

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



**TESE DE DOUTORADO**

**Sistema de Microespectroscopia Raman com Pinça Óptica  
para Avaliação *In Vitro* de Danos em Células**

**Marcos André Soares de Oliveira**

**MARCOS ANDRÉ SOARES DE OLIVEIRA**

**SISTEMA DE MICROESPECTROSCOPIA RAMAN COM PINÇA ÓPTICA  
PARA AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE DANOS EM CÉLULAS**

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. DSc. Renato E. de Araujo

**RECIFE/2014**

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

O48s Oliveira, Marcos André Soares de.  
Sistema de microespectroscopia raman com pinça óptica para avaliação *in vitro* de danos em células. / Marcos André Soares de Oliveira. - Recife: O Autor, 2014.  
97 folhas, il., gráfs., tabs.

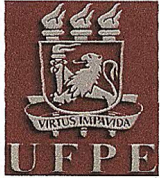
Orientador: Prof. Dr. Renato Evangelista de Araújo.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, 2014.  
Inclui Referências e Apêndices.

1. Engenharia Elétrica. 2. Fotônica. 3. Microespectroscopia Raman. 4. Pinça óptica. 5. Hemácias. I. Araújo, Renato Evangelista. (Orientador).  
II. Título.

UFPE

621.3 CDD (22. ed.)

BCTG/2015-25



Universidade Federal de Pernambuco  
*Pós-Graduação em Engenharia Elétrica*

**PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DE DEFESA DE  
TESE DE DOUTORADO**

**MARCOS ANDRÉ SOARES DE OLIVEIRA**

TÍTULO

**“SISTEMA DE MICROESPECTROSCOPIA RAMAN COM PINÇA ÓPTICA  
PARA AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE DANOS EM CÉLULAS”**

A comissão examinadora composta pelos professores: RENATO EVANGELISTA DE ARAUJO, DES/UFPE; JOAQUIM FERREIRA MARTINS FILHO, DES/UFPE; MARCO AURÉLIO BENEDETTI RODRIGUES, DES/UFPE; ADRIANA FONTES, DBR/UFPE e AIRTON ABRAHAO MARTIN, DEE/UNIVAP sob a presidência do primeiro, consideram o candidato **MARCOS ANDRÉ SOARES DE OLIVEIRA APROVADO.**

Recife, 04 de dezembro de 2014.

---

**CECILIO JOSÉ LINS PIMENTEL**  
Coordenador do PPGE

---

**RENATO EVANGELISTA DE ARAUJO**  
Orientador e Membro Titular Interno

---

**ADRIANA FONTES**  
Membro Titular Externo

---

**JOAQUIM FERREIRA MARTINS FILHO**  
Membro Titular Interno

---

**AIRTON ABRAHAO MARTIN**  
Membro Titular Externo

---

**MARCO AURÉLIO BENEDETTI  
RODRIGUES**  
Membro Titular Interno

*Dedico esta tese aos meus Pais, Antônio Pereira e Maria Sueli, pelo amor incondicional e por serem minha referência de vida.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos às muitas pessoas que contribuíram direta e indiretamente, cientificamente ou não, para que a realização deste trabalho tenha se tornado possível:

À minha família, por sempre estar ao meu lado. Sem vocês minha vida não tem sentido e a realização desta tese não seria possível. Em especial à minha filha, Ana Sofia, pois seu nascimento no decorrer desta empreitada me cobriu de novas responsabilidades, mas também me deu mais motivação para vencer na vida.

Ao Prof. Renato Evangelista, pela orientação científica e pela amizade. Obrigado pela experiência transmitida durante esses anos.

Ao Prof. Sebastian Wachsmann-Hogiu e a todos que fazem parte do Center for Biophotonics Science and Technology na University of California Davis. Obrigado pela receptividade e pelos conhecimentos científicos.

A todos que fazem parte do Laboratório de Óptica Biomédica e Imagens na UFPE, em especial à Prof.(a) Adriana Fontes, pelos conhecimentos compartilhados.

A todos que fazem parte do PPGEE, principalmente aos professores que contribuíram com a minha formação acadêmica.

Ao CNPq e à FACEPE pelo apoio financeiro.

Resumo da Tese apresentada à UFPE como parte dos requisitos necessários  
para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Elétrica.

## **SISTEMA DE MICROESPECTROSCOPIA RAMAN COM PINÇA ÓPTICA PARA AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE DANOS EM CÉLULAS**

**Marcos André Soares de Oliveira**

Dezembro/2014

Orientador: Prof. Dr. Renato Evangelista de Araujo.

Área de Concentração: Fotônica.

Palavras-chave: Microespectroscopia Raman. Pinça óptica. Hemácias

Número de Páginas: 96.

O presente trabalho aborda o desenvolvimento e a implementação de um sistema de microespectroscopia Raman, que permite a avaliação de células ou compostos com dimensões da ordem de micrômetros, associado a uma pinça óptica para imobilizar e estudar o efeito causado pela incidência de radiação laser. Cada espécie química fornece um espectro que é como sua impressão digital. A espectroscopia Raman é uma técnica fotônica de alta resolução que permite sua identificação inequívoca, ou o acompanhamento de processos químicos decorrentes de sua interação com a luz, por exemplo. Como aplicação do sistema de microespectroscopia Raman com pinça óptica, monitoramos com alta precisão o espectro Raman de hemácias individuais. As bandas Raman observadas são provenientes da hemoglobina intracelular, que ocupam aproximadamente 98% do proteoma citoplasmático das hemácias. A dinâmica dos espectros Raman mostraram significantes e irreversíveis mudanças das células em função do tempo de aprisionamento. Atribui-se as mudanças espectrais à combinação de danos bioquímicos na hemoglobina, causados pelo laser. As evoluções temporais das intensidades e dos deslocamentos dos picos Raman foram monitoradas por períodos de 40 minutos, indicando mudanças fotoquímicas na hemoglobina e processos de difusão.

Abstract of Thesis presented to UFPE as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Electrical Engineering.

## **MICRORAMAN SPECTROSCOPY SYSTEM WITH OPTICAL TWEEZERS FOR *IN VITRO* EVALUATION OF DAMAGE IN CELLS**

**Marcos André Soares de Oliveira**

December /2014

Supervisor(s): Renato Evangelista de Araujo, Prof. Dr..

Area of Concentration: Photonics.

Keywords: MicroRaman spectroscopy. Optical tweezers. Red blood cells

Number of Pages: 96.

The present work describes the development and implementation of a microRaman spectroscopy system, which allows the assessment of cells or compounds having dimensions of the order of micrometers, associated with optical tweezers to immobilize and study the effect caused by the incidence of laser radiation. Each chemical species provides a spectrum that is like your fingerprint. Raman spectroscopy is a photonic technique of high-resolution allowing their unambiguous identification, or monitoring of chemical processes resulting, for example, from their interaction with light. As an application of microRaman spectroscopy system with optical tweezers, we monitor with high precision Raman spectra of individual red blood cells. The Raman bands are observed from the intracellular hemoglobin, which occupy approximately 98% of the cytoplasmic proteome of red blood cells. The dynamics of Raman spectra showed significant and irreversible changes of cells as a function of time trapping. Spectral changes are attributed to the combination of biochemicals damage in the hemoglobin, caused by the laser. The temporal evolutions of the intensities and displacements of the Raman peaks were monitored for periods of 40 minutes, indicating photochemical changes in hemoglobin and diffusion processes.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> – Diagrama das transições entre níveis de energia vibracionais do estado eletrônico fundamental de uma molécula por um processo envolvendo um fóton e um fônon para os espalhamentos: Rayleigh; Raman Stokes; e Raman anti-Stokes.....	20
<b>Figura 2.2</b> – Ilustração das frequências espalhadas: espalhamento Rayleigh (elástico), Raman Stokes e anti-Stokes (inelásticos).....	21
<b>Figura 2.3</b> – Típico espectro Raman.....	26
<b>Figura 2.4</b> – Conservação do momento linear para o espalhamento Raman (a) Stokes e (b) anti-Stokes.....	27
<b>Figura 2.5</b> – Diagrama de Feynman ilustrando uma transição Raman de primeira ordem com um fônon sendo criado.....	28
<b>Figura 2.6</b> – Espectros Raman, de uma biópsia de mama humana normal, obtidos com lasers de diversos comprimentos de onda entre 406 e 830 nm.....	31
<b>Figura 2.7</b> – Diagrama esquemático de um tubo fotomultiplicador típico.....	33
<b>Figura 2.8</b> – Responsividade espectral de alguns fotocátodos.....	34
<b>Figura 2.9</b> – Configurações mais comuns dos CCDs utilizados em espectroscopia Raman: (a) iluminada frontalmente; e (b) retroiluminada.....	36
<b>Figura 2.10</b> – Eficiência quântica típica de sensores CCDs usualmente utilizados em espectroscopia Raman: F.I. (azul); e B.I. (vermelha) onde podem ocorrer o efeito de “ <i>etaloning</i> ” na região do NIR.....	37
<b>Figura 2.11</b> – Configurações fundamentais de espectrômetros (a) dispersivos e (b) interferométricos.....	38
<b>Figura 2.12</b> – Esquemas de (a) uma grade difração refletora e (b) um espectrômetro dispersivo com um estágio.....	39
<b>Figura 2.13</b> – Esquema de um espectrômetro FT-Raman baseado no interferômetro de Michelson.....	41
<b>Figura 2.14</b> – Geometrias de detecção usualmente utilizadas em espectroscopia Raman: (a) detecção perpendicular à direção de excitação do laser, 90°; (b) detecção paralela à direção de excitação do laser, 180°.....	42
<b>Figura 2.15</b> – Sistema básico de microespectroscopia Raman.....	43
<b>Figura 2.16</b> – Ilustração do esquema de restrição espacial da luz na microespectroscopia confocal.....	43

<b>Figura 2.17</b> – Espectro Raman do poliestireno.....	44
<b>Figura 3.1</b> – Espalhamento, no regime da óptica geométrica, entre um fóton e uma partícula espalhadora, no caso em que o índice de refração da partícula, $n_1$ , é maior que o índice de refração do meio, $n_2$ .....	46
<b>Figura 3.2</b> – Trajetórias de dois raios simétricos, de mesmas intensidades, que se encontrariam com o eixo z na posição $z_0$ se não sofressem desvio devido à partícula, com $z_0$ (a) abaixo e (b) acima do centro da partícula.....	47
<b>Figura 3.3</b> – Direção da força resultante, sobre uma partícula no regime da óptica geométrica, gerada por um feixe altamente focalizado, que se encontrariam com o eixo z na posição $z_0$ , se não sofressem desvio devido à partícula, para $z_0$ (a) abaixo e (b) acima do centro da partícula.....	48
<b>Figura 3.4</b> – Trajetórias de dois raios antissimétricos à esquerda, e de intensidades diferentes, que se encontrariam com o eixo z na posição $z_0$ se não sofressem desvio devido à partícula, com $z_0$ (a) abaixo e (b) acima do centro da partícula.....	48
<b>Figura 3.5</b> – Efeito da reflexão na força óptica.....	49
<b>Figura 3.6</b> – Esquema do microscópio invertido.....	51
<b>Figura 3.7</b> – (a) Relação ente a abertura numérica e a distância de trabalho. (b) Relação entre abertura numérica efetiva comparada ao diâmetro do feixe.....	52
<b>Figura 3.8</b> – Esquema de um telescópio. $L_1$ e $L_2$ são lentes convergentes de distâncias focais $f_1$ e $f_2$ , respectivamente.....	53
<b>Figura 3.9</b> – Hemácia aprisionada pela pinça óptica.....	54
<b>Figura 4.1</b> – Hemácias de ser humano.....	56
<b>Figura 4.2</b> – Grupo heme da hemoglobina, a ferroprotoporfirina IX.....	57
<b>Figura 4.3</b> – Estrutura da hemoglobina A, representada como $\alpha_2\beta_2$ .....	58
<b>Figura 4.4</b> – Sistema experimental de microespectroscopia Raman com pinça óptica.....	59
<b>Figura 4.5</b> – Espectros Raman em série de uma hemácia aprisionada por um laser de 10 mW de potência. Os espectros mostram variações tanto nas intensidades quanto nas posições dos picos ao longo do tempo.....	62
<b>Figura 4.6</b> – Molécula de Porfina.....	63
<b>Figura 4.7</b> – Espectro Raman de uma hemácia, aprisionada por um laser de 10 mW de potência, com a identificação dos principais picos envolvidos no estudo.....	63

<b>Figura 4.8</b> – Deslocamento Raman do picos do grupo I. Os pontos são os dados experimentais obtidos para a potência do laser de 10 mW e as linhas sólidas são ajustes exponenciais $\propto \exp(-t/\tau_0)$ .....	65
<b>Figura 4.9</b> – Deslocamento Raman do picos do grupo II. Os pontos são os dados experimentais obtidos para a potência do laser de 10 mW e as linhas sólidas são ajustes exponenciais $\propto \exp(-t/\tau_0)$ .....	65
<b>Figura 4.10</b> – Comportamento do Deslocamento Raman do pico 753 cm <sup>-1</sup> . Os pontos são os dados experimentais obtidos em diferentes potências do laser e as linhas sólidas são ajustes exponenciais $\propto \exp(-t/\tau_0)$ .....	66
<b>Figura 4.11</b> – Dinâmica temporal do pico 753 cm <sup>-1</sup> utilizando 10 mW de potência do laser, das hemácias de 2 diferentes voluntários. Os pontos são os dados experimentais e as linhas sólidas são ajustes exponenciais $\propto \exp(-t/\tau_0)$ .....	67
<b>Figura 4.12</b> – Dinâmica da posição do pico 753 cm <sup>-1</sup> para diferentes potências do laser. Os pontos são dados fornecidos pela Tabela 4.3 e a linha sólida é o ajuste obtido da curva $y(x) = C \exp(-t/\tau) + c_0$ .....	68
<b>Figura 4.13</b> – Variação na intensidade do pico 1451 cm <sup>-1</sup> para diferentes potências do laser.....	69
<b>Figura 4.14</b> – Dinâmica do aumento da intensidade, representada por $\tau_s$ , do pico 1451 cm <sup>-1</sup> , para diferentes potências do laser. Os pontos são dados fornecidos pela Tabela 4.4 e a linha sólida é o ajuste obtido da curva $y(x) = C \exp(-t/\tau) + c_0$ .....	70
<b>Figura 4.15</b> – Variação na intensidade do pico 1544 cm <sup>-1</sup> para diferentes potências do laser.....	71
<b>Figura 4.16</b> – Evoluções temporais da posição e da intensidade do pico 673 cm <sup>-1</sup> . Os pontos são os dados experimentais obtidos para a potência do laser de 10 mW e as linhas sólidas são ajustes exponenciais da Eq. (4.2).....	72
<b>Figura 4.17</b> – Evoluções temporais da posição e da intensidade do pico 1451 cm <sup>-1</sup> Os pontos são os dados experimentais obtidos para a potência do laser de 10 mW e as linhas sólidas são ajustes exponenciais da Eq. (4.2) .....	73
<b>Figura 4.18</b> – Deslocamento do pico Raman em 753 cm <sup>-1</sup> . Experimento contínuo (vermelho) e com interrupção (escala de cinza).....	74
<b>Figura 5.1</b> – Sistema para microespectroscopia Raman desenvolvido na UFPE.....	78
<b>Figura A.1</b> – Curva polinomial de calibração do espectrômetro, utilizando os picos Raman do poliestireno: 620,9 ; 795,8 ; 1001,4 ; 1031,8 ; 1155,3 ; 1450,5 ; e 1602,3 cm <sup>-1</sup> .....	91
<b>Figura A.2</b> – Diagrama de operação do algoritmo de caracterização de curvas espectrais....	93

