imagem da Figura 3.20(a). Percebe-se também que a maioria dos pixels da imagem com histograma equalizado possuem uma melhor distribuição intensidades entre zero (preto) e de 255 (branco), o que possibilita uma melhor distinção da borda da célula do restante da imagem.

Os resultados obtidos pelo sistema automático foram comparados com os valores da elasticidade medidos por dois experts no assunto que utilizaram o método indicado nas referências [42,80], chamado aqui de método convencional. A determinação da elasticidade por um profissional treinado leva aproximadamente 30 minutos para uma célula e é baseado na avaliação de apenas 6 imagens (1 imagem para cada velocidade). No sistema automático, os valores da elasticidade são obtidos analisando uma quantidade maior de imagens (10 para cada velocidade), aumentando a confiabilidade dos resultados obtidos.

Neste estudo foram avaliadas a elasticidade de hemácias de doadores normais (140 células) e portadores de anemia falciforme (10 células), totalizando 150 células. A Tabela 3.1 mostra os resultados obtidos pelos dois métodos.

Tabela 3.1: Elasticidade obtida pelo sistema automático e pelo método convencional para doadores controle e portadores de anemia falciforme.

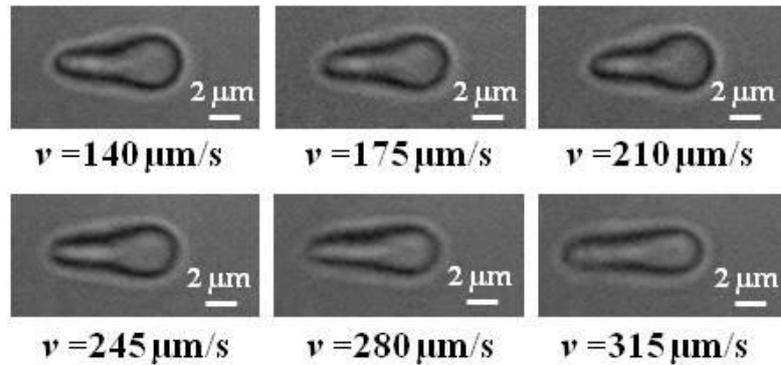
Comprimento de onda (nm)/Potência	Elasticidade μ (dina/cm x 10^{-4})	
	Método convencional	Sistema automático
1064 – 140 mW		
Controle	$6,8 \pm 0,4$	$7,4 \pm 0,4$
Anemia falciforme	$9,8 \pm 0,6$	$11,1 \pm 1,1$

Fonte: próprio autor.

A determinação da elasticidade pelo sistema automático levou cerca de 30 s, reduzindo em aproximadamente 60 x o tempo de análise. A partir dos resultados da Tabela 3.1 é possível perceber a equivalência entre os valores obtidos pelos dois métodos. Além disso, a variação da elasticidade para portadores de anemia falciforme foi de 44% (método convencional) e 50 % (sistema automático), quando comparada ao controle.

Após a hemácia ser aprisionada com a pinça óptica, ela é levada para o centro da câmara (em profundidade) e o programa é executado. A hemácia deforma-se de ΔL para cada velocidade e volta ao tamanho original. A Figura 3.21 mostra uma hemácia sendo esticada em seis velocidades diferentes.

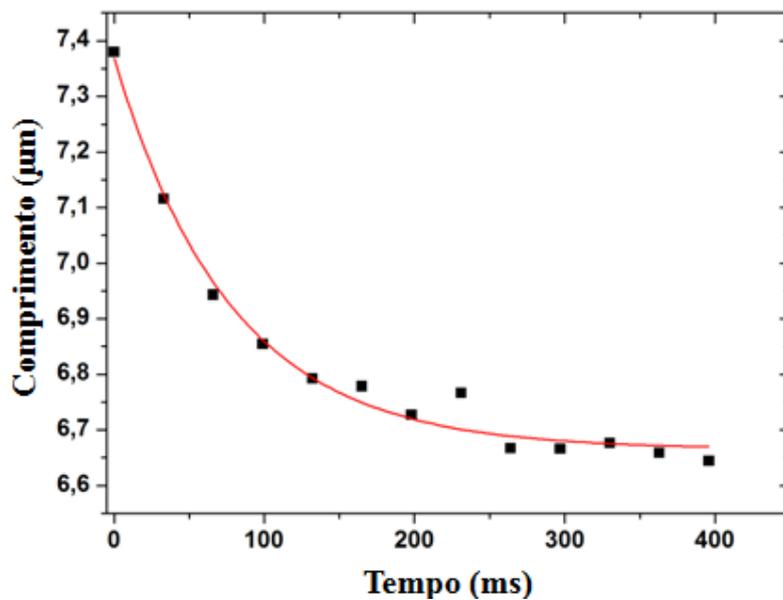
Figura 3.21: Hemácia esticada em diferentes velocidades.



Fonte: próprio autor.

Para voltar a seu tamanho original a célula leva um tempo. Para determinar este tempo a célula foi esticada com determinada velocidade e depois o estágio foi parado, desta forma a hemácia atinge sua elongação máxima e vai diminuindo de comprimento ao longo do tempo. O gráfico da Figura 3.22 representa o comportamento típico do comprimento da célula em função do tempo quando esticada com velocidade de $315 \mu\text{m/s}$, que foi a velocidade máxima utilizada nas medições, e após o estágio do microscópio ter sido parado.

Figura 3.22: Comprimento da hemácia em função do tempo.



Fonte: próprio autor.

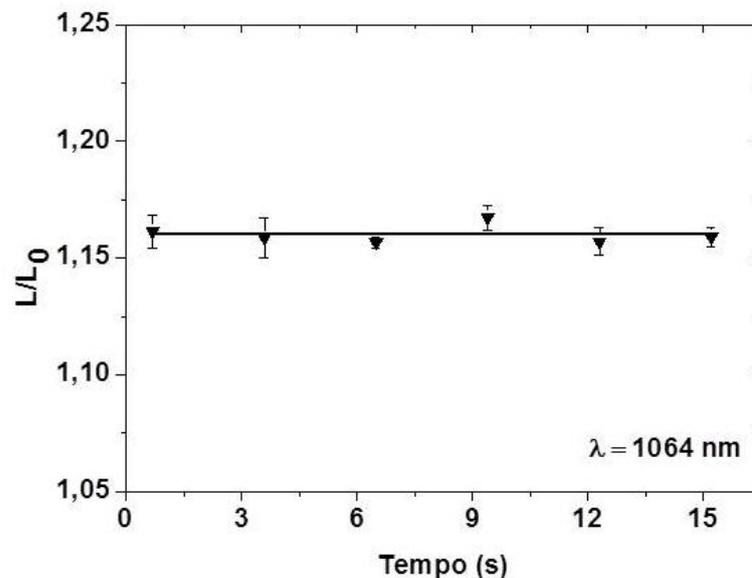
A partir do gráfico da Figura 3.22 é possível perceber que a hemácia leva aproximadamente 78 ms para voltar ao seu comprimento original. Este tempo é conhecido com tempo de relaxação e está de acordo com valores conhecidos na literatura [34,92].

3.3.2 Avaliação de dano óptico em hemácias aprisionadas opticamente através de medição de elasticidade

Danos em hemácias aprisionadas com lasers no infravermelho têm sido relatados na literatura [83,76]. Porém não existem estudos que identifiquem mudanças nas propriedades elásticas de hemácias quando aprisionadas por pinças ópticas. Em nossos estudos foi avaliada a dependência da elasticidade de hemácias com o comprimento de onda, tempo de exposição e potência incidente.

O tempo de medição da elasticidade para o sistema com o laser em 1064 nm durou cerca de 15 s após a hemácia estar aprisionada pela pinça. Com o objetivo de avaliar se, durante o processo de medição, o laser não estava ocasionando algum dano biomecânico à célula, o comprimento da mesma foi medido durante um tempo um pouco maior (17 s) para a velocidade constante de 245 $\mu\text{m/s}$. O gráfico da Figura 3.23 mostra o comportamento do comprimento relativo L/L_0 como função do tempo para 10 células.

Figura 3.23: Comprimento da hemácia versus tempo de medição para velocidade de 245 $\mu\text{m/s}$, comprimento de onda 1064 nm e potência incidente de 140 mW.