**Figura A.3** – Processamento dos dados experimentais (pontos), na região espectral entre 910 e 1025  $\text{cm}^{-1}$ . A banda é ajustada por uma exponencial tripla (linha vermelha). As curvas representadas pelas linhas em verde são os ajustes de cada um dos três picos gaussianos, que compõem a banda.....94

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> – Comparação entre algumas características dos métodos Raman dispersivo e FT-Raman.....	38
<b>Tabela 4.1</b> – Procedimento de aquisição dos espectros Raman em série no estudo da dependência do dano fotoquímico em função da potência do laser.....	61
<b>Tabela 4.2</b> – Atribuições das coordenadas locais dos picos Raman estudados da hemoglobina.....	64
<b>Tabela 4.3</b> – Deslocamento dos picos Raman (em segundos) em função da potência do laser para os picos 673, 753, 1002 e 1451 $\text{cm}^{-1}$ . Os erros indicam o desvio padrão sob as 10 medidas.....	66
<b>Tabela 4.4</b> – Tempos característicos de subida e de descida dos picos Raman (em segundos) em função da potência do laser para os picos 673 e 1451 $\text{cm}^{-1}$ . Os erros indicam o desvio padrão sob as 10 medidas.....	70
<b>Tabela A.1</b> – Região espectral estudada. Localização aproximada dos picos das bandas Raman das hemácias.....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR – Antirrefletor

B. I. – Back Illuminated (Retroiluminada)

CCD – Coupled Charge Device (Dispositivo de Carga Acoplada)

CW – Continuous Wave (Onda contínua)

DPBS – Dulbecco Phosphate-Buffered Salina (Solução Tampão)

EDTA – Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)

F. I. – Front Illuminated (Iluminado Frontalmente)

FT – Fourier Transformer (Transformada de Fourier)

Hb – Hemoglobina

IR – Infrared (Infravermelho)

LADS – Localization Analysis of Dynamic Spectra (Técnica de Ajuste de Dinâmicas Espectrais)

N.A. – Numerical Aperture (Abertura Numérica)

NIR – Near Infrared (Infravermelho próximo)

PMT – Photomultiplier Tube (Fotomultiplicadora)

RBC – Red Blood Cell (Hemácia)

RR – Raman Ressonante

SERS – Surface Enhanced Raman Scattering (Espalhamento Raman Aumentado por Efeito de Superfície)

SNR – Signal-Noise Ratio (Relação Sinal-Ruído)

TPDT – Teoria da Perturbação Dependente do Tempo

*u.a.* – Unidades Arbitrárias

UV – Ultravioleta

W.D. – Work Distance (Distância de Trabalho).

ZB – Zona de Brillouin

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>ESPECTROSCOPIA RAMAN</b> .....	18
<b>2.1</b>	<b>Introdução</b> .....	18
<b>2.2</b>	<b>O Efeito Raman</b> .....	19
2.2.1	Concepção Clássica.....	22
2.2.2	Concepção Quântica.....	26
<b>2.3</b>	<b>Instrumentação</b> .....	29
2.3.1	Fontes de Excitação.....	30
2.3.2	Dispositivos de Detecção.....	32
2.3.3	Espectrômetros.....	37
<b>2.4</b>	<b>Microespectroscopia Raman</b> .....	41
<b>3</b>	<b>PINÇA ÓPTICA</b> .....	45
<b>3.1</b>	<b>Introdução</b> .....	45
<b>3.2</b>	<b>Fundamentos da Pinça Óptica</b> .....	46
<b>3.3</b>	<b>Sistema Experimental</b> .....	50
3.3.1	O Alinhamento da Pinça Óptica.....	53
<b>4</b>	<b>APLICAÇÃO</b> .....	55
<b>4.1</b>	<b>Introdução</b> .....	55
<b>4.2</b>	<b>A Hemácia</b> .....	55
4.2.1	A Hemoglobina.....	57
<b>4.3</b>	<b>Sistema de Microespectroscopia Raman com Pinça Óptica</b> .....	59
4.3.1	Amostra contendo Hemácias.....	60
<b>4.4</b>	<b>Resultados e Discussão</b> .....	61
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS</b> .....	75
<b>5.1</b>	<b>Conclusões</b> .....	75
<b>5.2</b>	<b>Perspectivas</b> .....	77
<b>5.3</b>	<b>Trabalhos Futuros</b> .....	77
5.3.1	Hemoglobinopatias.....	79
5.3.2	Estocagem de Hemácias em Hemocentros.....	79
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	81
	<b>APÊNDICES</b> .....	90
	<b>APÊNDICE A – ALGORÍTMO DE CARACTERIZAÇÃO DE ESPECTROS RAMAN</b> .....	91
	<b>APÊNDICE B – PARTICIPAÇÃO EM ESCOLAS E CONGRESSOS</b> .....	95
	<b>APÊNDICE C – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	96

## 1 INTRODUÇÃO

Praticamente toda luz que percebemos chega aos nossos olhos indiretamente, através do processo de espalhamento. O azul do céu, a coloração branca das nuvens e o arco-íris, por exemplo, são exemplos de fenômenos gerados por espalhamento de radiação eletromagnética, em particular da região espectral visível. No capítulo 2 desta tese, será discutido o espalhamento de radiação eletromagnética monocromática, dando ênfase ao espalhamento Raman, que é o principal fenômeno de estudo desta tese, e também aos principais componentes instrumentais utilizados na espectroscopia Raman. O aumento no número de aplicações de espectroscopia Raman, em problemas analíticos, intensificou-se após 1986 com a evolução na instrumentação, principalmente com a introdução de dispositivos de carga acoplada (CCDs), lasers de diodo, e óptica holográfica. Estes avanços resultaram em uma ramificação bastante extensa de possíveis configurações de sistemas Raman, geralmente destinadas a diferentes aplicações, viabilizando estudos de diversos tipos de materiais. A microespectroscopia Raman é uma destas possíveis configurações. Ela é obtida através da restrição espacial na iluminação da amostra, alcançada pela objetiva de um microscópio óptico convencional combinado a um espectrômetro, e que permite o estudo de áreas microscópicas. O número de aplicações da espectroscopia Raman é muito grande e pode ser encontrada em praticamente todas as áreas de pesquisa [1]. A espectroscopia Raman tem sido muito utilizada na indústria farmacêutica, como por exemplo, na determinação do conteúdo de cápsulas [2], no controle de qualidade de medicamentos [3]. Nas artes e patrimônios, através da identificação de pigmentos, para verificação de autenticidade de obras de arte [2-6], fornecendo inclusive critérios de conservação e restauração. Em mineralogia e geologia, na identificação e caracterização de solos e minerais [7] e na genuinidade de pedras preciosas [8]. Na medicina, pela identificação de células com câncer [9], e na odontologia para diagnóstico não invasivo de tecidos dentários [10]. Em pesquisas forenses, como por exemplo, a identificação de narcóticos ilegais [11] e materiais explosivos [12].

No capítulo 3 serão abordados os fundamentos da pinça óptica e como sua associação à microespectroscopia Raman torna-se-á uma ferramenta muito poderosa para o estudo das células individuais tratadas nesta tese. Serão discutidos seus principais elementos e procedimentos de alinhamento. A pinça óptica é um instrumento capaz de aprisionar e mover partículas da ordem de até dezenas de micrômetros. Consiste basicamente de um laser focalizado que incide sobre um objeto com índice de refração maior que o meio ao seu redor. Surgiu em 1986, inicialmente proposta por A. Ashkin, baseada na transferência de momento



de fótons para capturar partículas dielétricas [13], mas foi rapidamente utilizada em aplicações biológicas [14] e desde então é a sua principal área de aplicação.

Alguns estudos anteriores mostraram que a captura óptica causa danos às hemácias devido a presença da hemoglobina, que apresenta forte absorção na região espectral dos lasers usualmente utilizados [15-19]. As hemácias cujas funções são essenciais na manutenção da vida de vários seres vivos, incluindo os seres humanos, quando alteradas podem causar sérios danos a estes organismos. A espectroscopia Raman, além de permitir a identificação de alterações composicionais também permite a identificação de alterações estruturais. Ainda não existe um consenso a cerca dos reais danos causados às hemácias pela exposição à radiação laser, utilizada para aprisioná-las. Estes danos podem conduzir ao processo de apoptose, ou afetar a capacidade da célula desempenhar suas funções normais [20, 21]. No espectro Raman de hemácias, a assinatura da hemoglobina prevalece sobre todas as outras proteínas. Em particular, dois trabalhos exploram espectroscopia Raman na avaliação da degradação de hemácias submetidas ao aprisionamento óptico [16, 17]. Wood *et al* atribuem as mudanças do espectro Raman de hemácias aprisionadas à formação de methemoglobina e interações excitônicas induzidas pela agregação de heme [16], enquanto Dasgupta *et al* atribuem as alterações à formação de hemichrome [17]. Esses estudos avaliam espectros Raman de hemácias aprisionadas, limitando-se ao comportamento temporal da intensidade de picos Raman [17, 22], o que não permite um entendimento mais abrangente da dinâmica dos processos químicos subjacentes que dão origem a alterações reversíveis e/ou irreversíveis nas células.

O uso de lasers na região do infravermelho próximo (NIR) tem sido explorado por reduzir estas alterações, mas o fato é que eles não as extinguem completamente. Desta forma, os objetivos deste trabalho focam em desenvolver um sistema de microespectroscopia Raman que seja capaz de identificar e caracterizar os danos, em hemácias, decorrentes da incidência da radiação laser em uma única célula. No capítulo 4 serão apresentados os principais resultados decorrentes dos estudos realizados, e caracterizadas as dinâmicas destas alterações, que puderam ser observadas em detalhes, através do monitoramento das alterações bioquímicas na hemoglobina. Os estudos da reversibilidade do dano fotoquímico e sua dependência com a potência da radiação incidente também serão apresentados.

O sistema de microespectroscopia Raman com pinça óptica, desenvolvido nesta tese, mostrou ser uma ferramenta eficiente. No capítulo 5 serão listadas as principais conclusões alcançadas ao longo do desenvolvimento dos estudos realizados, além de mais outras duas propostas de trabalhos futuros que envolvem a identificação de danos em hemácias,

provenientes de defeitos congênitos e de defeitos adquiridos ao longo do processo de estocagem em hemocentros.

## 2 ESPECTROSCOPIA RAMAN

### 2.1 INTRODUÇÃO

Os primeiros relatos sobre espalhamento de luz ocorreram em 1868, quando Tyndall observou que a luz branca espalhada por partículas muito pequenas se tornava parcialmente polarizada e azulada quando observada a  $90^\circ$  da direção da luz incidente. Isto o levou a concluir que a cor azulada do céu deveria ser devido a um espalhamento da luz do sol na atmosfera. Apenas em 1899, Lord Rayleigh confirmou a ideia mostrando que a intensidade da luz espalhada por partículas dielétricas muito menores que o comprimento de onda da luz incidente é inversamente proporcional à quarta potência do comprimento de onda, o que ficou conhecido como lei de Rayleigh [23]. Neste processo de espalhamento a luz difusa tem o mesmo comprimento de onda da luz incidente, ou seja, a energia dos fótons espalhados é a mesma que a dos fótons incidentes. Nenhuma energia é criada ou aniquilada durante esse processo.

As propriedades de espalhamento de uma pequena partícula, como por exemplo uma esfera dielétrica, são complexas. O campo eletromagnético aplicado induz na partícula uma polarização elétrica. Essa polarização gera um novo campo eletromagnético dentro e ao redor da partícula. Esse novo campo eletromagnético total influencia novamente na polarização da partícula. Consequentemente, o campo eletromagnético total espalhado pela partícula é o resultado de um processo recursivo complexo.

O padrão de espalhamento depende de algumas características das partículas que constituem o meio no qual a radiação se propaga, uma dessas características é a razão entre o tamanho da partícula espalhadora e o comprimento de onda da radiação incidente. O processo de espalhamento tratado nesta tese é regido pela teoria de espalhamento de Mie, aquele no qual a radiação é espalhada por partículas cujos tamanhos são maiores que o comprimento de onda da radiação eletromagnética incidente. Além disso, a luz monocromática incidente na partícula é espalhada inelasticamente. Neste caso, a luz difusa é composta por frequências diferentes da frequência da luz incidente, ou seja, a energia dos fótons espalhados é diferente da dos fótons incidentes. Indicando que alguma energia foi criada ou aniquilada pelo meio espalhador durante o processo. Essa energia é associada aos fônons. Os fônons são quase-partículas que designam um *quantum* de energia das vibrações de um material que está sujeito a uma determinada temperatura. Aproximadamente apenas um em cada  $10^7$  fótons incidentes é espalhado inelasticamente [24]. Quando esse processo de espalhamento inelástico entre o material e a luz incidente envolve fônons acústicos, o efeito é chamado de espalhamento de

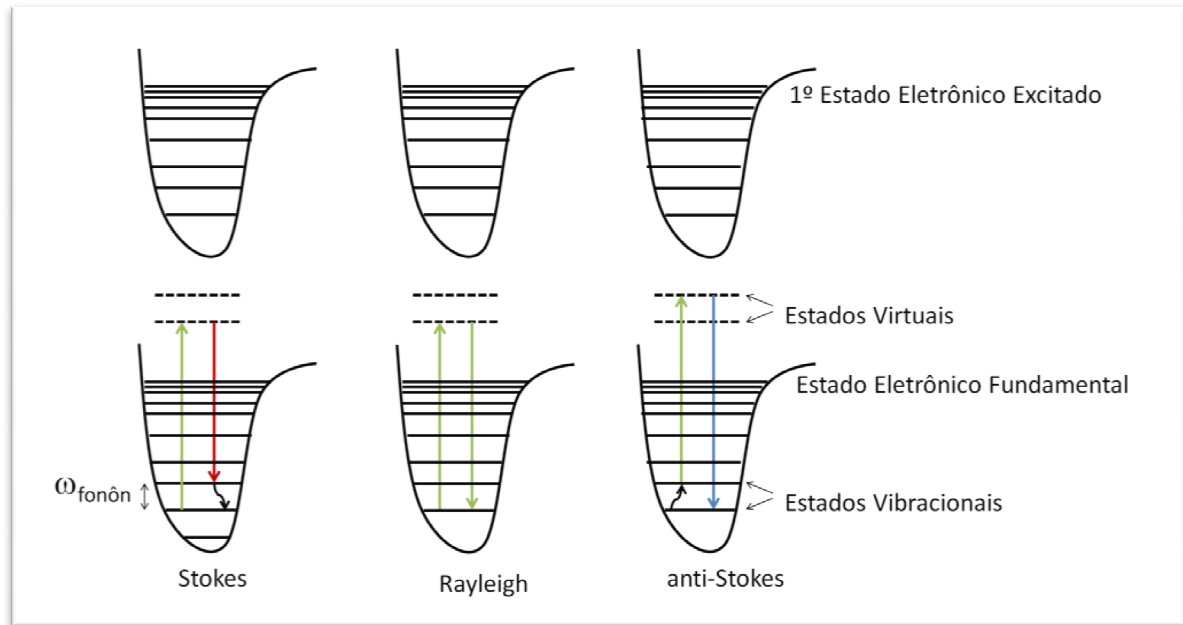
Brillouin [25]. Nesta tese, o processo de espalhamento inelástico envolve fônons ópticos e este fenômeno recebe o nome de espalhamento Raman [26]. A espectroscopia Raman é uma técnica não destrutiva, baseada no espalhamento inelástico de radiação eletromagnética, que fornece informações da estrutura atômica do material (sólido líquido ou gás). Para isso, usa-se uma fonte monocromática de luz, que ao atingir o objeto, é espalhada por ele, gerando luz de energia diferente da incidente.