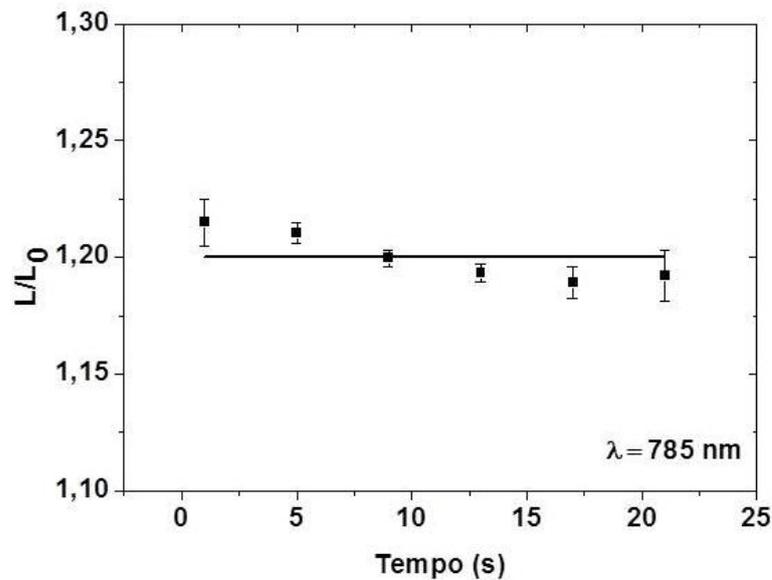


Fonte: próprio autor.

No gráfico da Figura 3.23, a linha tracejada é um guia para os olhos e corresponde a média dos comprimentos de 10 células esticadas com uma velocidade de 245 $\mu\text{m/s}$ e as barras de erros representam o desvio padrão da análise das 10 células diferentes. A partir do gráfico da Figura 3.23 é possível perceber que durante o tempo de medição não há alteração no comprimento relativo da célula, quando comparado do início da medição até o final. Isto indica que a célula volta ao seu tamanho original e que o laser de comprimento de onda 1064 nm não está causando dano durante o tempo de medição.

O tempo de medida da elasticidade para o sistema com o laser em 785 nm durou aproximadamente 20 s após a hemácia estar aprisionada pela pinça. Com o objetivo de avaliar se, durante o processo de medição, o laser não estava ocasionando algum dano biomecânico à célula, o comprimento da mesma foi medido durante 22 s para a velocidade constante de 160 $\mu\text{m/s}$. O tempo de medição para o sistema com laser de 785 nm foi maior que o de 1064 nm porque as velocidades utilizadas neste último foram maiores. O gráfico da Figura 3.24 mostra o comportamento do comprimento relativo L/L_0 como função do tempo para 10 células e comprimento de onda do laser 785 nm.

Figura 3.24: Comprimento da hemácia versus tempo de medição para velocidade de 160 $\mu\text{m/s}$, comprimento de onda 785 nm e potência incidente de 75 mW.



Fonte: próprio autor.

No gráfico da Figura 3.24, a linha tracejada é um guia para os olhos e corresponde a média dos comprimentos de 10 células esticadas com uma velocidade de 160 $\mu\text{m/s}$ e as barras de erros representam o desvio padrão da análise das 10 células diferentes. A partir do gráfico da Figura 3.24 é possível perceber que durante o tempo de medição houve uma pequena diminuição no comprimento relativo da célula, quando comparado do início da medição até o final, esta diminuição corresponde a uma variação de 2% do tamanho da célula.

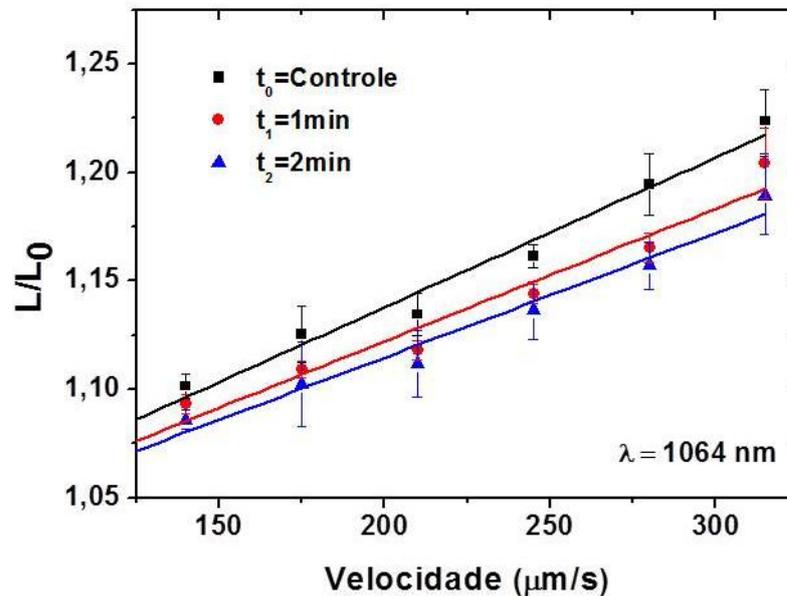
Comprimento de onda - 1064 nm

A maioria dos experimentos de pinça óptica para aprisionar células e organismos vivos utilizam lasers na região do infravermelho, no comprimento de onda de 1064 nm [34,42], e relatam que não há dano, ou existe um dano muito pequeno causado às células durante o aprisionamento. Nesses estudos, a potência do laser varia de algumas dezenas mW à centenas de mW.

Para avaliação de possíveis danos causados as hemácias durante o aprisionamento pela pinça óptica, as células de doadores normais foram aprisionadas com uma potência de 10 mW, durante três intervalos de tempo diferentes, $t_1 = 1$ minuto, $t_2 = 2$ minutos e $t_0 = 0$ (controle). Após aprisionamento, as medições da elasticidade foram feitas conforme os parâmetros descritos na seção 3.2.3. Neste estudo um total de 150 células foi avaliado.

Uma regressão linear foi realizada e o coeficiente angular da reta foi utilizado para obter o valor da elasticidade μ a partir da equação (3.6). Os valores da viscosidade do soro η e do Z_{eq} foram considerados constantes e iguais a $\eta = 1,65$ cP [80] e $Z_{eq} = 25$ μm . O valor do comprimento inicial L_0 da célula foi extraído da extrapolação do gráfico obtido, quando $v = 0$. A Figura 3.25 mostra o gráfico da elongação típico de hemácias como função da velocidade para a potência de 10 mW e diferentes tempos de aprisionamento. As barras de erros correspondem ao desvio padrão da medição dos 10 maiores comprimentos para cada velocidade.

Figura 3.25: Deformação das hemácias em função da velocidade para diferentes tempos de aprisionamento ($\lambda = 1064 \text{ nm}$).

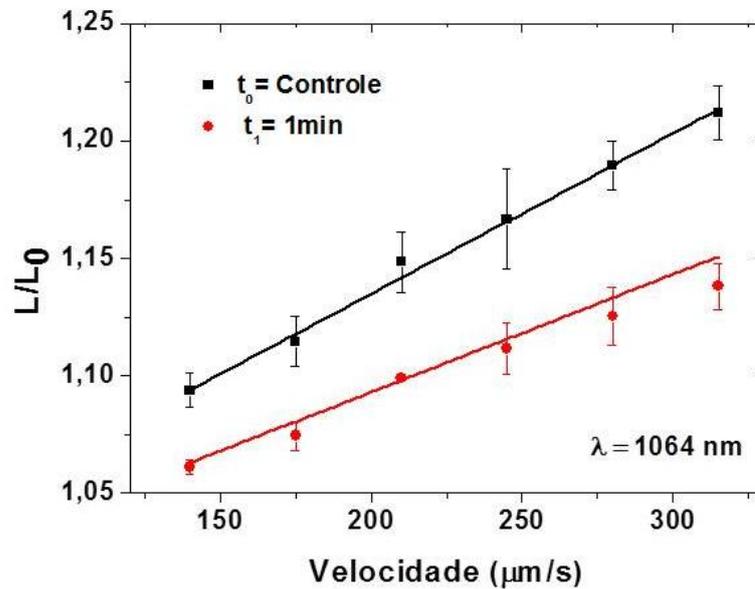


Fonte: próprio autor.

É possível perceber a partir do gráfico da Figura 3.25 que existe uma pequena mudança nas inclinações das retas nos tempos $t_1 = 1 \text{ min}$ e $t_2 = 2 \text{ min}$ quando comparado ao tempo controle. Tal mudança indica uma variação na elasticidade da célula, que é atribuída ao dano causado pelo laser durante o aprisionamento. O aumento percentual da elasticidade para os tempos t_1 e t_2 foram de 15% e 19% quando comparados a elasticidade μ_0 do grupo controle ($t_0 = 0$).

No uso de pinças ópticas para medição de elasticidade é necessário a utilização de lasers com potências maiores que 100 mW (na amostra), uma vez que a força de aprisionamento deve ser suficiente para esticar a célula. Desta forma, também foi avaliada a influência do tempo de aprisionamento durante a medição da elasticidade das hemácias aprisionadas numa potência de 140 mW. Os tempos utilizados foram o tempo controle ($t_0 = 0$) e $t_1 = 1$ minuto. Neste estudo um total de 115 células foi avaliado. A Figura 3.26 mostra o gráfico da elongação típico de hemácias como função da velocidade para a potência de 140 mW para os tempos controle ($t_0 = 0$) e $t_1 = 1$ minuto. As barras de erros correspondem ao desvio padrão da medição dos 10 maiores comprimentos para cada velocidade.

Figura 3.26: Deformação das hemácias em função da velocidade para diferentes tempos de aprisionamento ($\lambda = 1064$ nm).



Fonte: próprio autor.

A partir do gráfico da Figura 3.26 é possível perceber uma diminuição significativa na elasticidade da célula, quando são expostas a uma potência de 140 mW e tempo de aprisionamento de 1 min, comparada ao tempo t_0 . Foi encontrado que μ_1 é cerca 53 % maior que μ_0 , ou seja, as células tornaram-se mais rígidas após aprisionadas por 1 minuto. Quando expostas à potência de 140 mW e tempo de aprisionamento de 2 minutos, as hemácias sofreram danos irreversíveis, impossibilitando realizar as medições, uma vez que a forma da mesma também foi afetada.

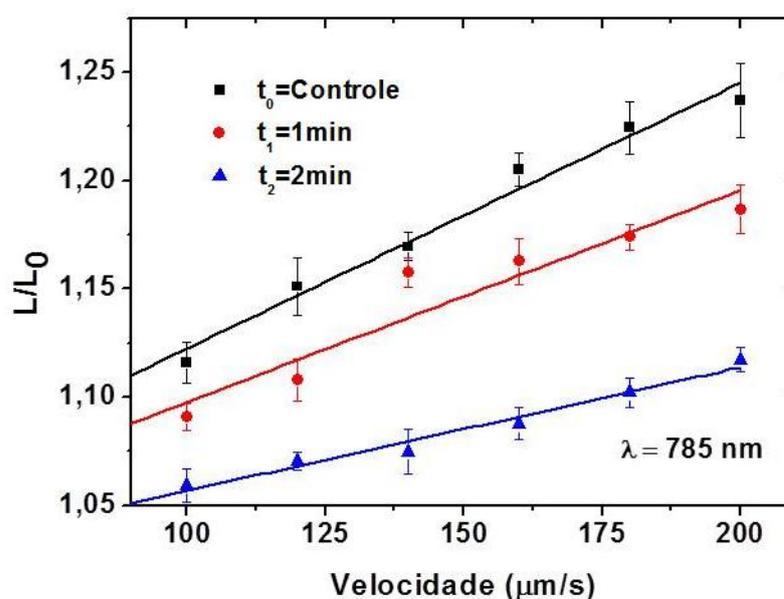
Comprimento de onda - 785 nm

Para avaliação de possíveis danos causados as hemácias durante o aprisionamento pela pinça óptica, as células de doadores normais foram aprisionadas com uma potência de 10 mW, durante três intervalos de tempo diferentes, $t_1 = 1$ minuto, $t_2 = 2$ minutos e $t_0 = 0$ (controle). Após aprisionamento, as medições da elasticidade foram feitas conforme os parâmetros descritos na seção 3.2.3. Neste estudo um total de 170 células foi avaliado.

A Figura 3.27 mostra o gráfico da elongação típico de hemácias como função da velocidade para a potência após aprisionamento com diferentes tempos de retenção. As barras

de erros correspondem ao desvio padrão da medição dos 10 maiores comprimentos para cada velocidade.

Figura 3.27: Deformação das hemácias em função da velocidade para diferentes tempos de aprisionamento ($\lambda = 785$ nm e potência de 10 mW).



Fonte: próprio autor.

É possível perceber diferenças no coeficiente angular da reta, ajustada pela equação (3.5), com o aumento no tempo em que a hemácia fica aprisionada. Esta diminuição no coeficiente angular representa uma diminuição na elasticidade da célula. No tempo t_0 a elasticidade μ_0 obtida foi de $6,7 \cdot 10^{-4}$ dina/cm, enquanto para o tempo t_1 e t_2 houve um aumento de 54 % e 104 %, com relação à μ_0 , respectivamente.

Danos em hemácias aprisionadas com laser no comprimento de onda 785 nm foram mostrados através da técnica de espectroscopia Raman por de OLIVEIRA et al. Os autores mostraram que nos primeiros 600 s há um dano fotoquímico, para uma potência de 10 mW. Nossos resultados mostram que há um dano na célula provocado pelo laser nos primeiros 60 s de aprisionamento medido indiretamente pela mudança na elasticidade da hemácia.

A Tabela 3.2 mostra os resultados obtidos da elasticidade, para os dois comprimentos de onda, utilizando as potências incidentes de 10 mW e 140 mW.

Tabela 3.2: Elasticidade das hemácias para diferentes potências, comprimentos de onda e tempos de aprisionamento.

Comprimento de onda (nm)/Potência	Elasticidade μ (dina/cm x 10^{-4})		
	Controle	$t_1 = 1$ min	$t_2 = 2$ min
785 – 10 mW	$6,7 \pm 0,3$	$10,3 \pm 0,5$	$13,7 \pm 0,5$
1064 – 10 mW	$6,8 \pm 0,3$	$7,8 \pm 0,3$	$8,1 \pm 0,4$
1064 – 140 mW	$6,8 \pm 0,3$	$10,4 \pm 0,3$	-

Fonte: próprio autor.

A partir da Tabela 3.2 nota-se que os aumentos percentuais da elasticidade para o comprimento de onda 1064 nm em 1 minuto e 2 minutos foram de 15 % e 19 % comparados ao grupo controle, respectivamente. Estes valores são menores que o obtido com o comprimento de onda de 785 nm nas mesmas condições de aprisionamento, 54% em 1 minuto e 104 % em dois minutos. Este resultado indica que o comprimento de onda de 1064 nm causa menos dano à hemácia quando comparado ao comprimento de onda de 785 nm. Além disso, para o comprimento de onda de 1064 nm e potência de 140 mW, o aumento percentual para o tempo de 1 minuto de aprisionamento foi de 53%.

O sistema automatizado para medição de elasticidade de hemácias reduziu o tempo de obtenção da elasticidade em 60 x, quando comparados com o método convencional. Além disso, o sistema possibilitou a avaliação de danos em hemácias aprisionadas opticamente em diferentes comprimentos de onda e tempos de aprisionamento. O sistema automatizado pode ajudar a expandir as aplicações de pinças ópticas em Hematologia e Hemoterapia.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

4.1 Conclusões

Neste trabalho foi explorado o uso de lasers infravermelhos em aplicações biomédicas. Na primeira parte do trabalho foram investigados alguns parâmetros da ablação de bolsas de sangue utilizando um laser de femtossegundos com comprimento de onda de 800 nm, nas taxas de repetição de 10 Hz e 1 KHz.

O tempo médio de perfuração das bolsas de sangue mostrou-se dependente da fluência aplicada e da taxa de repetição do laser, variando de 23 ± 2 até 29 ± 2 s para fluências entre 12,6 e 4,7 J/cm² (10 Hz) e $0,18 \pm 0,02$ s até $0,8 \pm 0,2$ s para fluências entre 12,6 e 2,1 J/cm² (1 KHz).

As taxas de ablação obtidas foram de até $2,0 \pm 0,2$ μm/pulso (1 KHz) e $1,6 \pm 0,1$ μm/pulso (10 Hz). As taxas de ablação foram maiores para a taxa de repetição de 1 KHz, sugerindo que efeitos térmicos provocados por múltiplos pulsos nesta taxa de repetição favorecessem o aumento na taxa de ablação. Além disso, a profundidade de ablação aumentou quase linearmente com o aumento do número de pulsos laser. Os diâmetros das perfurações também mostraram uma dependência com a fluência aplicada. Foram avaliados também, os resíduos gasosos produzidos pela ablação das bolsas de sangue utilizando FTIR e indiretamente através de medições de pH. Os resultados mostraram uma diminuição de resíduos liberado com a diminuição da fluência e mostrou-se ser menor que a ablação com lasers cw em PVC (principal constituinte das bolsas de sangue), resultado da referência [59]. Estes resultados resultaram em um trabalho completo no XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica e em dois trabalhos apresentados em simpósios.

A avaliação dos parâmetros de ablação à laser de bolsas de sangue consiste em um estudo pioneiro e introduz um direcionamento inovador no processo de corte das mesmas.

Na segunda parte do trabalho foi desenvolvido um sistema para avaliação automática de elasticidade de hemácias aprisionadas opticamente utilizando lasers nos comprimentos de onda de 785 nm e 1064 nm. O sistema permitiu obter o valor da elasticidade de uma célula em 20 segundos e houve uma redução significativa de tempo (60 ×) comparada ao método convencional. Estes resultados resultaram em um artigo no periódico Review Scientific Instruments, um trabalho completo no XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica e um resumo publicado no congresso internacional SPIE Biophotonics South America.