## 2.2 O EFEITO RAMAN

O espalhamento de luz monocromática com mudança na frequência foi previsto teoricamente, por A. Smekal em 1923 [27], utilizando uma abordagem quântica. Porém, somente em 1928 o indiano C. V. Raman, observou que quando um feixe de luz monocromático com uma frequência  $\omega$  incide em um material, a luz espalhada era composta não apenas por radiação com a mesma frequência, mas ainda por uma série de outras linhas muito menos intensas com frequências maiores e menores que a frequência da luz incidente.

Inicialmente, C. V. Raman utilizou a luz solar como fonte de radiação, fazendo uso de uma rede de difração para a obtenção de um feixe monocromático, e posteriormente uma lâmpada de mercúrio como fonte monocromática e então foi possível estudar o espectro do tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) líquido [28]. O trabalho de 1928, sobre este estudo e sua explicação deu a C. V. Raman o prêmio Nobel em Física de 1930. Devido à dificuldade de se obter uma fonte monocromática intensa e de boa qualidade naquela época, os estudos se concentraram em materiais que apresentavam sinais Raman intensos, como por exemplo, estruturas de carbono. Por isso, somente após 1960, com o surgimento do laser, ocorreu um enorme crescimento nos estudos de espalhamento de luz e a espectroscopia Raman consolidou-se como uma técnica de grande aplicabilidade.

O efeito Raman, que é baseado no espalhamento inelástico, origina luz com uma frequência inferior ou superior à radiação incidente, dependendo se há criação (efeito Stokes) ou aniquilação (efeito anti-Stokes) de fônons ópticos no material, como representado na Figura 2.1.



**Figura 2.1** Diagrama das transições entre níveis de energia vibracionais do estado eletrônico fundamental de uma molécula por um processo envolvendo um fóton e um fônon para os espalhamentos: Rayleigh; Raman Stokes; e Raman anti-Stokes. Fonte: Arquivo do Autor

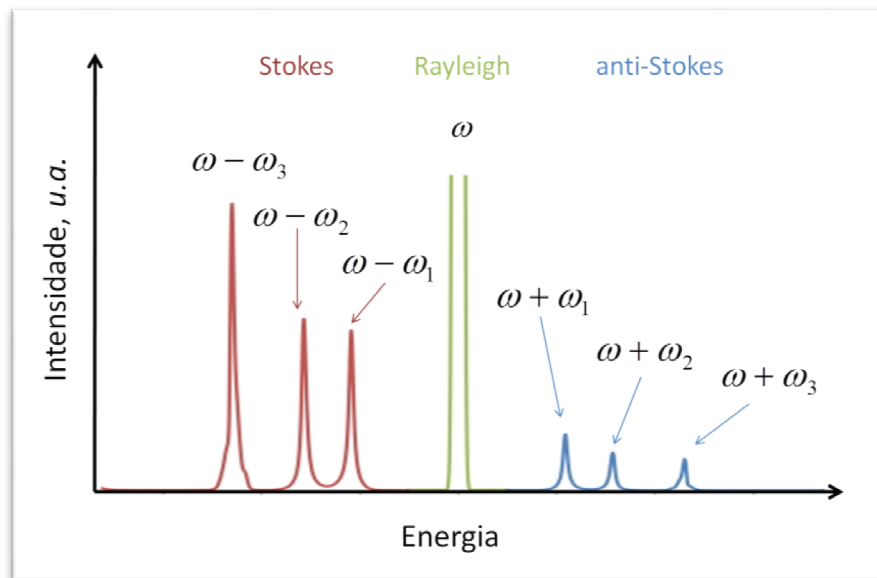
É importante notar que o fóton incidente e o fóton espalhado não devem ser considerados separadamente, pois o espalhamento não pode ser considerado como um processo sequencial de absorção e emissão, que é o caso da fluorescência. A escala de tempo envolvida no espalhamento Raman é da ordem de femtosegundos, e isso implica que, pela relação da incerteza,  $\Delta E \cdot \Delta t = \hbar$ , a energia do estado virtual não precisa satisfazer o princípio de conservação de energia. Esse estado recebe o nome exatamente por essa razão, ou seja, não corresponde a nenhum dos estados energéticos da molécula, na verdade o estado virtual é um autoestado do sistema molécula + radiação.

As localizações dos picos Stokes e anti-Stokes formam um padrão simétrico em torno da frequência do laser,  $\omega$ , como mostrado na Figura 2.2, pois correspondem à mesma diferença de energia, como mostrado na Figura 2.1. Cada pico Stokes tem um pico anti-Stokes associado, e suas intensidades são usualmente diferentes. Elas dependem das populações dos estados iniciais do material, que por sua vez dependem da temperatura. No equilíbrio termodinâmico, o estado superior será menos povoado que o estado mais baixo. Portanto, a taxa de transição do estado mais baixo para o superior (transição Stokes) será maior do que na direção oposta (transição anti-Stokes). No efeito Raman ordinário, não estimulado, participam do processo apenas fônons térmicos preexistentes, cuja população varia com a temperatura, de

modo que a relação entre as intensidade do pico Stokes,  $I_S$ , e anti-Stokes,  $I_{AS}$ , levando em conta a distribuição de Bose-Einstein dos fônons, é dada por [29]:

$$\frac{I_S}{I_{AS}} = \left( \frac{\omega - \omega_{R_i}}{\omega + \omega_{R_i}} \right)^4 \exp \left[ \frac{hc\omega_{R_i}}{kT} \right], \quad (2.1)$$

onde  $\omega$  e  $\omega_{R_i}$  são, respectivamente, as frequências da fonte de excitação e dos modos vibracionais analisados.



**Figura 2.2** Ilustração das frequências espalhadas: espalhamento Rayleigh (elástico); Raman Stokes e anti-Stokes (inelásticos). Fonte: Arquivo do Autor

Como a energia da luz é proporcional à sua frequência, a variação na frequência da luz espalhada deve ser igual às diferenças de frequências vibracionais ou rotacionais dos átomos que compõem o material. Cada material fornece um espectro que é como sua impressão digital, permitindo sua identificação inequívoca ou, por exemplo, a detecção de alterações químicas decorrentes de sua interação com outras substâncias ou com a luz. Esta é uma característica intrínseca do material analisado e independe da frequência da luz incidente. No entanto, geralmente utiliza-se luz de comprimento de onda arbitrário, visível ou infravermelho, cuja frequência é distante das frequências de vibração dos átomos. A análise por espectroscopia Raman é feita sem necessidade de quaisquer preparações ou manipulações no meio.

Atualmente, há mais de 20 modalidades de espectroscopia Raman [29], cada uma com objetivos e aplicações diferentes, que envolvem a possibilidade de exploração de alguns efeitos especiais, como por exemplo, o efeito Raman ressonante (RR) e o efeito de

intensificação de espalhamento por meio de superfícies (SERS). O efeito Raman ressonante ocorre quando se utiliza uma linha laser que coincida com uma banda de absorção intensa da espécie de interesse. Nessa circunstância ocorre uma grande intensificação (que pode chegar a 4 ou 5 ordens de grandeza) na intensidade das bandas associadas ao grupo. Já o efeito SERS, é observado quando uma espécie química está próxima ou adsorvida sobre uma superfície metálica rugosa, permitindo um aumento significativo da intensidade Raman devido o aumento do campo local.

### 2.2.1 CONCEPÇÃO CLÁSSICA

A concepção clássica do efeito Raman baseia-se no fato de que quando uma onda eletromagnética incide num material, seu campo elétrico oscilante imprime deslocamentos nos átomos constituintes, gerando momentos de dipolos oscilantes que influem na susceptibilidade elétrica e, por consequência, na polarização do material. Nesta situação, os elétrons começam a vibrar com a frequência da radiação incidente e esta vibração torna-se responsável pela variação da polarizabilidade com a posição associada a um modo normal de vibração do material. Cada modo normal envolve em princípio todos os átomos, mas usualmente apenas certos átomos contribuem de forma significativa para o modo normal, podendo-se considerar que os outros não oscilam. Por isso é muito comum encontrar trabalhos científicos que citam vibrações de um grupo ou de uma ligação. Numa molécula com estrutura linear com  $N$  átomos, existem  $3N-5$  modos normais de vibração, enquanto que numa molécula com estrutura não linear com  $N$  átomos, existem  $3N-6$  modos normais de vibração. Em primeira aproximação, cada um desses modos normais comporta-se como um oscilador harmônico independente dos restantes.

Em um átomo, devido os elétrons possuírem massa da ordem de  $10^3$  vezes menor que os núcleos, pode-se considerar os núcleos fixos em uma determinada posição de equilíbrio em torno da qual vibram com frequências baixas, enquanto os elétrons vibram com frequências muito mais altas. Usualmente em espectroscopia Raman, a frequência da luz incidente,  $\omega$ , é muito menor que as frequências de ressonância dos elétrons,  $\omega_0$ , e muito superior às das vibrações dos núcleos. Fazendo analogia com um oscilador harmônico forçado, pode-se escrever a equação de movimento para os elétrons sob a interação da onda eletromagnética, cuja equação é dada por:

$$\ddot{x} + 2\gamma\dot{x} + \omega_0^2x = \frac{F}{m}, \quad (2.2)$$

com  $k = m\omega_0^2$ , e  $\gamma$  é o parâmetro que indica a intensidade do amortecimento do movimento. A resposta deste oscilador para frequências muito superiores às frequências de ressonância ( $\omega \gg \omega_0$ ) é  $\propto 1/\omega^2$ . Para frequências inferiores à da ressonância ( $\omega \ll \omega_0$ ) ele responde como se fosse o caso estático,  $F = kx$ , na mesma frequência da luz incidente. Isso significa que a frequência da luz incidente é alta demais para forçar as vibrações dos núcleos, mas é capaz de colocar os elétrons em oscilação.

Seja o campo elétrico da radiação incidente descrito por

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{E}_i(\mathbf{k}_i, \omega_i) \cos(\mathbf{k}_i \cdot \mathbf{r} - \omega_i t). \quad (2.3)$$

Neste meio o campo induz a polarização

$$\mathbf{P}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{P}_i(\mathbf{k}_i, \omega_i) \cos(\mathbf{k}_i \cdot \mathbf{r} - \omega_i t), \quad (2.4)$$

cuja amplitude é dada por

$$\mathbf{P}_i(\mathbf{k}_i, \omega_i) = \vec{\chi}(\mathbf{k}_i, \omega_i) \mathbf{E}_i(\mathbf{k}_i, \omega_i), \quad (2.5)$$

onde  $\vec{\chi}$  é o tensor susceptibilidade elétrica do meio,  $\mathbf{E}_i$  é o vetor amplitude do campo elétrico incidente,  $\mathbf{k}$ ,  $\mathbf{r}$  e  $\omega$  são o vetor de onda, o vetor posição e a frequência angular de oscilação da onda eletromagnética incidente, respectivamente. Os deslocamentos provocados pelas vibrações no meio,  $\mathbf{u}$ , com vetor de onda  $\mathbf{q}$ , (deslocamento relativo à posição de equilíbrio dos centros atômicos associados com um fônon) podem ser descritos por:

$$\mathbf{u}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{u}_0(\mathbf{q}, \omega_0) \cos(\mathbf{q} \cdot \mathbf{r} - \omega_0 t). \quad (2.6)$$

Por aproximação adiabática,  $\vec{\chi}$  pode ser descrita como função de  $\mathbf{u}$  e expandida como série de Taylor, como mostrado na Eq. (2.7) abaixo:

$$\vec{\chi}(\mathbf{k}_i, \omega_i, \mathbf{u}) = \vec{\chi}(\mathbf{k}_i, \omega_i, \mathbf{u})|_0 + (\partial\vec{\chi}/\partial\mathbf{u})|_0 \mathbf{u}(\mathbf{r}, t) + \frac{1}{2}(\partial^2\vec{\chi}/\partial\mathbf{u}^2)|_0 \mathbf{u}^2(\mathbf{r}, t) + \dots \quad (2.7)$$

A modulação harmônica da polarização é a origem da emissão da radiação eletromagnética. A expressão para a polarização do meio, modificada pela incidência da radiação, pode ser dada por [29]:

$$\begin{aligned} \mathbf{P} = & \vec{\chi} \mathbf{E}_i e^{i(\mathbf{k}_i \cdot \mathbf{r} - \omega_i t)} + \mathbf{E}_i \cdot \mathbf{u}_0 e^{i[(\mathbf{k}_i \pm \mathbf{q}) \cdot \mathbf{r} - (\omega_i \pm \omega_0)t]} \left( \frac{\partial \vec{\chi}}{\partial \mathbf{u}} \right) \Big|_0 + \\ & + \frac{1}{2} \mathbf{E}_0^2 \cdot \mathbf{u}_0^2 e^{i[(\mathbf{k}_i \pm 2\mathbf{q}) \cdot \mathbf{r} - (\omega_i \pm 2\omega_0)t]} \left( \frac{\partial^2 \vec{\chi}}{\partial \mathbf{u}^2} \right) \Big|_0 + \dots \quad (2.8) \end{aligned}$$

Na Eq. (2.8), o primeiro termo da equação refere-se ao espalhamento elástico de luz, pois a polarização oscilante tem a mesma frequência que a radiação incidente, tal efeito é chamado de espalhamento Rayleigh. O segundo membro descreve o espalhamento Raman de primeira ordem, anti-Stokes (+) e Stokes (-), nos quais a frequência do sistema oscilante é reduzida



ou aumentada de  $\omega_0$ , respectivamente. O próximo termo é referente ao espalhamento Raman de segunda ordem, no qual o processo envolve dois fônons, e assim sucessivamente.

A conservação do momento linear fornece o seguinte valor para o módulo do vetor de onda,  $q$ , do fônon:

$$q^2 = k_i^2 + k_s^2 - 2k_i k_s \cos\theta, \quad (2.9)$$

onde  $k_i$  e  $k_s$  são os módulos dos vetores de onda das radiações incidente e espalhada, respectivamente. Para os comprimentos de onda dos fótons no visível ( $\lambda_i$  da luz está entre 400 e 800 nm [30]), temos que  $k_i$  ( $k_i = 2\pi/\lambda_i$ ) é da ordem de  $10^5 \text{ cm}^{-1}$ . Geralmente os valores das energias dos fônons nos sólidos são bastante pequenos, quando comparados à energia dos fótons na região do visível. Sendo assim, pode-se considerar que os vetores de onda  $k_i$  e  $k_s$  possuem aproximadamente o mesmo valor, ou seja,  $k_i \sim k_s = k$ . O valor máximo de  $q$ , na Eq. (2.9), ocorrerá quando  $\theta = 180^\circ$ , ou seja, no caso de retroespalhamento. Desta forma, o maior valor do módulo do vetor de onda,  $q$ , que poderá participar do processo de espalhamento é dado por:

$$q \approx 2k \quad (2.10)$$

O vetor de onda de um fônon em um sólido pode, a princípio, assumir qualquer valor dentro da primeira zona de Brillouin (ZB). A extensão da ZB é da ordem de  $2\pi/a$ , sendo  $a$  o valor do parâmetro de rede do material. O valor de  $q$  obtido da Eq. (2.10) é muito menor que a extensão típica da Zona de Brillouin ( $q < 2\pi/a < 108 \text{ cm}^{-1}$ ) da maior parte dos materiais. Portanto o espalhamento Raman de primeira ordem envolve apenas oscilações com momentos próximos do centro da Zona de Brillouin, isto é,  $q \cong 0$ .