Um resultado, obtido com o uso do sistema automático consistiu na avaliação de danos em hemácias. Observou-se que os danos causados à célula foram maiores para 785 nm do que para 1064 nm durante aprisionamento óptico delas. Este dano é devido a maior absorção pela hemoglobina nessa região espectral. As hemácias, após 2 minutos de exposição ao laser de 785 nm foram até ~ 104% menos deformável que as hemácias controle. A exposição de 2 minutos a 10 mW de 1064 nm a laser induziu um aumento de até ~ 19% na rigidez celular. Nossos resultados estabelecem novos limites para aplicações utilizando lasers em hemácias, identificando modificações consideráveis em suas propriedades elásticas. Estes resultados resultaram em um artigo submetido a revista *Journal of Biomedical Optics* e um trabalho aceito no SPIE Photonics West BiOS.

4.2 Perspectivas futuras

4.2.1 Aplicação do sistema de medição automática de elasticidade de hemácias em hemoglobinopatias

O sistema automático de medição de elasticidade desenvolvido neste trabalho introduziu um grande avanço no processo de avaliação de elasticidade de células por pinça óptica. O sistema de pinça óptica com laser em 1064 nm já está sendo utilizado para avaliar a elasticidade de hemácias de pacientes portadores de anemia falciforme e talassemia.

Anemia falciforme

A anemia falciforme consiste de uma doença hemolítica congênita, na qual ocorre a substituição do ácido glutâmico pela valina, na sexta posição da cadeia beta da hemoglobina, dando origem a uma hemoglobina anormal, a hemoglobina S (Hbs). A hemoglobina A hemoglobina S se polimeriza quando desoxigenada e forma agregados mudando a morfologia da hemácia, que fica com forma semelhante à de uma foice.

As células falciformes podem bloquear os vasos, comprometendo a entrega de oxigênio. Alguns trabalhos têm mostrado um aumento na rigidez de hemácias portadoras de anemia falciforme comparadas com hemácias normais [42,75]

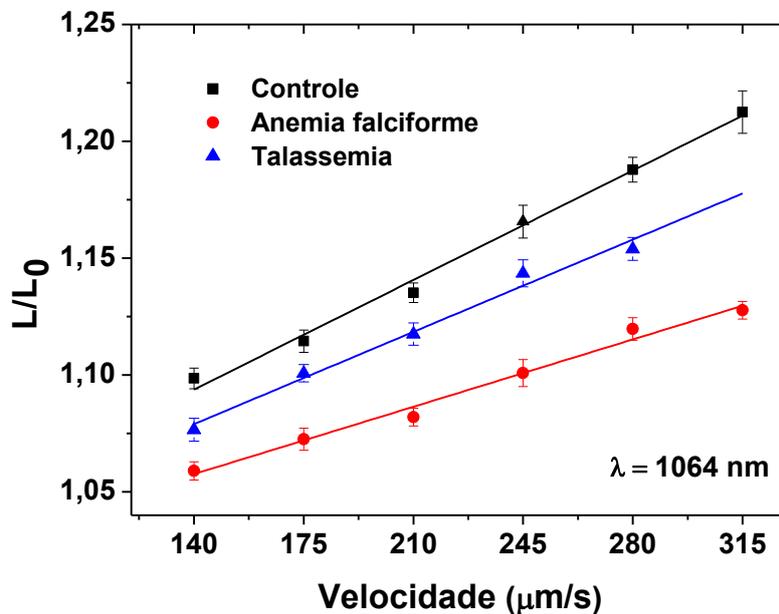
Talassemias

As talassemias constituem um grupo heterogêneo de doenças genéticas devido a diminuição na taxa de síntese de uma das cadeias de globina. Talassemias são classificadas de acordo com qual molécula da cadeia de globina é afetada. Na α -talassemia, a produção de globina α é deficiente, enquanto que na β -talassemia é a produção de globina β que é baixa.

Usando o sistema automático implementado no Laboratório de Óptica Biomédica e Imagens, foram avaliadas hemácias de três grupos, o grupo controle (150 células) o grupo de pacientes portadores de anemia falciforme (10 células) e o grupo de portadores de β -talassemia (15 células). As amostras dos pacientes portadores de anemia falciforme e talassemia foram coletadas no Hemope – Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco. O preparo seguiu o mesmo protocolo descrito na seção 3.2.1.

A Figura 4.1 apresenta um resultado prévio da elasticidade, obtido utilizando o sistema no comprimento de onda de 1064 nm.

Figura 4.1: Deformação em função da velocidade para hemácias de doadores normais (controle), portadores de anemia falciforme e talassemia ($\lambda = 1064$ nm).



Fonte: próprio autor.

A partir do gráfico da Figura 4.1 é possível perceber um aumento na rigidez das hemácias de pacientes portadores de talassemia e também de portadores de anemia falciforme

comparada à ao grupo controle. Valores preliminares para elasticidade das células estudadas são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Elasticidade das hemácias para o grupo controle, portadores de anemia falciforme e talassemia.

Comprimento de onda (nm)	Elasticidade μ (dina/cm x 10^{-4})		
	Controle	Talassemia	Anemia falciforme
1064 nm	$6,8 \pm 0,27$	$8,7 \pm 1,5$	$11,1 \pm 1,1$

Fonte: próprio autor.

Verifica-se um aumento de 28% para talassemia e 63 % para anemia falciforme, comparando com a elasticidade de células normais.

4.2.2 Associação do sistema de pinça óptica a um sistema de microcirurgia celular

Existem diversas técnicas para introduzir substâncias exógenas em células, dentre elas destacam-se microinjeção, eletroporação, vetores virais, técnicas baseadas em ultrassom e fotoporação. A última técnica merece destaque, pois não se tem contato mecânico com a célula e o instrumento de corte e permite ainda a introdução de substâncias em células individuais. Além disso, o sistema de fotoporação pode ser acoplado a um sistema de pinça óptica para manipulação das células. Um fator determinante para conseguir uma eficiência de fotoporação alta é localizar com precisão a membrana celular.

A introdução de substâncias em células utilizando a técnica de fotoporação foi realizada pela primeira vez em 1984 por Tsukakoshi et al. [21]. A partir deste estudo diversos lasers têm sido utilizados para realizar microcirurgias em células como lasers CW e de nanossegundos. Para reduzir os danos térmicos causados à célula durante a interação laser pode-se utilizar lasers com pulsos de duração de femtossegundos. Laser de femtossegundos foi utilizado pela primeira vez para criação de poros transientes e introdução de DNA em células de ovários de hamster chinês (CHO) [101]. Algumas modificações nos sistemas de fotoporação de células têm sido sugeridas, por exemplo, a utilização de uma fibra óptica para entrega dos pulsos [102] e também a utilização de feixes Bessel para aumentar a eficiência de fotoporação [103]. Além disso, o sistema de fotoporação tem sido associado a um sistema de pinça óptica equipado com um detector de quadrantes, na tentativa de determinar a posição da membrana da célula. O aumento da eficiência de fotoporação é de fundamental importância e

depende de diversos fatores como intensidade, tempo de exposição, determinação da posição da membrana celular, etc.

Durante o período de doutorado, também foi iniciada a demonstração de nova proposta para aumentar a eficiência de fotoporação. A ideia inovadora consistia em utilizar marcadores fluorescentes de membrana celular e fazer o uso da técnica de fluorescência por absorção de dois fótons para determinar a posição da membrana. Resultados preliminares são apresentados no apêndice A.

REFERÊNCIAS

- [1] MAIMAN, T. H. Stimulated Optical Radiation in Ruby. **Nature**, v. 187, n. 4736, p. 493-494, 1960.
- [2] DAHOTRE, N. B.; HARIMKAR, S. **Laser Fabrication and Machining of Materials**. [S.l.]: Springer US, 2008.
- [3] SCHUBERT, E. et al. Light-weight structures produced by laser beam joining for future applications in automobile and aerospace industry. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 115, n. 1, p. 2-8, 2001.
- [4] BÄRSCH, N. et al. Ablation and cutting of planar silicon devices using femtosecond laser pulses. **Applied Physics A**, v. 77, n. 2, p. 237-242, 2003.
- [5] CHOUDHURY, I. A.; SHIRLEY, S. Laser cutting of polymeric materials: An experimental investigation. **Optics & Laser Technology**, v. 42, n. 3, p. 503-508, 2010.
- [6] YEO, C. Y. et al. A technical review of the laser drilling of aerospace materials. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 42, n. 1, p. 15-49, 1994.
- [7] MENDONCA, C. R. et al. Three-dimensional fabrication of optically active microstructures containing an electroluminescent polymer. **Applied Physics Letters**, v. 95, n. 11, p. 113309, 2009.
- [8] LIPPERT, T. UV Laser Ablation of Polymers: From Structuring to Thin Film Deposition. **Springer Series in Materials Science**, p. 141-175, 2009.
- [9] SEET, H. L. et al. Laser-drilled PVC template for electrodeposition of multi-core orthogonal fluxgate sensing element. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 209, n. 9, p. 4429-4433, 2009.
- [10] NIEMZ, M. Laser-Tissue applications- Fundamentals and applications. [New York],: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004.
- [11] SERAFETINIDES, A. A. et al. Picosecond and subpicosecond visible laser ablation of optically transparent polymers. **Applied Surface Science**, v. 135, n. 1-4, p. 276-284, 1998.

- [12] SPYRATOU, E.; MAKROPOULOU, M.; SERAFETINIDES, A. A. Study of visible and mid-infrared laser ablation mechanism of PMMA and intraocular lenses: experimental and theoretical results. **Lasers in Medical Science**, v. 23, n. 2, p. 179-188, 2007.
- [13] DORRONSORO, C. et al. Suitability of Filofocin A and PMMA for experimental models in excimer laser ablation refractive surgery. **Optics Express**, v. 16, n. 25, p. 20955-67, 2008.
- [14] BAUDACH, S.; BONSE, J.; KAUTEK, W. Ablation experiments on polyimide with femtosecond laser pulses. **Applied Physics A: Materials Science & Processing**, v. 69, n. 7, p. S395-S398, 1999.
- [15] OKOSHI, M.; INOUE, N. Laser ablation of polymers using 395 nm and 790 nm femtosecond lasers. **Appl Phys A**, v. 79, n. 4-6, 2004.
- [16] LEE, A. J.; DAWES, J. M.; WITHFORD, M. J. Investigation of femtosecond laser induced thermal ablation of polyethylene. **Journal of Laser Applications**, v. 20, n. 3, p. 154, 2008.
- [17] MASMIATI, N.; PHILIP, P. K. Investigations on laser percussion drilling of some thermoplastic polymers. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 185, n. 1-3, p. 198-203, 2007.
- [18] CANEL, T.; KAYA, A. U.; ÇELİK, B. Parameter optimization of nanosecond laser for microdrilling on PVC by Taguchi method. **Optics & Laser Technology**, v. 44, n. 8, p. 2347-2353, 2012.
- [19] FAUCOMPRE, A. et al. Machine for continuously cutting open bags of plasma. **US 5361661 A**, 1994.
- [20] MOURA, D. S.; L., F. E.; DE ARAUJO, R. E. **Avaliação do uso de lasers de femtossegundos no corte de bolsas de sangue**. ANAIS - XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB, 2014.

- [21] TSUKAKOSHI, M. et al. A novel method of DNA transfection by laser microbeam cell surgery. **Applied Physics B Photophysics and Laser Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 135-40, 1984.
- [22] WALEED, M. et al. Single-cell optoporation and transfection using femtosecond laser and optical tweezers. **Biomedical Optics Express**, v. 4, n. 9, p. 1533, 2013.
- [23] BARAD, Y. et al. Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation. **Applied Physics Letters**, v. 70, n. 8, p. 922, 1997.
- [24] ASHKIN, A.; DZIEDZIC, J. M.; YAMANE, T. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. **Nature**, v. 330, n. 6150, p. 769-771, 1987.
- [25] ASHKIN, A. et al. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. **Optics Letters**, v. 11, n. 5, p. 288, 1986.
- [26] ASHKIN, A.; DZIEDZIC, J. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. **Science**, v. 235, p. 1517-520, 1987.
- [27] SVOBODA, K.; BLOCK, S. M. Biological Applications of Optical Forces. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 23, n. 1, p. 247-285, 1994.
- [28] NEUMAN, K. C.; BLOCK, S. M. Optical trapping. **Review of Scientific Instruments**, v. 75, n. 9, p. 2787, 2004.
- [29] LEE, K. et al. Probing the Red Blood Cells Aggregating Force With Optical Tweezers. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, p. 1-6, 2016.
- [30] WANG, M. D. et al. Stretching DNA with optical tweezers. **Biophysical Journal**, v. 72, n. 3, p. 1335-1346, 1997.
- [31] MEHTA, A. D. Single-Molecule Biomechanics with Optical Methods. **Science**, v. 283, n. 5408, p. 1689-1695, 1999.
- [32] BAZONI, R. F. et al. Force-dependent persistence length of DNA-intercalator complexes measured in single molecule stretching experiments. **Soft Matter**, v. 11, n. 21, p. 4306-4314, 2015.

- [33] FONTES, A. et al. Mechanical and electrical properties of red blood cells using optical tweezers. **J. Opt.**, v. 13, n. 4, p. 044012, 2011.
- [34] HÉNON, S. et al. A New Determination of the Shear Modulus of the Human Erythrocyte Membrane Using Optical Tweezers. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 2, p. 1145-1151, 1999.
- [35] AGRAWAL, R. et al. Assessment of red blood cell deformability in type 2 diabetes mellitus and diabetic retinopathy by dual optical tweezers stretching technique. **Scientific Reports**, v. 6, p. 15873, 2016.
- [36] YOUSAFZAI, M. S. et al. Substrate-dependent cell elasticity measured by optical tweezers indentation. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 76, p. 27-33, 2016.
- [37] GROVER, S. C. et al. Automated single-cell sorting system based on optical trapping. **Journal of Biomedical Optics**, v. 6, n. 1, p. 14, 2001.
- [38] WANG, X. et al. Enhanced cell sorting and manipulation with combined optical tweezer and microfluidic chip technologies. **Lab Chip**, v. 11, n. 21, p. 3656, 2011.
- [39] CHEN, S. et al. Laser-induced fusion of human embryonic stem cells with optical tweezers. **Applied Physics Letters**, v. 103, n. 3, p. 033701, 2013.
- [40] KANTAWANG, T. et al. Application of optical tweezers and excimer laser to study protoplast fusion. **International Conference on Photonics Solutions 2015**, Jul 2015.
- [41] CLEMENT-SENGEWALD, A. et al. Fertilization of bovine oocytes induced solely with combined laser microbeam and optical tweezers. **J Assist Reprod Genet**, v. 13, n. 3, p. 259-265, 1996.
- [42] BRANDÃO, M. M. et al. Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to the study of drug response in sickle cell disease. **Eur J Haematol**, v. 70, n. 4, p. 207-211, 2003.
- [43] THORLABS. Disponível em:
"https://www.thorlabs.de/navigation.cfm?guide_id=2323". Acesso em 21 de dezembro de 2015.

- [44] SCIENTIFIC, E. Disponível em: "<http://www.elliotscientific.com/140-0/Optical-Tweezer-Systems/>". Acesso em 21 de dezembro de 2015.
- [45] BREECH, F.; CROSS, L. Optical micromission stimulated by a ruby laser. **Applied Spectroscopy**, v. 16, n. 2, p. 59, 1962.
- [46] WALSH., J. T. et al. Pulsed CO₂ laser tissue ablation: Effect of tissue type and pulse duration on thermal damage. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 108-118, 1988.
- [47] SRINIVASAN, R.; MAYNE-BANTON, V. Self-developing photoetching of poly(ethylene terephthalate) films by far-ultraviolet excimer laser radiation. **Appl. Phys. Lett.**, v. 41, n. 6, p. 576, 1982.
- [48] HJORTDAL, J. O. et al. Corneal power, thickness, and stiffness: Results of a prospective randomized controlled trial of PRK and LASIK for myopia. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 31, n. 1, p. 21-29, 2005.
- [49] SHORTT, A. J.; BUNCE, C.; ALLAN, B. D. S. Evidence for Superior Efficacy and Safety of LASIK over Photorefractive Keratectomy for Correction of Myopia. **Ophthalmology**, v. 113, n. 11, p. 1897-1908, 2006.
- [50] LENZNER, M. et al. Femtosecond Optical Breakdown in Dielectrics. **Physical Review Letters**, v. 80, n. 18, p. 4076-4079, 1998.
- [51] NEEV, J. et al. Ultrashort pulse lasers for hard tissue ablation. **IEEE J. Select. Topics Quantum Electron.**, v. 2, n. 4, p. 790-800, 1996.
- [52] STUART, B. et al. Nanosecond-to-femtosecond laser-induced breakdown in dielectrics. **Phys. Rev. B**, v. 53, n. 4, p. 1749-1761, 1996.
- [53] CHICHKOV, B. N. et al. Femtosecond, picosecond and nanosecond laser ablation of solids. **Applied Physics A Materials Science & Processing**, v. 63, n. 2, p. 109-115, 1996.
- [54] HE, M. et al. Buffer-gas assisted high irradiance femtosecond laser ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometry for rapid depth profiling. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 28, n. 4, p. 499, 2013.