A intensidade da radiação espalhada é proporcional ao quadrado da polarização induzida e depende da polarização da luz espalhada,  $\hat{e}_s$ , da forma  $|\mathbf{P}_{ind} \cdot \hat{e}_s|^2$  [31]. Tomando a aproximação em que  $q \cong 0$  e denotando a polarização da luz incidente por  $\hat{e}_i$ , a intensidade da luz espalhada em primeira ordem  $I_S$  pode ser escrita como:

$$I_S \propto \left| \hat{e}_i \cdot \left( \frac{d\vec{\chi}}{du} \right)_{q=0} \mathbf{u}(\omega_0) \cdot \hat{e}_s \right|^2. \quad (2.11)$$

Fazendo  $\hat{\mathbf{u}} = \mathbf{u}/|\mathbf{u}|$  o versor paralelo à direção do deslocamento atômico, podemos definir um tensor  $\vec{R}$  como

$$\vec{R} = \left( \frac{d\vec{\chi}}{d\hat{\mathbf{u}}} \right)_{q=0} \hat{\mathbf{u}}(\omega_0). \quad (2.12)$$

Desta forma, a intensidade da luz espalhada pode ser escrita como

$$I_S \propto \left| \hat{e}_i \cdot \vec{R} \cdot \hat{e}_s \right|^2, \quad (2.13)$$

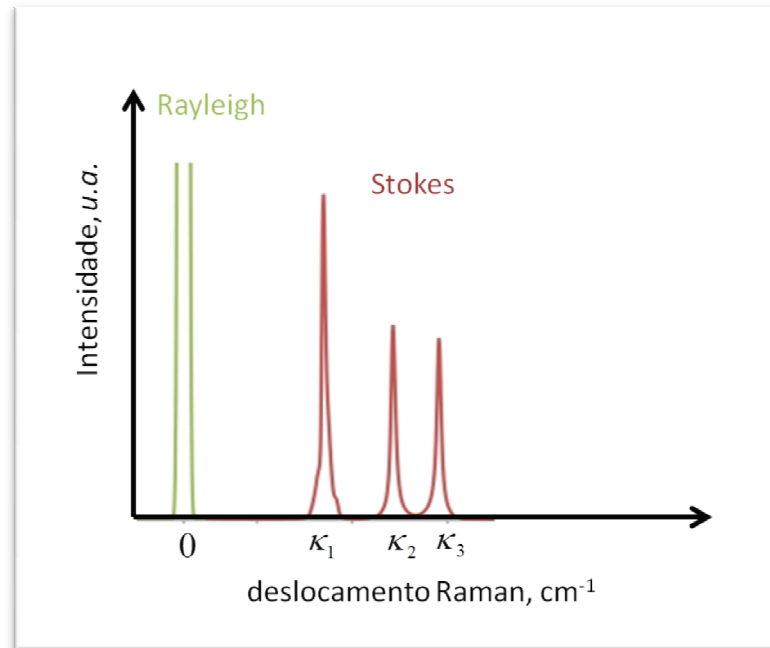
onde  $\vec{R}$  é o chamado tensor Raman. Para que exista esta contribuição, nota-se que  $\vec{\chi}$  deve variar com pequenos deslocamentos de  $u$  em torno da posição de equilíbrio, ou seja:

$$\left(\frac{d\vec{\chi}}{d\hat{u}}\right)_{q=0} \neq 0. \quad (2.14)$$

Nota-se da Eq. (2.12) que o tensor Raman é dependente da simetria das oscilações atômicas que modificam a polarização do meio. Então esse tensor pode ser obtido através da matriz de representação irredutível da simetria do meio. Uma vez conhecido o tensor Raman referente a uma oscilação específica, nota-se da Eq. (2.13) que para uma dada combinação de polarizações da luz incidente e espalhada a intensidade da radiação espalhada pode ser nula, desta forma, dizemos que o modo de vibração Raman é não ativo. No caso onde a intensidade da luz, que é oriunda do processo de espalhamento, que envolve um determinado modo vibracional for diferente de zero, o modo é dito Raman ativo, ou seja, esse modo vibracional é acessível por espalhamento Raman.

Analisando as Eqs. (2.12) e (2.13), vemos que a atividade Raman é dependente da direção de propagação das oscilações, ditadas pelo tensor Raman, e da geometria de espalhamento, isto é, da polarização e das direções das radiações incidente e espalhada. Esse conjunto de combinações, que leva em consideração a geometria do espalhamento, recebe o nome de *regras de seleção Raman*. Os tensores Raman, bem como a atividade Raman dos modos vibracionais de diversos compostos, podem ser encontrados na literatura, como por exemplo, nas Refs. [32] e [33].

Um espectro Raman usual, mostrado na Figura 2.3, exibe em seu eixo das abscissas, a diferença entre o número de onda da radiação incidente e o da radiação Stokes espalhada (chamada de deslocamento Raman), cuja unidade é convencionalmente expressa em unidades de inverso de centímetros,  $\text{cm}^{-1}$ . No eixo das ordenadas tem-se a intensidade espectral, usualmente representada em unidades arbitrárias (*u.a.*), que é dependente de parâmetros experimentais.



**Figura 2.3** Típico espectro Raman. Fonte: Arquivo do autor

Espectros Raman fornecem medidas diretas das energias dos modos normais de oscilação do meio, que por sua vez, dependem intrinsecamente das interações entre os átomos constituintes. Assim, o espectro vibracional de um dado material será significativamente modificado quando na presença de alterações atômicas composicionais e estruturais como, por exemplo, alterações químicas, efeitos de *stress* e confinamentos quânticos (fatos que possibilitam que a espectroscopia Raman seja utilizada para o estudo dessas propriedades).

A visão clássica do efeito Raman descreve as frequências observadas, mas quando o interesse é analisar o que ocorre com as intensidades dos picos, um tratamento quântico deve ser feito.

### 2.2.2 CONCEPÇÃO QUÂNTICA

Na concepção quântica, o espalhamento Raman de primeira ordem (com a participação de apenas um fônon) pode ser dividido em três passos: um fóton incide no material criando um par elétron buraco. Em seguida o elétron é espalhado por um fônon que pode ser criado (processo Stokes) ou aniquilado (processo anti-Stokes). Por último, o elétron se recombina com o buraco, gerando um fóton que é então emitido.

Todo processo de interação deve ocorrer obedecendo às leis de conservação de energia e momento linear:

$$E_i = E_s \pm E_q, \hbar\omega_i = \hbar\omega_s \pm \hbar\omega_q; \quad (2.15)$$

$$\vec{p}_i = \vec{p}_s \pm \vec{p}_q, \vec{k}_i \hbar = \vec{k}_s \hbar \pm \hbar\vec{q}. \quad (2.16)$$

$E_s$  e  $\vec{p}_s$  correspondem à energia e momento dos fótons espalhados, enquanto que  $E_q$  e  $\vec{p}_q$  são as mesmas grandezas para o fônon: sinal '+' para um fônon criado; e sinal '-' para um fônon aniquilado. O Hamiltoniano deste processo de interação é dado por:

$$H = H_M + H_R + H_{MR} + H_{ef} \quad (2.17)$$

onde  $H_M$  corresponde ao Hamiltoniano do material,  $H_R$  é devido à radiação, o  $H_{MR}$  corresponde à interação radiação-matéria e  $H_{ef}$  é o Hamiltoniano de interação elétron fônon. Este Hamiltoniano do sistema pode ser convenientemente reescrito como a soma de duas partes:

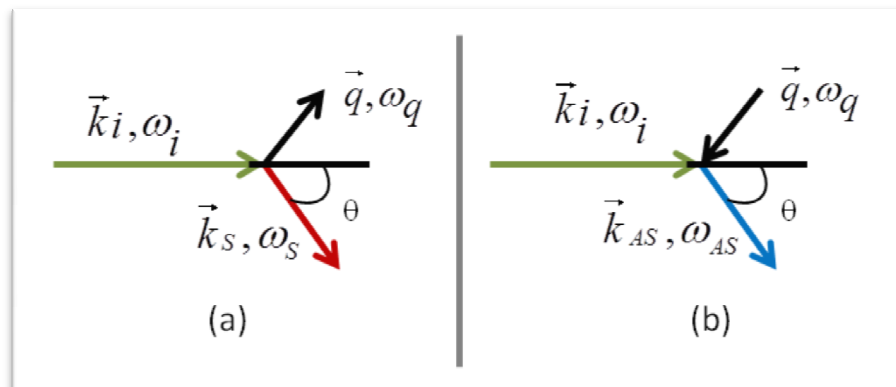
$$H = H^0 + H', \quad (2.18)$$

onde

$$\begin{aligned} H^0 &= H_M + H_R \\ H' &= H_{MR} + H_{ef} \end{aligned} \quad (2.19)$$

Uma vez que  $H' \ll H^0$ , pode-se tratar o problema com a Teoria da Perturbação, onde o Hamiltoniano  $H^0$  é o não perturbado, e  $H'$  pode ser tratado como uma perturbação.

A regra de seleção no espalhamento Raman de primeira ordem está associada à conservação de momento. Das Eqs. (2.15) e (2.16) pode-se desenhar o seguinte esquema para a conservação do momento linear:



**Figura 2.4** Conservação do momento linear para o espalhamento Raman Stokes (a) e anti-Stokes (b) [34, 35].

Os estados pelos quais o sistema passa durante uma transição Raman de primeira ordem (autoestados de  $H^0$ ) podem ser escritos, utilizando a notação de Dirac, como [34]:

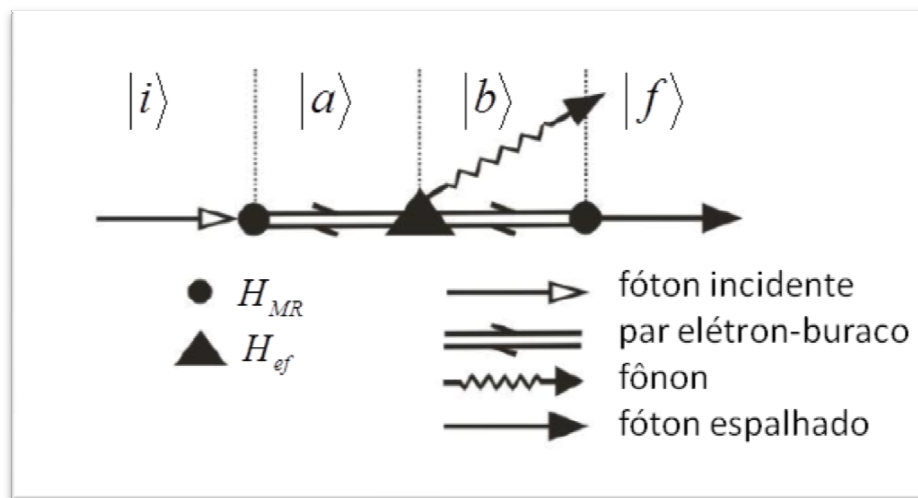
$$|i\rangle = |n_i, 0, n, \psi_0\rangle \quad (2.20)$$

$$|a\rangle = |n_i - 1, 0, n, \psi_a\rangle \quad (2.21)$$

$$|b\rangle = |n_i - 1, 0, n \pm 1, \psi_b\rangle \quad (2.22)$$

$$|f\rangle = |n_i - 1, 1, n \pm 1, \psi_0\rangle \quad (2.23)$$

O primeiro número em cada autoestado corresponde ao número de fótons incidentes, o segundo o número de fótons que foram espalhados, o terceiro corresponde à quantidade de fônons na rede cristalina, e por último tem-se o estado eletrônico. Por exemplo, para o estado inicial  $|i\rangle$ , tem-se  $n_i$  fótons incidentes, 0 fótons espalhados,  $n$  fônons na rede e o estado eletrônico é descrito por  $\psi_0$ . A Figura 2.5 ilustra este encadeamento.



**Figura 2.5** Diagrama de Feynman ilustrando uma transição Raman de primeira ordem, com fônon sendo criado. Modificado de [34].

Quando um fóton incide no material, criando um par elétron buraco, a radiação perde um fóton, mas o sistema ainda não possui fótons espalhados (0 fótons espalhados) e o número de fônons na rede ainda é  $n$ , sendo que o elétron está em um estado  $\psi_a$ . Estas informações estão descritas no autoestado  $|a\rangle$ . O autoestado seguinte,  $|b\rangle$ , corresponde à descrição do sistema no momento em que, possuindo  $n_i - 1$  fótons e 0 fótons espalhados, a interação entre um elétron e um fóton dá origem a um fônon na rede (no caso do espalhamento Stokes) ou aniquila um fônon (no caso anti-Stokes), e então o sistema passa a possuir  $n \pm 1$  fônons: '+' para o processo Stokes; e '-' para o anti-Stokes. Neste momento o sistema ainda passa para um estado eletrônico  $\psi_b$ . Finalmente, o elétron se recombina com o buraco, gerando um fóton que é emitido e deixando o sistema no estado  $|f\rangle$ , que possui  $n_i - 1$  fótons incidentes, 1 fóton espalhado,  $n \pm 1$  fônons na rede e está no seu estado  $\psi_0$ . O processo de espalhamento é composto pelas três etapas citadas anteriormente, sendo que então a intensidade espalhada

relativa à energia do laser é dada pela Teoria da Perturbação Dependente do Tempo (TPDT) de terceira ordem, onde se tem:

$$I(E_i) \propto \sum_f \left| \sum_{a,b} \frac{\langle f|H_{MR}|b\rangle\langle b|H_{ef}|a\rangle\langle a|H_{MR}|i\rangle}{(E_i-E_a)(E_i-E_b)} \right|^2 \delta(E_i - E_f), \quad (2.24)$$

onde  $E_i$  é a energia no estado  $|i\rangle$ ,  $E_a$  é a energia do estado  $|a\rangle$ ,  $E_b$  é a energia do estado  $|b\rangle$  [34, 36]. Observando o denominador da Eq. (2.24), vemos que haverá uma divergência na intensidade quando  $E_i = E_a$  ou  $E_i = E_b$ . Este fenômeno é conhecido como efeito Raman ressonante, muito útil para o estudo das propriedades eletrônicas de vários materiais, como discutido anteriormente.

O espalhamento Raman também pode ocorrer para ordens superiores, onde por “ordem” deve-se entender como o número de etapas intermediárias envolvendo fônons. No caso do espalhamento Raman de segunda ordem, dois fônons, e o que ocorre é que a intensidade passa a ser dada pela Teoria de Perturbação Dependente do Tempo de quarta ordem, e assim sucessivamente.

### 2.3 INSTRUMENTAÇÃO

O sistema instrumental de espectroscopia Raman pode ser, tipicamente, dividido em quatro componentes principais: fonte de luz; sistema de iluminação da amostra e óptica de coleta de luz; seletor de comprimento de onda; e dispositivo de detecção. Antes de iniciar uma discussão detalhada sobre os principais componentes utilizados em espectroscopia Raman, vamos considerar algumas questões instrumentais gerais e de suma importância para a seleção ou a construção de um sistema envolvendo espectroscopia Raman. Na maioria dos casos, a escolha de um determinado componente tem grandes efeitos sobre todo o sistema. Por exemplo, o comprimento de onda da fonte de luz pode ditar o tipo de seletor de comprimento de onda (dispersivo ou interferométrico), o detector (canal único ou multicanais), a proporção máxima possível da relação sinal-ruído (SNR), entre outros.