- [55] ANISIMOV, S. I.; KAPELIOVICH, B. L.; PERELMAN, T. L. Electron emission from metal surfaces exposed to ultrashort laser pulses. **Zhurnal Eksperimentalnoi i Teoreticheskoi Fiziki**, v. 66, p. 776-781, 1974.
- [56] MARONGIU, A. et al. Thermal degradation of poly(vinyl chloride). **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 70, n. 2, p. 519-553, 2003.
- [57] VASSIE, L. H. et al. Fumes generated during laser processing of polyvinyl chloride (PVC). **Optics & Laser Technology**, v. 27, n. 1, p. 31-37, 1995.
- [58] KUPCÍK, J. et al. IR laser-induced decomposition of poly(vinyl chloride-co-vinyl acetate): Control of products by irradiation conditions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, n. 11, p. 2560-2566, 2006.
- [59] BLAZEVSKA-GILEV, J. et al. IR laser ablation of poly(vinyl chloride): Formation of monomer and deposition of nanofibres of chlorinated polyhydrocarbon. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, n. 2, p. 213-220, 2006.
- [60] HERNÁNDEZ, L. C. et al. On the Nd:YAG pulsed laser processing of rigid PVC. **Seventh Symposium Optics in Industry**, 2009.
- [61] MAGUIRE, L. P.; SZILAGYI, S.; SCHOLTEN, R. E. High performance laser shutter using a hard disk drive voice-coil actuator. **Review of Scientific Instruments**, v. 75, n. 9, p. 3077, 2004.
- [62] KIANG, Y. C.; LANG, R. W. Measuring focused Gaussian beam spot sizes: a practical method. **Applied Optics**, v. 22, n. 9, p. 1296, May 1983.
- [63] KIMURA, S.; MUNAKATA, C. Measurement of a Gaussian laser beam spot size using a boundary diffraction wave. **Applied Optics**, v. 27, n. 1, p. 84, Jan 1988.
- [64] SUZAKI, Y.; TACHIBANA, A. Measurement of the um sized radius of Gaussian laser beam using the scanning knife-edge. **Applied Optics**, v. 14, n. 12, p. 2809, Dec 1975.
- [65] GONZÁLEZ-CARDEL, M.; ARGUIJO, P.; DÍAZ-URIBE, R. Gaussian beam radius measurement with a knife-edge: a polynomial approximation to the inverse error function. **Applied Optics**, v. 52, n. 16, p. 3849, 2013.

- [66] TSENG, A. A.; CHEN, Y.-T.; MA, K.-J. Fabrication of high-aspect-ratio microstructures using excimer laser. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 41, n. 6, p. 827-847, 2004.
- [67] BURNS, F. C.; CAIN, S. R. The effect of pulse repetition rate on laser ablation of polyimide and polymethylmethacrylate-based polymers. **J. Phys. D: Appl. Phys.**, v. 29, n. 5, p. 1349-1355, 1996.
- [68] ILLY, E. K. et al. Enhanced polymer ablation rates using high-repetition-rate ultraviolet lasers. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 5, n. 6, p. 1543-1548, 1999.
- [69] LEME, F. O. et al. Effect of pulse repetition rate and number of pulses in the analysis of polypropylene and high density polyethylene by nanosecond infrared laser induced breakdown spectroscopy. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 8, p. 3598-3603, 2012.
- [70] PHAM, D. et al. Effects of polymer properties on laser ablation behaviour. **Smart Materials and Structures**, v. 11, n. 5, p. 668-674, 2002.
- [71] TURGEON, M. L. **Clinical hematology: theory and procedures**. [S.l.]: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
- [72] TOMAIUOLO, G. Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. **Biomicrofluidics**, v. 8, n. 5, p. 051501, Sep 2014. ISSN ISSN: 1932-1058.
- [73] KIM, Y.; KIM, K.; PARK, Y. Measurement Techniques for Red Blood Cell Deformability: Recent Advances. **Blood Cell - An Overview of Studies in Hematology**, 2012.
- [74] GLENISTER, F. K. Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells. **Blood**, v. 99, n. 3, p. 1060-1063, 2002.
- [75] MOURA, D. S. et al. Automatic real time evaluation of red blood cell elasticity by optical tweezers. **Review of Scientific Instruments**, v. 86, n. 5, p. 053702, 2015.

- [76] DASGUPTA, R. et al. Hemoglobin degradation in human erythrocytes with long-duration near-infrared laser exposure in Raman optical tweezers. **Journal of Biomedical Optics**, v. 15, n. 5, p. 055009, 2010.
- [77] BARJAS-CASTRO, M. L. et al. Elastic properties of irradiated RBCs measured by optical tweezers. **Transfusion**, v. 42, n. 9, p. 1196-1199, 2002.
- [78] DE LUCA, A. C. et al. Spectroscopical and mechanical characterization of normal and thalassemic red blood cells by Raman Tweezers. **Optics Express**, v. 16, n. 11, p. 7943, 2008.
- [79] HAQUE, M. M. et al. Stretching of red blood cells using an electro-optics trap. **Biomed. Opt. Express**, v. 6, n. 1, p. 118, 2014.
- [80] SILVA, D. C. N. et al. Optical Tweezers as a New Biomedical Tool to Measure Zeta Potential of Stored Red Blood Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31778, 2012.
- [81] TOMAIUOLO, G. et al. Microfluidics analysis of red blood cell membrane viscoelasticity. **Lab Chip**, v. 11, n. 3, p. 449-454, 2011.
- [82] ZENG, N. F.; RISTENPART, W. D. Mechanical response of red blood cells entering a constriction. **Biomicrofluidics**, v. 8, n. 6, p. 064123, 2014.
- [83] DE OLIVEIRA, M. A. S. et al. Long term Raman spectral study of power-dependent photodamage in red blood cells. **Applied Physics Letters**, v. 104, n. 10, p. 103702, 2014.
- [84] DAO, M.; LIM, C. T.; SURESH, S. Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers. **Journal of the Mechanics and Physics of Solids**, v. 51, n. 11-12, p. 2259-2280, 2003.
- [85] MARINKOVIC, M. et al. Febrile temperature leads to significant stiffening of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. **AJP: Cell Physiology**, v. 296, n. 1, p. C59-C64, 2008.
- [86] REY, J. et al. Reduced erythrocyte deformability associated with hypoargininemia during Plasmodium falciparum malaria. **Scientific Reports**, v. 4, 2014.

- [87] BAMBARDEKAR, K. et al. Measuring erythrocyte deformability with fluorescence, fluid forces, and optical trapping. **Journal of Biomedical Optics**, v. 13, n. 6, p. 064021, 2008.
- [88] DULINSKA, I. et al. Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 66, n. 1-3, p. 1-11, 2006..
- [89] ASHKIN, A. Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. **Physical Review Letters**, v. 24, n. 4, p. 156-159, 1970.
- [90] ASHKIN, A. Optical Levitation by Radiation Pressure. **Appl. Phys. Lett.**, v. 19, n. 8, p. 283, 1971.
- [91] HARADA, Y.; ASAKURA, T. Radiation forces on a dielectric sphere in the Rayleigh scattering regime. **Optics Communications**, v. 124, n. 5-6, p. 529-541, 1996.
- [92] FONTES, A. **Sistema de Micromanipulação e Microanálise com Pinças Ópticas**. Universidade Estadual de Campinas. [S.l.]. 2004.
- [93] BERNIS, M. W. et al. Optical trapping in animal and fungal cells using a tunable, near-infrared titanium-sapphire laser. **Experimental Cell Research**, v. 198, n. 2, p. 375-378, 1992.
- [94] SHAEVITZ, J. W. A practical guide to optical trapping. **Technical report, Princeton University**, v. 8, p. 6, 2006.
- [95] DAVIDSON, M. W. Numerical Aperture. Disponível em <https://www.microscopyu.com/articles/formulas/formulasna.html>, Acesso em nov. 2015.
- [96] IL'INA, I. V. et al. Noncontact microsurgery and micromanipulation of living cells with combined system femtosecond laser scalpel-optical tweezers. **Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care III**, 2012.
- [97] HUANG, Y.-Y. Low-level laser therapy: an emerging clinical paradigm. **SPIE Newsroom**, 2009.

- [98] NEUMAN, K. C. et al. Characterization of Photodamage to Escherichia coli in Optical Traps. **Biophysical Journal**, v. 77, n. 5, p. 2856-2863, 1999.
- [99] LIANG, H. et al. Wavelength dependence of cell cloning efficiency after optical trapping. **Biophysical Journal**, v. 70, n. 3, p. 1529-1533, 1996.
- [100] RAFAEL C. GONZALEZ, R. E. W. **Processamento Digital De Imagens**. 3. ed. [S.l.]: Pearson, 2010.
- [101] TIRLAPUR, U. K.; KÖNIG, K. Cell biology: Targeted transfection by femtosecond laser. **Nature**, v. 418, n. 6895, p. 290-291, 2002.
- [102] MA, N.; GUNN-MOORE, F.; DHOLAKIA, K. Optical transfection using an endoscope-like system. **Journal of Biomedical Optics**, v. 16, n. 2, p. 028002, 2011.
- [103] TSAMPOULA, X. et al. Femtosecond cellular transfection using a nondiffracting light beam. **Appl. Phys. Lett.**, v. 91, n. 5, p. 053902, 2007.

APÊNDICES

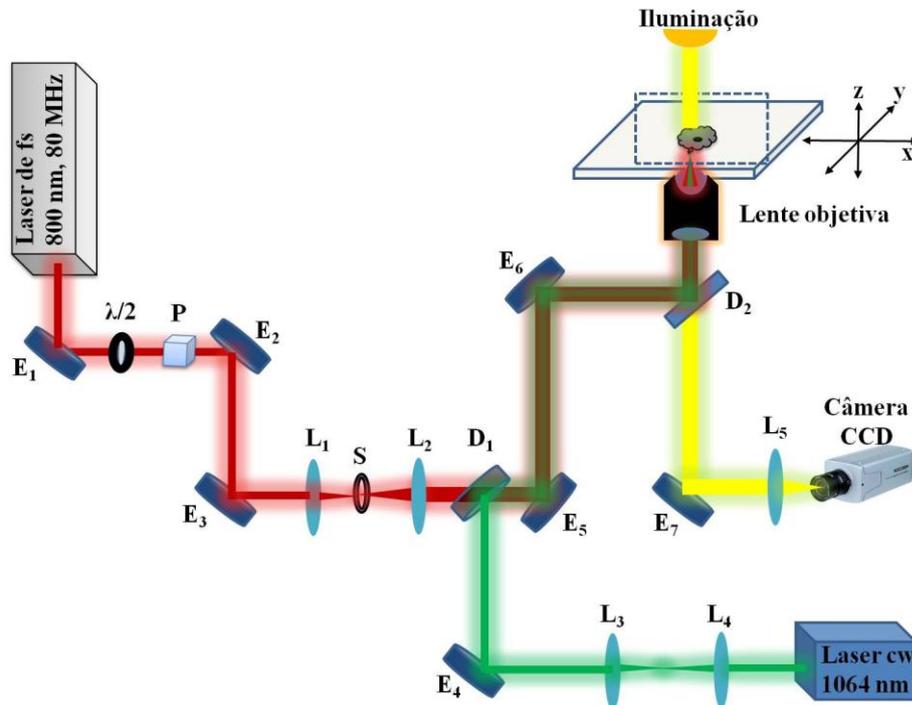
A. Resultados preliminares do sistema de fotoporação de células

O sistema de microcirurgia celular (fotoporação) foi construído no Laboratório de Óptica Biomédica e Imagens (LOBI) da UFPE como mostrado no diagrama da Figura A.1.

Para realização das microcirurgias nas células foi utilizado um laser de femtossegundos 150 fs (Chameleon – Coherent) com comprimento de onda centrado em 800 nm e taxa de repetição de 80 MHz. A potência foi controlada utilizando-se uma placa de meia onda ($\lambda/2$) e um polarizador glan Thompson (P). O tempo de exposição do laser foi controlado por um “*shutter*” (S). Um sistema de duas lentes L_1 e L_2 tipo telescópio foi utilizado para expandir o feixe e preencher a lente objetiva do microscópio além de ser utilizado para o alinhamento do plano da imagem com o plano focal do laser. O sistema de imagem foi composto por um microscópio óptico Nikon Eclipse TE-2000 e uma câmera CCD sensicam QE. O sistema de manipulação das células (pinça óptica) foi composto por um laser CW IPG Photonics com comprimento de onda de 1064 nm. Um sistema de lentes L_3 e L_4 também foi utilizado para preencher a objetiva e ajustar o plano focal do laser. Um espelho D_1 que reflete no comprimento de onda de 1064 nm e transmite 800 nm foi utilizado para permitir que os dois feixes percorram o mesmo caminho óptico. O espelho dicróico D_2 foi utilizado para refletir o infravermelho e transmitir o visível permitindo que a câmera capture as imagens formadas. Um sistema de varredura xyz foi construído utilizando-se motores de passo e a plataforma arduino para permitir a manipulação automatizada das células. O controle do shutter, sistema de varredura e captura e gravação de vídeos e imagens foram realizados utilizando-se a plataforma Labview.

Com o sistema, procedimentos preliminares de microcirurgias foram realizadas em células da mucosa bucal e hemácias. Marcadores fluorescentes que se ligam a membrana (Quantum Dots - QDs) foram utilizados para as imagens e medidas de fluorescência. Emissão fluorescente por absorção de dois fótons foi adquirido por uma fotomultiplicadora. Pretende-se que a avaliação da distribuição espacial da fluorescência indique a posição da membrana. Após determinação da posição da membrana celular e posicionamento do ponto focal do laser, o “*shutter*” é aberto por um tempo pré-definido para criação do poro transiente com o laser de femtossegundos. O arranjo experimental está ilustrado na Figura A.1.

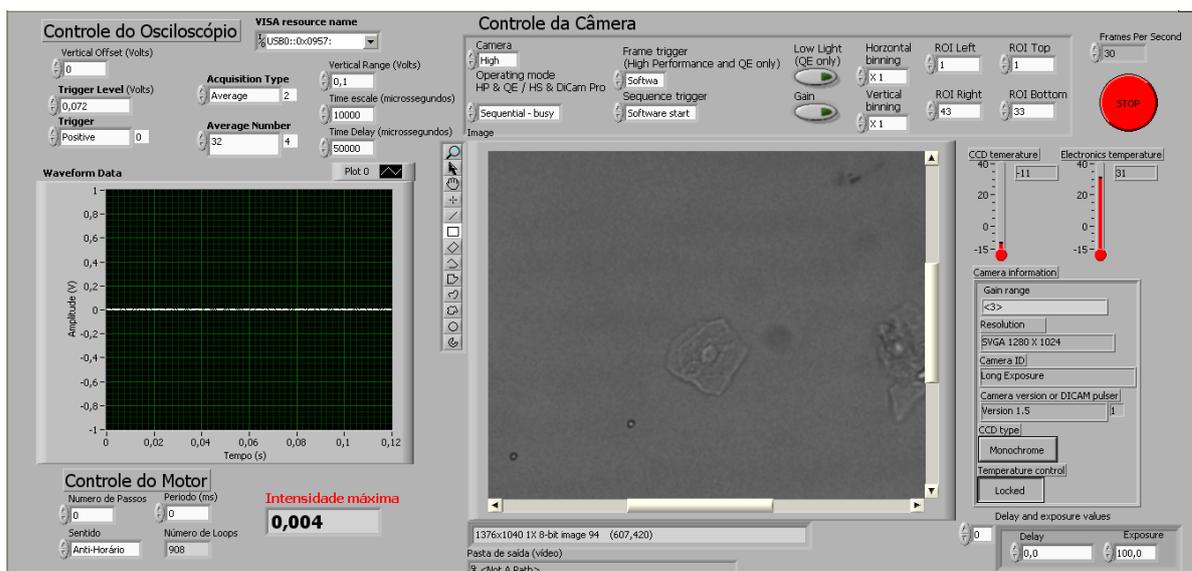
Figura A.1: Arranjo experimental do sistema de manipulação e microcirurgias de células.



Fonte: próprio autor.

Foi desenvolvido um programa em Labview para assistir o processo de microcirurgia. A Figura A.2 mostra o painel de controle do sistema de microcirurgia celular.

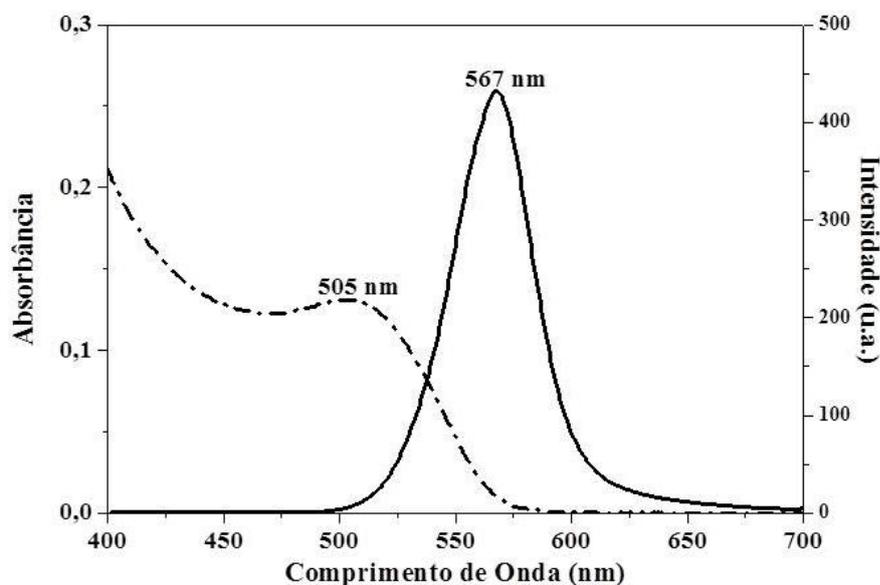
Figura A.2: Painel de controle do sistema de microcirurgia celular



Fonte: próprio autor.

A Figura A.3 mostra os espectros de absorção e emissão para os quantum dots estabilizados com cisteamina (CdTe-cisteamina).

Figura A.3: Espectros de absorção e emissão dos QDs estabilizados com cisteamina.