A amostra é, usualmente, iluminada com um feixe de laser na região do ultravioleta, visível ou infravermelho próximo. A luz espalhada é coletada por um conjunto de elementos ópticos e enviada através de um filtro de interferência e/ou espectrômetro acoplado a um detector, para registrar o espectro Raman de uma amostra. Como o espalhamento Raman espontâneo é muito fraco, a principal dificuldade da espectroscopia Raman é separá-lo, espectralmente falando, do sinal de fundo: luz devido ao espalhamento Rayleigh e/ou fluorescência. O principal problema aqui é o fato da intensidade do sinal de fundo,

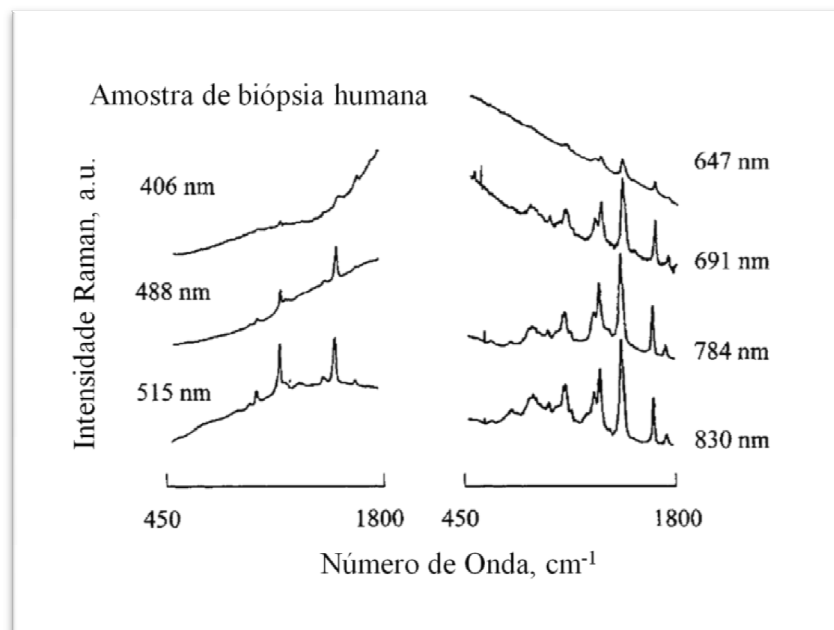
usualmente, exceder a intensidade do sinal Raman nas proximidades do comprimento de onda do laser. No caso da luz proveniente do espalhamento Rayleigh, utilizam-se filtros de interferência (notch) disponíveis comercialmente que eliminam uma faixa espectral muito estreita em torno da linha do laser, onde a dispersão de luz tem o efeito mais intenso. Este método é eficaz mas não permite a detecção dos modos Raman de baixas frequências no intervalo abaixo de  $\sim 100 \text{ cm}^{-1}$ . Luz difusa também é gerada nos espectrômetros, principalmente por dispersão da luz em suas grades de difração. Espectrômetros Raman normalmente usam grades holográficas, que têm muito menos defeitos de fabricação em sua estrutura, além disso a luz difusa produzida por grades holográficas é cerca de uma ordem de magnitude menos intensa [37]. Utilizar vários estágios de dispersão também é uma outra maneira de reduzir a luz difusa. Espectrômetros duplos e triplos permitem a obtenção de espectros Raman, às vezes, mesmo sem o uso de filtros notch. Nestes sistemas, os modos Raman ativos com frequências de até 3 a  $5 \text{ cm}^{-1}$  podem ser detectados de forma eficiente.

### 2.3.1 FONTES DE EXCITAÇÃO

Feixes lasers que produzem radiação com grande monocromaticidade e estabilidade são geralmente requeridos, na iluminação das amostras, em espectroscopia Raman. Dentre os mais utilizados, pode-se citar os lasers de gases nobres (Ar, Kr, He-Ne, e He-Cd), os lasers de estado sólido (Rubí, Nd-YAG, e Titânio-Safira), e os lasers de diodo de onda contínua (CW). A escolha do comprimento de onda do laser geralmente envolve três fatores principais: a seção de choque Raman, a sensibilidade do detector, e o sinal de fundo da amostra. Usualmente a seção de choque Raman diminui com o aumento do comprimento de onda do laser, ou seja, menores comprimentos de onda dos lasers fornecerão espalhamentos Raman mais intensos. No entanto, alguns espalhadores apresentam efeitos de ressonância que podem intensificar ainda mais o efeito. Neste caso, se o aumento no comprimento de onda do laser for necessário para que ocorra a ressonância, então esta condição deverá ser explorada. Na ausência de efeitos de ressonância, um comprimento de onda do laser mais curto irá produzir maiores seções transversais, cuja dependência é  $\propto 1/\lambda^4$ . Além disso, como será discutido na próxima seção, os detectores têm maior eficiência quântica e menos ruído, melhorando assim a qualidade de detecção, em comprimentos de onda mais curtos, geralmente na região visível do espectro. No entanto, os comprimentos de onda mais curtos, também são mais propensos a excitar a fluorescência uma vez que as transições eletrônicas ocorrem mais no ultravioleta (UV) e visível que nas regiões de infravermelho (IR). Assim, para amostras potencialmente

fluorescentes, o comprimento de onda do laser deve ser tão longo como permitido por requisitos de sensibilidade do detector.

Nota-se que, com o objetivo final de maximizar a SNR, existe uma competição entre uma sensibilidade maior em comprimentos de onda mais curtos do laser e um sinal de fundo mais baixo em comprimentos de onda mais longos. Essa competição, do comprimento de onda do laser versus a SNR, pode ser observada na Figura 2.6 em uma amostra de biópsia de mama humana [38].



**Figura 2.6** Espectros Raman, de uma biópsia de mama humana normal, obtidos com lasers de diversos comprimentos de onda entre 406 e 830 nm. Modificado de [38].

Na Figura 2.6 são apresentados seis espectros Raman que foram adquiridos com lasers que variam entre 406 e 830 nm. Com o laser de 406 nm, a fluorescência é suficientemente intensa tal que o sinal Raman é completamente sobreposto pelo sinal de fundo (fluorescência). Neste caso a SNR do sinal Raman se aproxima de zero por causa da elevada interferência de fundo. Com o laser de 514,5 nm, os carotenóides (relacionados com o  $\beta$ -caroteno) que estão em ressonância são facilmente observados acima de um sinal de fundo ainda elevado, apesar de a amostra conter apenas uma pequena quantidade de caroteno ( $< 1\%$ ). Se o objetivo for monitorar os carotenóides em amostras biológicas, o efeito de ressonância torna-se importante e pode ser explorado. Para os comprimentos de onda do laser em 691 nm, 784 nm, e 830 nm, o aumento devido ao fenômeno de ressonância no caroteno está ausente (ou, pelo menos, muito menor) e a contribuição de ácidos graxos no espectro Raman é aparente pois o sinal de fundo é muito menor e a SNR é maior. A SNR é melhorada quando o comprimento de onda do laser



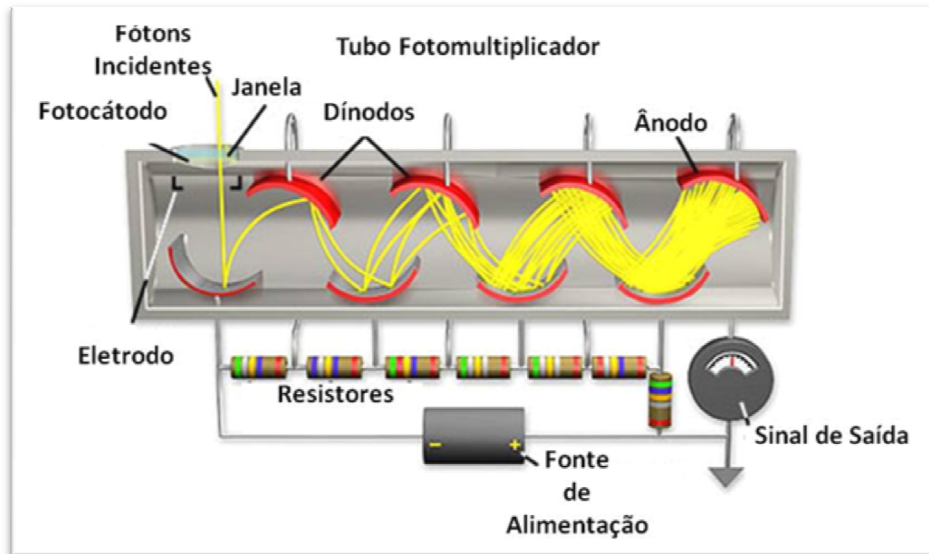
aumenta porque o sinal de fundo diminui muito mais que o sinal Raman. Com o aumento no comprimento de onda, observou-se uma redução no sinal de fundo. Eventualmente, o aumento no comprimento de onda do laser, irá reduzir a SNR novamente, pois haverá uma diminuição na eficiência quântica do detector, que usualmente apresentam maiores sensibilidades na região visível do espectro.

### 2.3.2 DISPOSITIVOS DE DETECÇÃO

O desempenho dos sensores eletrônicos de detecção é caracterizado por muitas variáveis, entre elas podemos citar a sensibilidade espectral, eficiência quântica, resolução espacial, uniformidade, relação sinal ruído, faixa dinâmica, e velocidade de resposta. A sensibilidade espectral é um termo importante que determina o nível de sinal em função do comprimento de onda da luz incidente. É muitas vezes expressa em termos de eficiência quântica, que é o percentual de fótons incidentes que são detectados. Os detectores usualmente utilizados em espectroscopia Raman apresentam maior eficiência quântica na região do visível e NIR. A uniformidade de um detector é geralmente definida pela variação na intensidade do sinal em relação à posição do sensor que ele é detectado. Ela é determinada por diversas variáveis, incluindo variações de ganho em todo o sensor e as diferenças regionais no ruído. Os detectores eletrônicos são muitas vezes comparados por sua SNR, que é a razão da potência do sinal de interesse e a potência do ruído sobreposto ao sinal. É uma medida que indica a confiança com que a magnitude do sinal pode ser estimada.

A Luz tem uma componente de ruído inerente decorrente da natureza estocástica do fluxo de fótons (e regido pela estatística de Poisson), que é igual à raiz quadrada do sinal [39]. O Ruído também deriva de uma variedade de outras fontes, mas muitas vezes pode ser reduzida apenas reduzindo a temperatura operacional. O ruído presente em dispositivos eletrônicos sensíveis, na ausência de luz, é denominado ruído térmico, que produz uma corrente de escuro. Os detectores podem ser divididos em dois tipos: canal único; e multicanais.

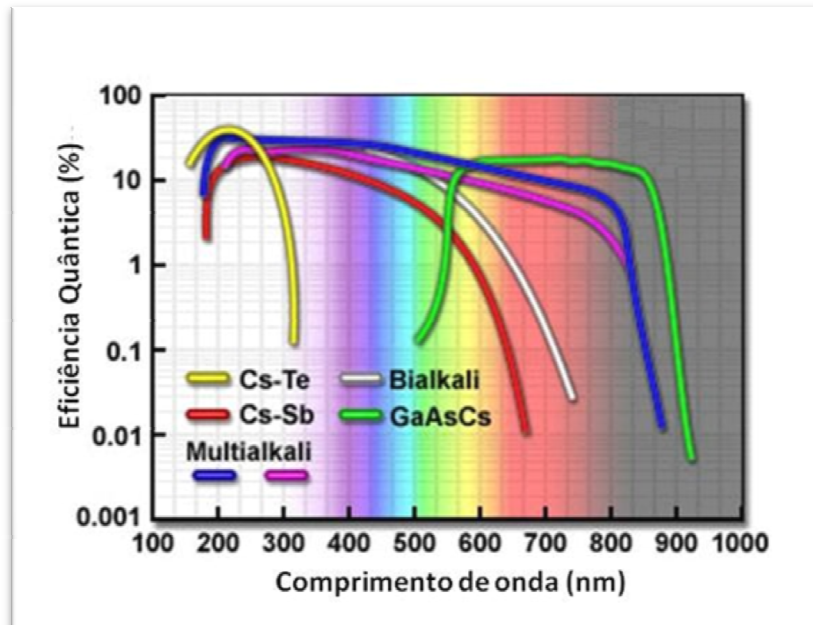
A fotomultiplicadora é o detector de canal único mais utilizado por ser muito versátil e sensível nas regiões do espectro eletromagnético, do ultravioleta, visível e infravermelho próximo. O diagrama esquemático de um tubo fotomultiplicador típico é mostrado na Figura 2.7.



**Figura 2.7** Diagrama esquemático de um tubo fotomultiplicador típico. Modificado de [40].

O fotocátodo, que é o sensor de radiação, é mantido no vácuo. Os fótons incidentes, que são convertidos em elétrons através do efeito fotoelétrico, são guiados por um campo elétrico apropriado até um eletrodo (ou dínodo). Um número de elétrons secundários são emitidos, neste dínodo, para cada elétron primário proveniente do fotocátodo. Estes elétrons secundários, por sua vez são direcionados para um segundo dínodo e assim por diante, podendo alcançar até um ganho final da ordem de  $10^8$ . Os elétrons do último dínodo são recolhidos por um ânodo, que fornece a corrente de sinal correspondente aos fótons incidentes. A saída do ânodo é geralmente alimentada diretamente em um amplificador eletrônico. Para evitar que o ruído do sistema seja dominado pelo amplificador, a fotomultiplicadora deve ser operada em altos níveis de ganho.

Os tubos fotomultiplicadores são feitos em uma variedade de tamanhos e de materiais de modo que diferentes configurações ópticas podem ser acomodadas. A Figura 2.8 abaixo mostra a eficiência quântica de alguns fotocátodos, na região de 100 a 1000nm.



**Figura 2.8** Responsividade espectral de alguns fotocátodos. Modificado de [41].

A fotomultiplicadora, para um grande número de aplicações, quando comparada como outros detectores de canal único, como por exemplo os diodos de silício, apresenta uma certa superioridade. Em geral, fotomultiplicadoras são preferíveis para aplicações envolvendo os comprimentos de onda mais curtos. Outros fatores como o tempo de resposta, a área do detector e o fator de ganho, também são importantes na escolha de um detector.

O tempo de resposta inerente de fotodetectores de células de silício pode estar na faixa de 10 a 20 nanossegundos, dependendo da área da célula. No entanto, por causa da capacitância da célula, o tempo de subida efetivo é muito mais longo, dependendo da escolha da resistência de carga. Por exemplo, com uma resistência de carga de  $1\text{ M}\Omega$ , o tempo de subida pode ser da ordem de  $20\ \mu\text{s}$ . Fotodiodos avalanche de silício podem ter tempos de subida de apenas 2 ns, e o ganho pode chegar até da ordem de  $10^2$ , mas a área sensível é pequena, cerca de  $0,5\text{ mm}^2$ . Em muitas aplicações, áreas bastante grandes são necessárias. A maior área de fotocátodo disponível em tubos fotomultiplicadores comerciais RCA tem um diâmetro nominal de 5 polegadas e uma área útil mínima de  $97\text{ cm}^2$ . Diodos *p-i-n* de silício estão disponíveis com área sensível, geralmente não maior do que  $1\text{ cm}^2$ , e os fotodiodos avalanche de silício,  $0,005\text{ cm}^2$ . Como discutido anteriormente, uma fotomultiplicadora pode ter um fator de ganho de  $10^3$  a  $10^8$ . Fotodiodos avalanche de silício têm um ganho de cerca de  $10^2$ , e os diodos de silício *p-i-n* não tem ganho. O alto ganho da fotomultiplicadora elimina a necessidade de amplificadores especiais, e seu ganho controlado pela tensão aplicada fornece flexibilidade na operação. Tubos fotomultiplicadores não são conhecidos por grande estabilidade, mas operam

de forma satisfatória no regime de baixas correntes de ânodo. Quando o nível de luz é razoavelmente alto, no entanto, a estabilidade muito boa dos diodos *p-i-n* de silício apresenta uma vantagem considerável.

No entanto, por causa da baixa intensidade de um sinal Raman típico, tempos de exposição muito longos são muitas vezes necessários para obter espectros Raman de boa qualidade, o que torna o estudo baseado na técnica de análise Raman, em alguns casos, inviável. As fotomultiplicadoras dominaram o sistema de detecção Raman até cerca de 1985, mas sua utilização diminuiu drasticamente após a introdução dos CCDs. Hoje em dia os detectores multicanais, mais comumente o CCD, são utilizados para a detecção do sinal Raman espalhado. A sensibilidade e o desempenho dos detectores CCD modernos estão melhorando consideravelmente e tornando-se, em algumas aplicações, indispensáveis para a espectroscopia Raman.