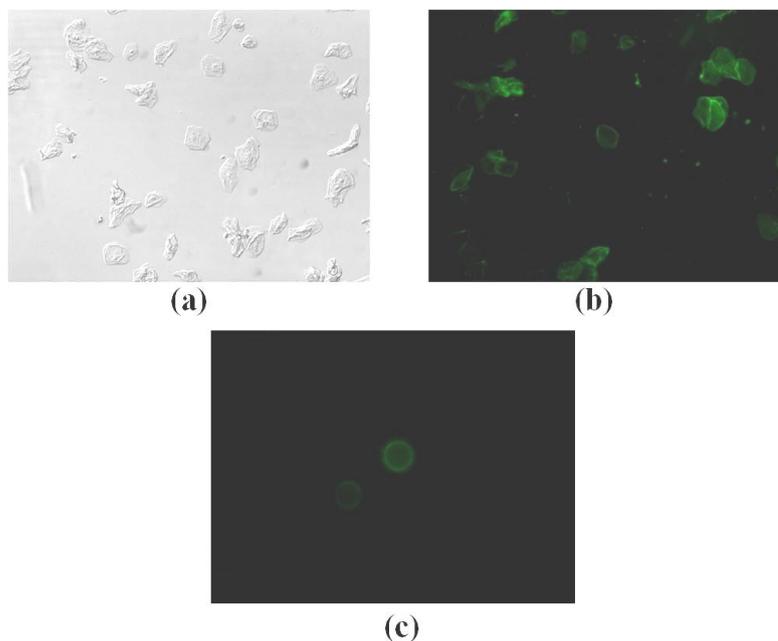


Fonte: próprio autor.

O espectro de absorção do conjugado CdTe-cisteamina apresenta um pico de absorção em 505 nm e um pico de emissão em 567 nm.

Os primeiros testes foram feitos com hemácias e células da mucosa bucal. A membrana das células foi marcada com CdTe-cisteamina. Nestes testes as células ficaram fixas no fundo da lamínula e não foram aprisionadas pela pinça óptica. A Figura A.4 mostra as imagens de microscopia das células.

Figura A.4: Imagens de microscopia de células da mucosa bucal observada com objetiva de 10x (a) pela técnica de DIC. (b) Marcada com CdTe-cisteamina e observada com objetiva de 10x por microscopia de fluorescência. (c) Imagem de hemácia marcada com CdTe-cisteamina e observada com objetiva de 100 x.

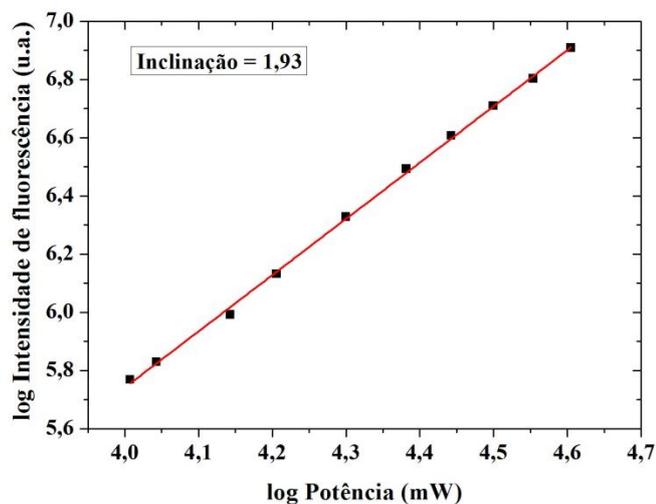


Fonte: próprio autor.

As imagens de fluorescência da Figura A.4 (b e c) foram feitas utilizando-se como fonte de excitação uma lâmpada incandescente na região azul do espectro eletromagnético. É possível perceber que apenas a membrana das células estão marcadas.

Também foi avaliado a emissão fluorescente das células excitadas com laser infravermelho. O gráfico da Figura A.5 mostra o gráfico do logaritmo da intensidade de fluorescência como função do logaritmo da potência incidente do laser.

Figura A.5: Intensidade de fluorescência em função da potência do laser.

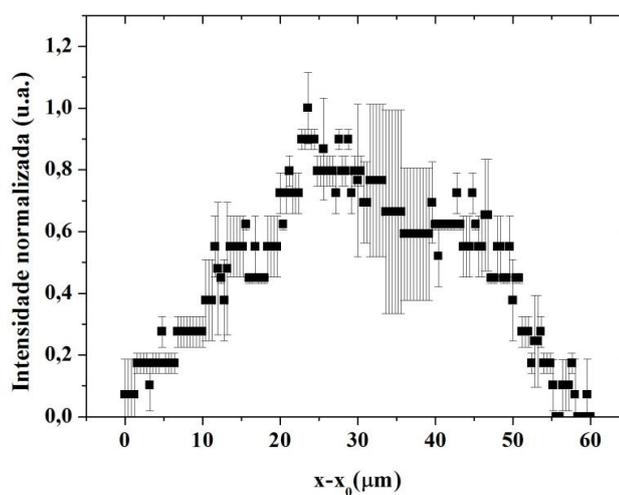


Fonte: próprio autor.

A inclinação da reta formada indica que o processo predominante é absorção de dois fótons, pois o valor da inclinação da reta é próximo de dois.

A Figura A.6 mostra o gráfico da intensidade de fluorescência em função do deslocamento do foco do microscópio para uma célula da mucosa bucal utilizando a lente objetiva de 100 x. A Figura A.6 indica a possibilidade de identificar a posição da membrana celular explorando a emissão fluorescente da célula.

Figura A.6: Intensidade de fluorescência em função do deslocamento do foco do microscópio em células da mucosa bucal marcadas com CdTe-cisteamina (objetiva de 100 x).



Fonte: próprio autor.

O gráfico da Figura A.6 foi obtido a partir de três pontos distintos da célula utilizando uma potência do laser de aproximadamente 7 mW. A posição da objetiva onde o valor da intensidade de fluorescência é máximo é atribuída à posição aproximada da membrana da célula.

A identificação da posição da membrana pode induzir uma maior eficiência no processo de fotoporação. Para se estabelecer a fotoporação é necessário o aumento da potência do laser de femtossegundos.

Para conclusão deste trabalho faz-se necessário avaliar o processo de fotoporação em função de diferentes parâmetros do laser (potência e tempo de exposição). A comprovação da geração de poros pode ser realizada um marcador fluorescente não permeável à membrana da célula. A presença deste marcador no interior da célula indica a criação do poro. Esta etapa do trabalho não foi concluída em virtude de um problema técnico no laser utilizado para realizar a fotoporação.

B. Publicações e participações em eventos

1- Artigo publicado em periódicos científico

MOURA, D. S. ; SILVA, DIEGO C. N. ; WILLIAMS, AJOKE J. ; BEZERRA, MARCOS A. C. ; FONTES, ADRIANA ; DE ARAUJO, RENATO E. Automatic real time evaluation of red blood cell elasticity by optical tweezers. Review of Scientific Instruments, v. 86, p. 053702, 2015.

2- Artigos submetido em periódico científico

DE OLIVEIRA, M.A.S.; MOURA, D.S.; FONTES, A., DE ARAUJO, R. E. Damages induced in red blood cells by infrared optical trapping: an evaluation based on elasticity measurements. Journal of Biomedical Optics, 2016.

3- Trabalhos publicados e apresentados em eventos científicos

MOURA, D. S. ; SILVA, DIEGO C. N. ; WILLIAMS, AJOKE J. ; BEZERRA, MARCOS A. C. ; FONTES, ADRIANA ; DE ARAUJO, RENATO E. Exploring automatic optical tweezers system on the evaluation of erythrocytes elasticity. SPIE Biophotonics South America, 2015.

MOURA, D. S. ; FALCAO FILHO, E. L. ; DE ARAUJO, R. E. AVALIAÇÃO DO USO DE lasers DE FEMTOSSEGUNDOS NO CORTE DE BOLSAS DE SANGUE. In: XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica CBEB, 2014.

MOURA, D. S. ; SILVA, D. C. N. ; FONTES, A. ; WILLIAMS, A. J. ; BEZERRA, M. A. C. DE ARAUJO, R. E. SISTEMA PARA AVALIAÇÃO AUTOMÁTICA DA ELASTICIDADE DE HEMÁCIAS. In: XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica CBEB, 2014.

MOURA, D. S. ; FALCAO FILHO, E. L. ; DE ARAUJO, R. E. . Ablação de bolsas de sangue usando laser de femtossegundos. In: XIV Escola de Verão Jorge André Swieca de Ótica Quântica e Ótica Não Linear, 2014.

MOURA, D. S. ; FALCAO FILHO, E. L. ; DE ARAUJO, R. E. . Estudo dos parâmetros da ablação de PVC flexível usando laser de femtossegundos. In: 9º Simpósio de Lasers e Suas Aplicações, 2014.