Os primeiros detectores multicanais para aplicações em Raman foram baseados em arranjo de diodos ou tecnologia vidicon derivada em parte da indústria da televisão, e são considerados como o arranjo de detectores de “primeira geração”. Estes foram rapidamente substituídos pelos sistemas de “segunda geração” com base no arranjo de diodos intensificado [42], e foram populares para a espectroscopia de Raman até o CCD ser desenvolvido [43,44]. O desempenho atraente dos CCDs os estabeleceu como detectores multicanais “de terceira geração”, e tem substituído quase todas as outras configurações de detecção Raman dispersiva, utilizadas para análise química.

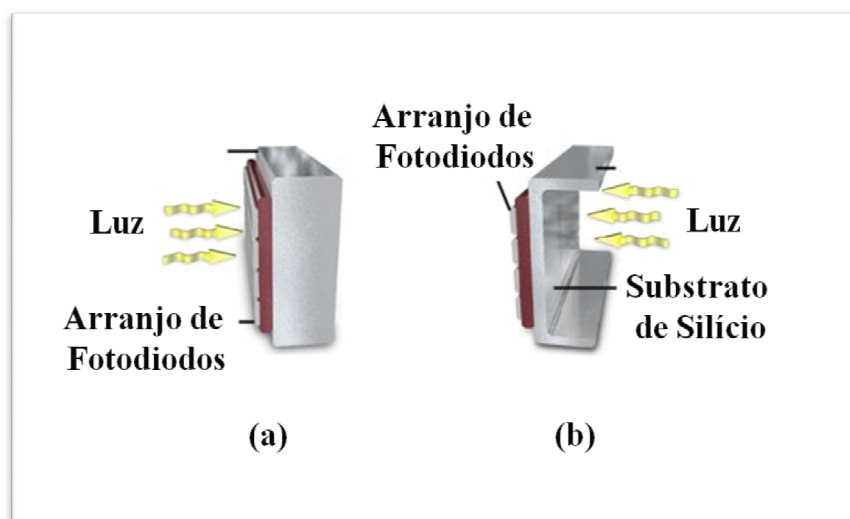
Um dispositivo de carga acoplada é um sensor, para captação de luz (imagens), formado por um circuito integrado, que contém uma matriz de capacitores acoplados, feito de material semicondutor como, por exemplo, o Silício. Sob o controle de um circuito externo, cada capacitor pode transferir sua carga elétrica para outro capacitor vizinho. A capacidade de resolução ou detalhe da imagem depende da densidade de elementos fotoelétricos do CCD, e esse número é expresso em pixels. Quanto maior o número de pixels, ou seja, quanto maior a densidade de elementos fotoelétricos, maior a resolução da imagem.

Em um dispositivo CCD há uma região fotoativa (uma camada epitaxial de silício), e uma região de transmissão feita de um registrador de deslocamento (o CCD, propriamente dito). A luz é projetada através de uma lente para a matriz de capacitores (região fotoativa), fazendo com que cada capacitor acumule uma carga elétrica proporcional à intensidade luminosa no local. Uma imagem bidimensional correspondente à cena projetada no plano focal do sensor é capturada, e uma vez que a matriz tenha sido exposta à imagem, um circuito de controle faz com que cada capacitor transfira sua informação para o vizinho (funcionando como um

registrador de deslocamento). O último capacitor da matriz descarrega sua carga em um amplificador de carga, que converte a carga em uma tensão. Repetindo esse processo, o circuito de comando converte todo o conteúdo da matriz de capacitores no semiconductor em uma seqüência de tensões. Em um dispositivo digital, estas tensões são então amostradas, digitalizadas, e normalmente armazenadas na memória.

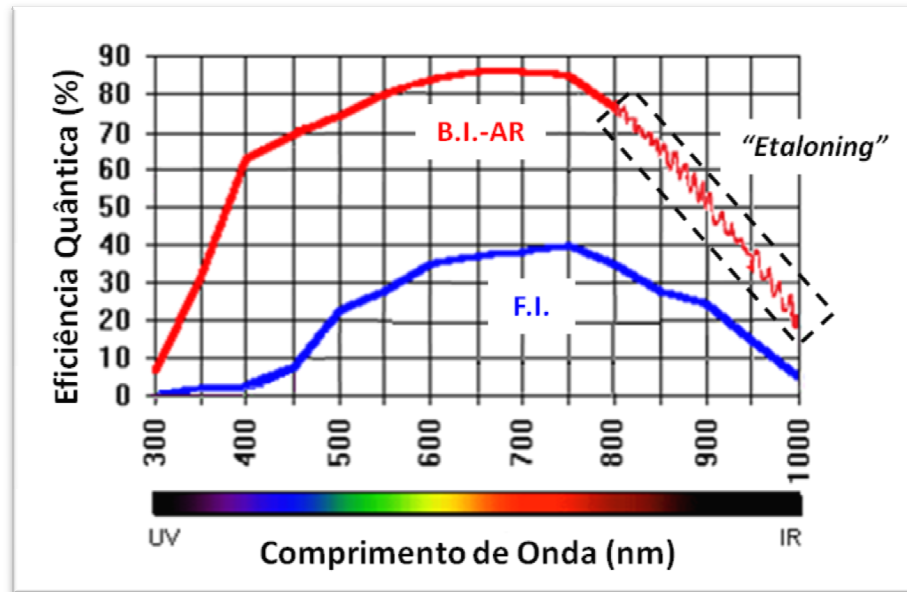
A configuração mais comum dos CCDs utilizados em espectroscopia Raman é a iluminada frontalmente (F.I.). Como mostrado na Figura 2.9(a), os sensores fotoelétricos são iluminados pela frente. A frente do CCD refere-se ao lado da pastilha de silício que contém o circuito de máscara, que coleta os fótons incidentes. Esse circuito abrange aproximadamente metade da área do arranjo de fotodiodos de silício, e os circuitos em si não são fotoativos, de modo que o silício é exposto a cerca de metade dos fótons incidentes e a máxima eficiência possível é em torno de 50%.

Uma outra configuração de CCD é a retroiluminada (B.I.), onde a luz incide por trás do circuito de máscara. Esses CCDs devem ser suficientemente finos ( $\sim 15 \mu\text{m}$ ), de tal forma que os elétrons gerados pela iluminação traseira possam migrar para os poços de potencial no lado do circuito e serem armazenados como antes. Como mostrado na Figura 2.9(b), os fótons entram por trás do CCD, onde não existe qualquer obstrução pela máscara de circuito. Neste caso, a eficiência quântica máxima pode ser bastante elevada, atingindo usualmente de 80 até 95%. Os CCDs F.I. são os mais comuns, porque eles são mais robustos e menos caros. Em média, custam a metade do valor dos CCDs B.I..



**Figura 2.9** Configurações mais comuns dos CCDs utilizados em espectroscopia Raman: (a) iluminada frontalmente; e (b) retroiluminada. Modificado de [45].

O processo necessário para fabricar esses circuitos requer camadas que absorvem fótons de UV, restringindo, assim, o CCD iluminado frontalmente em detectar comprimentos de onda em torno de 400 nm. Os CCDs retroiluminados não têm essa restrição, e uma alta eficiência também é mantida bem na faixa em torno de 400 nm. A Figura 2.10 mostra a eficiência quântica típica de sensores CCDs.



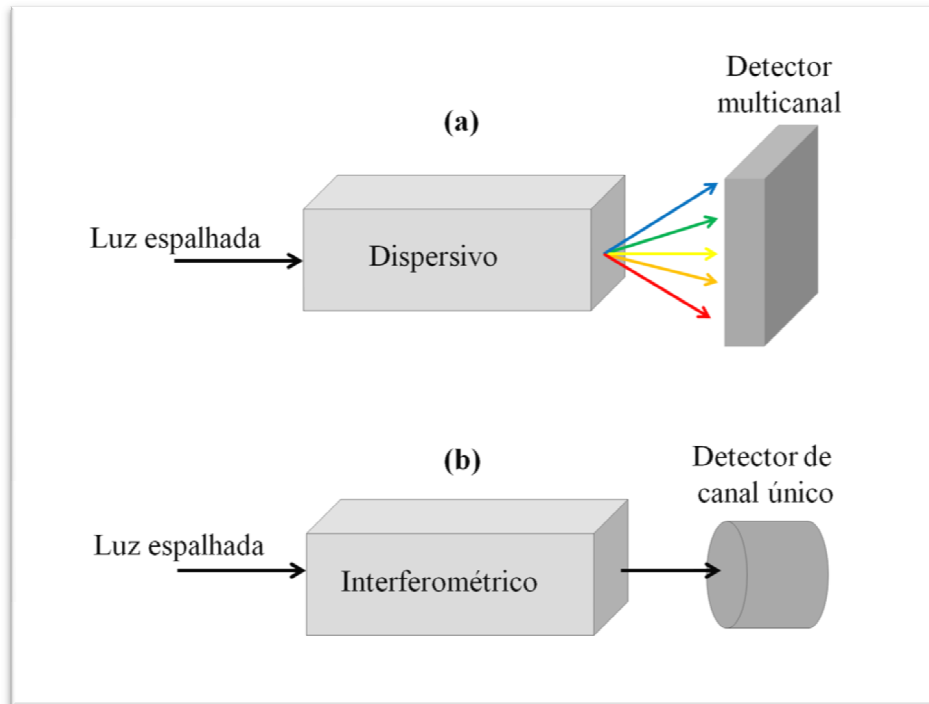
**Figura 2.10** Eficiência quântica típica de sensores CCDs usualmente utilizados em espectroscopia Raman: F.I.(azul); e B.I. (vermelha) onde podem ocorrer o efeito de “etaloning” na região do NIR. Modificado de [46].

Os CCDs B.I. têm frequentemente um revestimento antirrefletor (AR) na sua superfície fotossensível para melhorar ainda mais a eficiência. Além disso, o fino substrato de silício pode causar efeitos de interferência que aparecem como ganho de oscilações. Estes ganhos de oscilações são conhecidos como “etaloning” e geralmente ocorrem nas CCDs B.I. em comprimentos de onda na região do infravermelho próximo (NIR), como mostrado na figura 2.10.

### 2.3.3 ESPECTRÔMETROS

A introdução dos espectrômetros, dispersivos e interferométricos, na década de 1980 foi uma das maiores responsáveis pelo aumento em estudos envolvendo espalhamento Raman. Embora as duas técnicas tenham semelhanças por reduzirem o tempo de aquisição e aumentarem a intensidade do sinal, elas diferem fundamentalmente em seus métodos e em seus efeitos sobre a SNR. As duas abordagens são mostradas esquematicamente na Figura

2.11 e estão discutidas em detalhes ao longo desta seção. É importante notar que um espectrômetro dispersivo, dispersa a luz de forma que a detecção ocorre por muitos sensores operando paralelamente, enquanto um espectrômetro interferométrico direciona toda a luz espalhada sobre um sensor único.



**Figura 2.11** Configurações fundamentais de espectrômetros (a) dispersivos e (b) interferométricos. Fonte: Arquivo do autor.

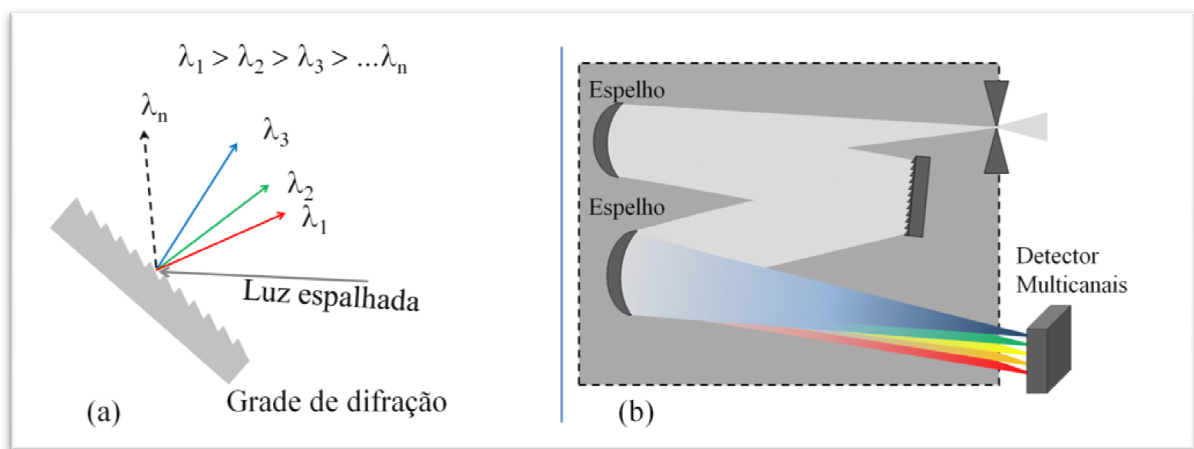
Esta diferença entre as abordagens dispersiva e interferométrica tem efeitos importantes sobre as características do espectro Raman, em termos de resolução, cobertura espectral, SNR, entre outros. A Tabela 2.1 mostra a comparação de algumas dessa característica entre o Raman dispersivo e o FT-Raman.

**Tabela 2.1** Comparação entre algumas características dos métodos Raman dispersivo e FT-Raman.[47]

Características	Raman Dispersivo	FT-Raman
Resolução espectral	Pior. Usualmente de 1 a 4 $\text{cm}^{-1}$ . Varia ao longo do espectro	Melhor. Usualmente $\sim 0,5 \text{ cm}^{-1}$ . Constante
SNR	Maior	Menor
Comprimentos de onda dos lasers disponíveis	Laser $\lambda > 200$ a 850nm (limitado pela resposta do CCD)	Usualmente 1064 nm
Supressão da fluorescência	Pior	Melhor
Fluorescência	Mais intensa	Menos intensa
Potência do laser	Menor	Maior

Em ambos os casos, o objetivo é um gráfico de intensidade de Raman (fótons por segundo) versus deslocamento Raman (em centímetros recíprocos), mas este resultado é conseguido por meio de processos diferentes.

Os espectrômetros dispersivos são usualmente associados a um detector multicanais, que usa múltiplos fotosensores operando em paralelo, para monitorar vários comprimentos de onda simultaneamente. Um exemplo comum é um espectrômetro dispersivo baseado em grade de difração com um dispositivo CCD no seu plano focal, como mostrado na Figura 2.12(b).



**Figura 2.12** Esquemas de (a) uma grade difração refletora e (b) um espectrômetro dispersivo com um estágio.  
Fonte: Arquivo do autor.

Uma grade de difração é um componente óptico que contém uma série de ranhuras, paralelas e muito próximas entre si, cuja confecção, até a década de 1960, era feita utilizando máquinas muito complexas que riscavam mecanicamente cada sulco/fenda da grade. Com o aparecimento do laser, foi possível gravar de uma só vez linhas geradas por um padrão de interferência de duas frentes de onda coerentes, num processo chamado de holografia. As grades de difração holográficas são produzidas através de um depósito de uma camada muito fina de um material sobre um substrato de vidro ou de quartzo, que é, posteriormente, corroído em certas regiões definidas pelo padrão de interferência, gerando sobre este material um conjunto de vales e topos denominados ranhuras. A qualidade de uma grade de difração é controlada pelo número de ranhuras por unidade de área e pela precisão com que estas foram feitas. Dependendo do número de ranhuras por milímetro, haverá uma maior ou menor resolução dos espectros. Instrumentos com melhor resolução espectral terão grades de difração com maior número de ranhuras por milímetro.

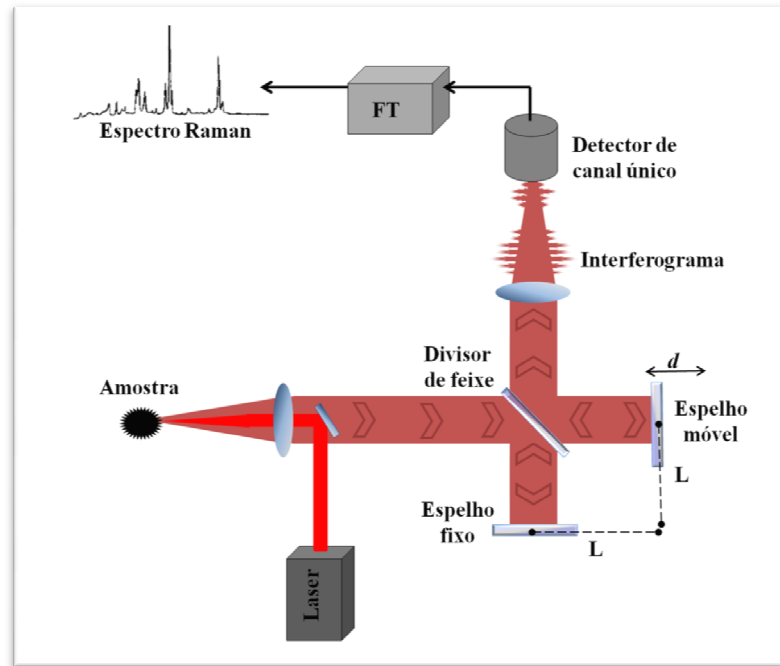


A eficiência das grades de difração é fortemente dependente do comprimento de onda. Cada grade tem um comprimento de onda ideal, usualmente chamado de comprimento de onda "*blaze*", em que a grade difrata, em primeira ordem, a fração máxima de luz. A eficiência da grade diminui à medida que se afasta deste comprimento de onda *blaze*, geralmente mais lentamente no lado da curva correspondente a comprimentos de onda maiores.

A Figura 2.12(b) mostra o esquema de um interferômetro dispersivo de um estágio, ou seja, de apenas uma grade de difração. No entanto, vários estágios podem ser utilizados num mesmo espectrômetro. Usualmente utiliza-se espectrômetros duplos ou triplos que além de reduzirem a luz Rayleigh difusa, se forem mantidas as características da grade de difração, pode-se também obter espectros Raman de melhor resolução.

O espectrômetro interferométrico diferentemente do dispersivo, não separa espacialmente os diferentes comprimentos de onda espalhados pela amostra. Através de um interferômetro, modula-os nas frequências dependentes de seus comprimentos de onda.

O interferômetro de Michelson é composto por dois espelhos planos perpendiculares entre si, um espelho fixo e um espelho móvel. Utilizando um divisor de feixes, o sinal proveniente da amostra é dividido em dois feixes de intensidades iguais, de tal forma que um é refletido para o espelho fixo, e o outro é transmitido para o espelho móvel. Ambos os feixes sofrem reflexão e são direcionados para o detector, como mostrado na Figura 2.13.



**Figura 2.13** Esquema de um espectrômetro FT-Raman baseado no interferômetro de Michelson. Fonte: Arquivo do Autor.

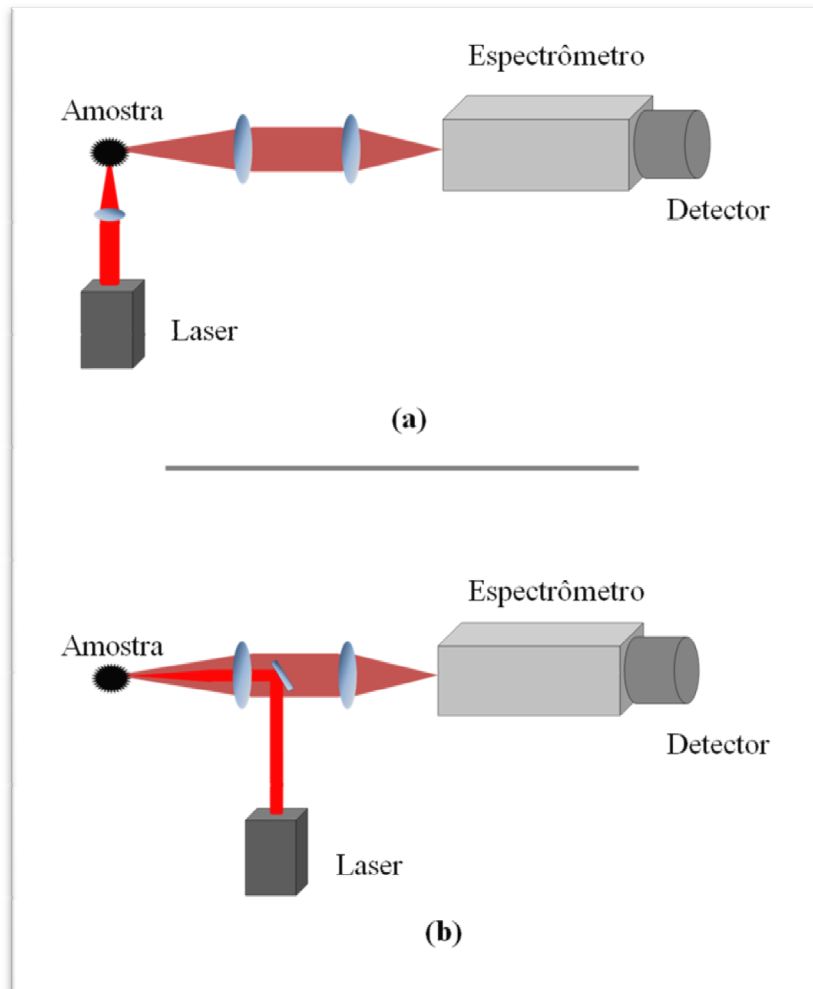
No entanto, como o espelho móvel pode ser movido para trás em torno do comprimento “L”, os dois feixes irão interferir na recominação, devido à diferença do comprimento de percurso óptico entre eles. O feixe recombinado, que é direcionado ao detector, pode ser devidamente modulado pelo movimento do espelho. O sinal enviado ao detector, chamado de interferograma, é a intensidade da radiação desses raios combinados em função do atraso entre eles. Como o atraso é uma função do tempo, o interferograma é uma função definida em domínio do tempo, cuja conversão para o domínio de frequência (ou número de onda), como estamos acostumados, é feita pela transformada de Fourier (FT).

Um exemplo é o FT-Raman, usado para monitorar luz Raman espalhada, cujo resultado é um único feixe, detectado por um canal único, que contém todos os comprimentos de onda de interesse. Desde que cada comprimento de onda é modulado em uma frequência diferente, uma transformada de Fourier do sinal que chega ao detector produz um espectro Raman.

## 2.4 MICROESPECTROSCOPIA RAMAN

Tanto os sistemas dispersivos quanto os interferométricos, discutidos anteriormente, são passíveis de microscópios e outros acessórios [7]. Dentre as várias possibilidades de arranjos experimentais, em espectroscopia Raman, utilizando um microscópio óptico, duas

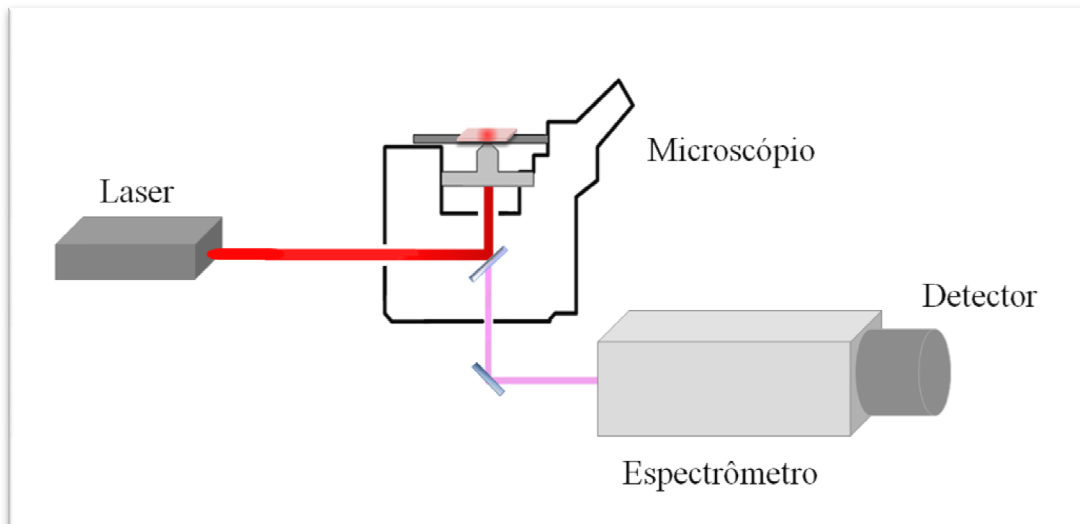
configurações de geometria de detecção são usualmente utilizadas. Uma delas é a detecção do sinal Raman perpendicularmente à direção da excitação do laser,  $90^\circ$ , a outra é a detecção do sinal Raman retroespalhado,  $180^\circ$ , como podem ser vistas na Figura 2.14.



**Figura 2.14** Geometrias de detecção usualmente utilizadas em espectroscopia Raman: (a) detecção perpendicular à direção de excitação do laser,  $90^\circ$ ; (b) detecção paralela à direção de excitação do laser,  $180^\circ$ .

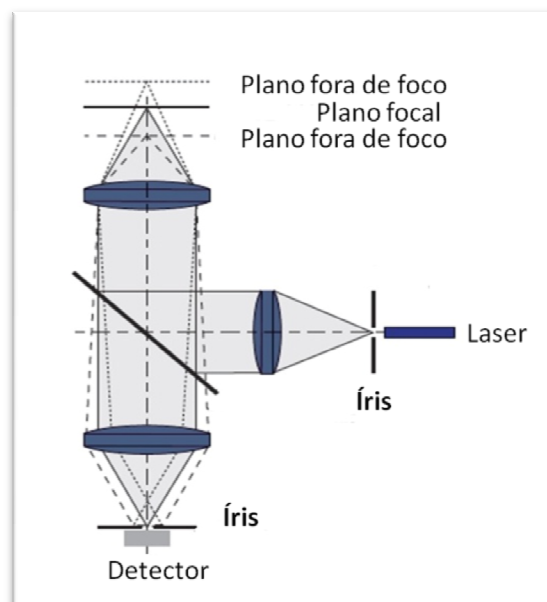
Fonte: Arquivo do autor.

A geometria de detecção a  $180^\circ$  é principalmente utilizada para estudo de microespectroscopia Raman. Microespectroscopia Raman é um termo geralmente utilizado para descrever esta técnica espacialmente resolvida em que os espectros são obtidos a partir de domínios microscópicos de uma amostra e permite o estudo de áreas da ordem de  $1 \mu\text{m}^2$  de diâmetro. Para isso, utiliza-se a combinação de um espectrômetro e um microscópio óptico convencional no qual a objetiva tanto serve para focalizar o feixe laser incidente na amostra quanto para coletar, o sinal Raman espalhado, e direcioná-lo ao espectrômetro, como mostra a Figura 2.15.



**Figura 2.15** Sistema básico de microespectroscopia Raman. Fonte: Arquivo do autor.

Além da grade de difração a resolução espectral também pode ser melhorada com a técnica confocal. A Microscopia confocal é uma técnica que utiliza uma íris de restrição espacial na iluminação e nos planos de detecção para que somente luz em foco atinja o detector, como mostra a Figura 2.16.

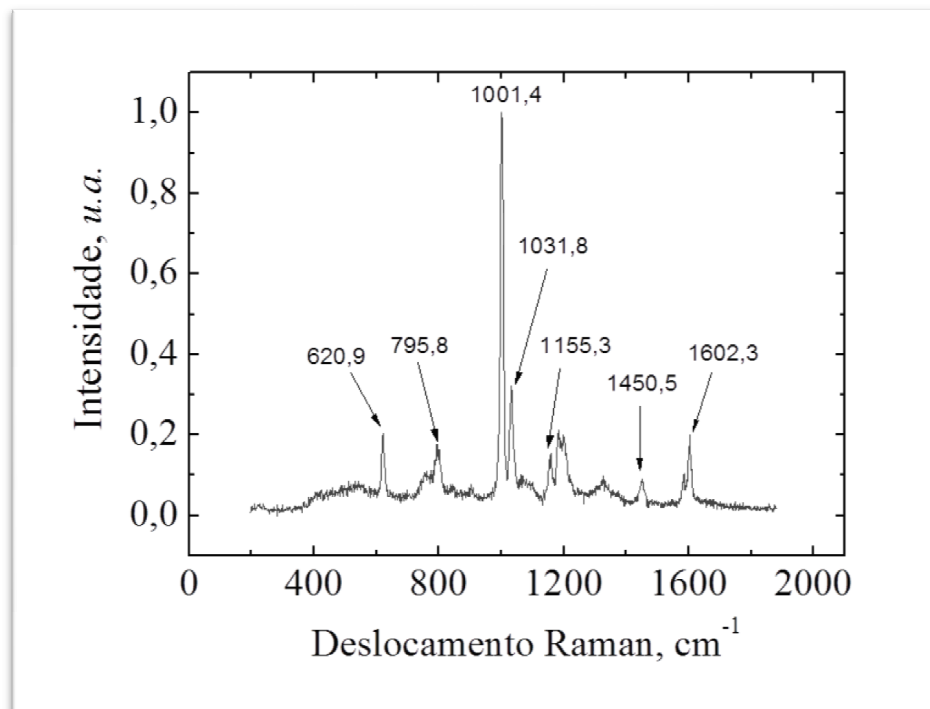


**Figura 2.16** Ilustração do esquema de restrição espacial da luz na microespectroscopia confocal. Modificado de [48].

A íris de detecção que rejeita a maioria de luz fora de foco, além de diminuir o sinal de fundo proveniente de outros planos focais, aumenta a resolução espacial.

O sistema de microespectroscopia Raman desenvolvido nesta tese é confocal, e utiliza um laser de diodo CW com 120 mW de potência máxima e um filtro passa banda, centrados em 785 nm, para iluminação. Um microscópio invertido com uma objetiva 60 X de imersão em água, com 1,3 N.A. e 0,3 mm W.D., foram utilizados na construção do sistema de microRaman, para o estudo de áreas micrométricas. Para a detecção do sinal Raman, foram utilizados um espectrômetro dispersivo, como representado na Figura 2.12, e um detector multicanais, CCD retroiluminado, como mostrado na Figura 2.9(b). Uma fibra óptica multimodos foi utilizada no sistema para direcionar o sinal Raman, coletado pela objetiva, até o espectrômetro.

O poliestireno,  $(C_8H_8)_n$ , que é um polímero sintético, foi utilizado como material de referência, devido ao seu intenso sinal Raman, para calibração do sistema e para otimizar a SNR dos espectros. A Figura 2.17 mostra o espectro Raman do poliestireno, como os picos utilizados na calibração identificados, que estão em concordância com os relatados em estudos anteriores [49].



**Figura 2.17** Espectro Raman do poliestireno.

### 3 PINÇA ÓPTICA

#### 3.1 INTRODUÇÃO

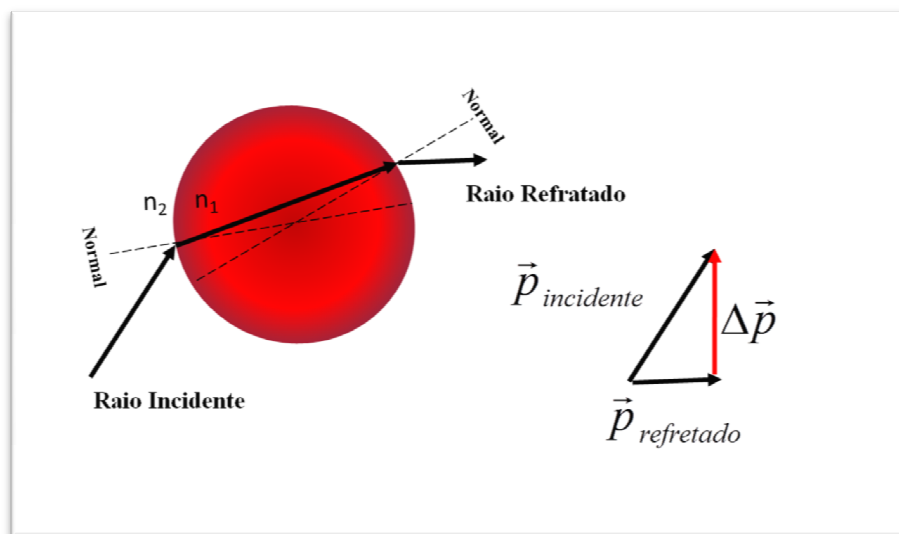
Estudos envolvendo pinças ópticas têm recebido muita atenção na pesquisa contemporânea, particularmente nas ciências biomédicas [14-21, 50-54]. Sua habilidade de aprisionar e manipular células individuais com alta precisão a torna uma ferramenta muito versátil, que tem sido utilizada em uma ampla gama de experimentos em biologia, como por exemplo, para criar células híbridas e para introduzir material genético e moléculas dentro de células [55], em microcirurgias [56]. A capacidade de aplicar e medir as forças da ordem de piconewtons tem possibilitado o estudo do DNA e as suas propriedades [57-59]. Apesar de muito pequenas, são forças consideráveis para partículas microscópicas. Por esse motivo sua principal aplicação é no mundo microscópico, especialmente no estudo de células e organelas que podem ser manipuladas individualmente sem qualquer dano térmico. Inicialmente, o uso de laser na região do visível causava danos aos organismos vivos levando-os à morte celular, devido ao alto coeficiente de absorção de radiação no comprimento de onda visível. Passaram-se assim a utilizar lasers Nd:YAG na região infravermelha, com  $\lambda = 1064$  nm. Como a maioria das substâncias que compõem o ser vivo é transparente ao infravermelho, a absorção nessa região é pequena e o pouco calor gerado é rapidamente transferido ao fluido por condução e convecção, consequentemente não há danos térmicos nesses organismos.

O aprisionamento óptico de objetos de escala micrométrica cresceu, nos últimos anos, mais que o aprisionamento de átomos [60] e objetos dielétricos menores do que o comprimento de onda do laser de excitação [61], tornando-se uma peça fundamental, em conjunto com técnicas espectroscópicas como, por exemplo, fluorescência e Raman, na construção de imagens e em estudos de células e microorganismos flagelados.

Os fundamentos da armadilha óptica de partículas de dimensão menor que o comprimento de onda da radiação incidente, no chamado regime de Rayleigh, onde as partículas estão sujeitas a uma força de dispersão, devido à pressão de radiação e um gradiente de força devido à força de Lorentz sobre um dipolo, estão bem descritos na Ref. [62]. Neste capítulo serão abordados os princípios de operação da pinça óptica, quando a partícula aprisionada for maior que o comprimento de onda da luz utilizada, no chamado regime de Mie, onde o argumento de raios ópticos pode ser utilizado [63], como será visto na próxima seção.

### 3.2 FUNDAMENTOS DA PINÇA ÓPTICA

O princípio de operação de uma pinça óptica, como discutido anteriormente, sob uma abordagem mais qualitativa do fenômeno, pode ser entendido através da óptica geométrica (aplicada apenas quando  $r \gg \lambda$ , onde  $r$  é o raio da partícula e  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação eletromagnética incidente). Então, considere que ao atravessar uma partícula com um índice de refração maior que o meio ao seu redor,  $n_1 > n_2$ , a luz será desviada se aproximando da normal, na primeira interface, e se afastando da normal, na segunda interface, segundo a lei de Snell da refração. Considerando o fóton como uma partícula que transporta momento  $|\vec{p}| = h\nu/c$ , a trajetória dos raios, ao atingir um obstáculo, muda sua direção de propagação. Isso resulta em uma mudança no momento da fóton, como se fosse uma colisão entre partículas, como mostrado na Figura 3.1. Pela Lei da Ação e Reação (3ª Lei de Newton), a partícula está sujeita a uma força de mesma intensidade, porém de sentido contrário.

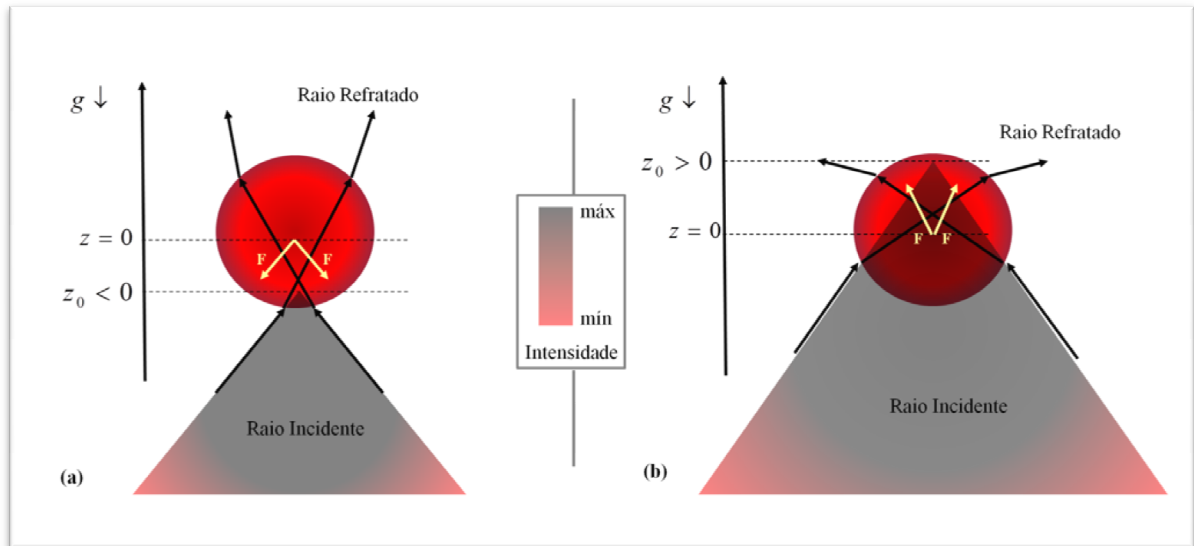


**Figura 3.1** Espalhamento, no regime da óptica geométrica, entre um fóton e uma partícula espalhadora, no caso em que o índice de refração da partícula,  $n_1$ , é maior que o índice de refração do meio,  $n_2$ . Modificado de [64].

Se os raios de luz são focalizados, então essa força resultante poderá se igualar ou até superar outras forças externas, como a Força Gravitacional por exemplo, fazendo com que essa partícula se mantenha imóvel, no ponto focal, no referencial desse feixe de luz.

Nesta tese será abordado sempre o caso onde o índice de refração do objeto aprisionado,  $n_1$ , é maior que o índice de refração do meio ao seu redor,  $n_2$ . Para entender como um único feixe altamente focalizado é capaz de aprisionar uma partícula, serão analisadas as trajetórias

de dois raios simétricos, de mesmas intensidades, que se encontrariam com o eixo  $z$  na posição  $z_0$  se não sofressem desvio devido à partícula, conforme pode ser visto na Figura 3.2.

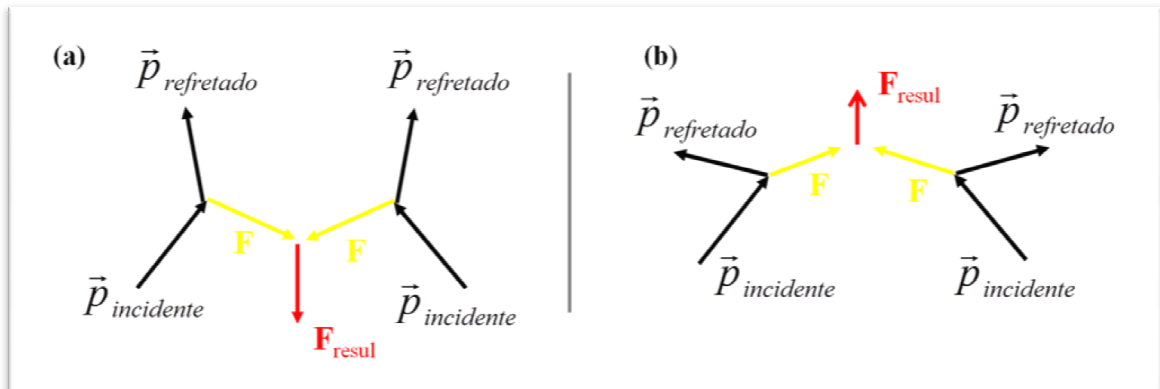


**Figura 3.2** Trajetórias de dois raios simétricos, de mesmas intensidades, que se encontrariam com o eixo  $z$  na posição  $z_0$  se não sofressem desvio devido à partícula, com  $z_0$  (a) abaixo e (b) acima do centro da partícula. Modificado de [64].

Supondo uma partícula espalhadora cujo eixo vertical,  $z$ , tem a mesma direção de propagação do feixe laser, e sentido oposto à gravidade. Desta forma, a posição do foco laser,  $z_0$ , pode ser positiva,  $z_0 > 0$ , ou negativa,  $z_0 < 0$ . Para  $z_0 < 0$ , a trajetória dos raios focalizados na partícula será como mostra a Figura 3.2(a), e para  $z_0 > 0$ , será como na Figura 3.2(b).

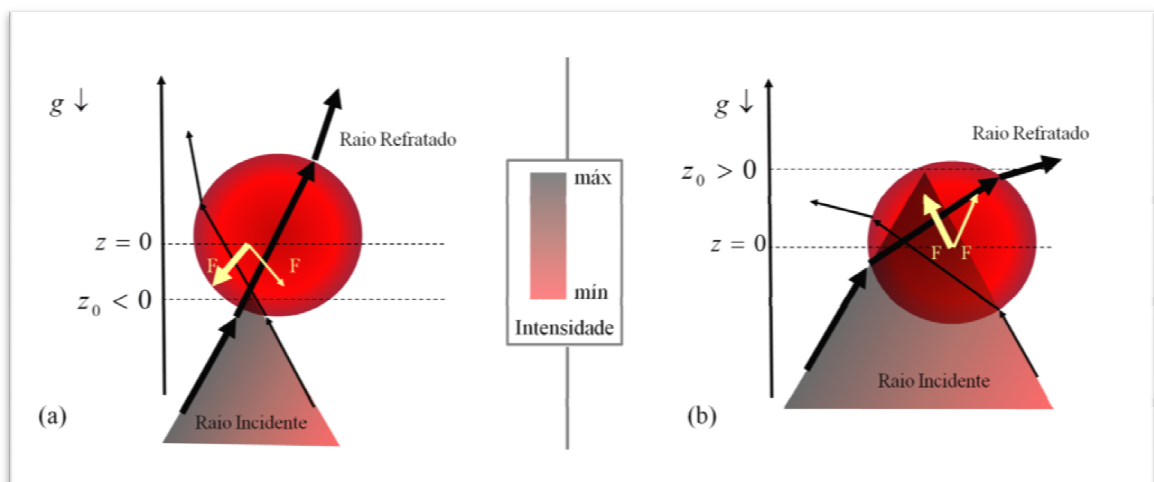
A força resultante sobre a partícula,  $\vec{F}_{resul}$ , que tem mesma direção porém sentido contrário ao da força exercida sobre o fóton, é proveniente da variação entre o momento do fóton incidente,  $\vec{p}_{incidente}$ , e o momento do fóton refratado,  $\vec{p}_{refratado}$ , como pode ser observado na Figura 3.3.





**Figura 3.3** Direção da força resultante, sobre uma partícula no regime da óptica geométrica, gerada por um feixe altamente focalizado, que se encontrariam com o eixo  $z$  na posição  $z_0$ , se não sofressem desvio devido à partícula, para  $z_0$  (a) abaixo e (b) acima do centro da partícula. Fonte: Arquivo do autor

Considerando que os raios analisados na Figura 3.2, que se encontrariam com o eixo  $z$  na posição  $z_0$  se não sofressem desvio devido à partícula, não são mais simétricos, ou seja, possuem intensidades diferentes, conforme pode ser visto na Figura 3.4. Neste caso, o feixe laser focalizado na partícula não é perfeitamente gaussiano e/ou seu centro não coincide exatamente com o centro da focalização.

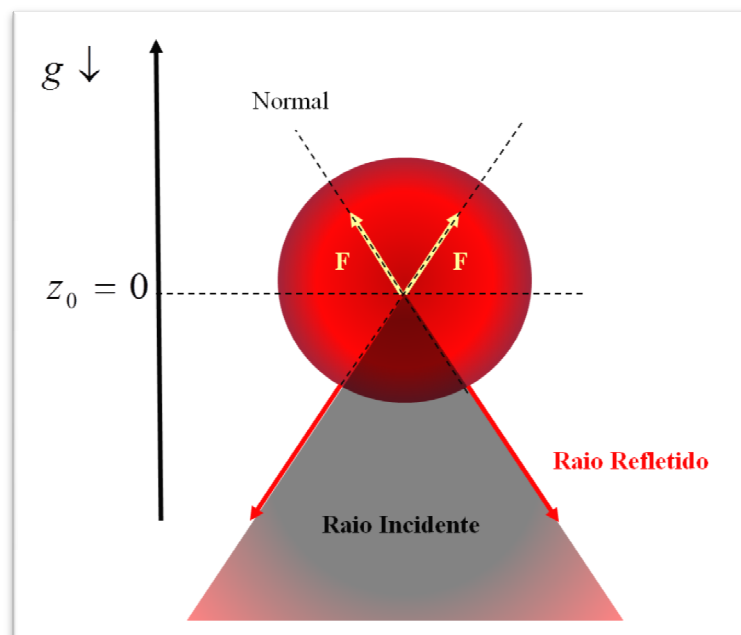


**Figura 3.4** Trajetórias de dois raios antissimétricos à esquerda, e de intensidades diferentes, que se encontrariam com o eixo  $z$  na posição  $z_0$  se não sofressem desvio devido à partícula, com  $z_0$  (a) abaixo e (b) acima do centro da partícula. Modificado de [65].

Na Figura 3.4(a), a partícula é aprisionada na armadilha e experimenta uma força resultante para baixo e para a esquerda, no sentido do centro do feixe, e na Figura 3.4(b), a partícula é ligeiramente deslocada para cima e para a esquerda, e também sofre a ação de uma força resultante na direção do centro do feixe.

Nota-se que as componentes horizontais não se anulam nesse caso e a força resultante sobre a esfera, independente se  $z_0 < 0$  ou  $z_0 > 0$ , também é sempre tendendo a trazer o centro da partícula para o foco do laser.

Voltando para na Figura 3.2, verifica-se que no caso  $z_0 = 0$ , considerando-se apenas os raios incidentes e refratados, tem-se  $\vec{p}_{refratado} = \vec{p}_{incidente}$  e, a força resultante sobre a partícula seria nula, como pode ser observado na Figura 3.3. No entanto, associado à refração que desvia a trajetória dos raios, sempre existe uma reflexão cuja intensidade para incidência normal é dada por  $R = [(n_2 - n_1) / (n_2 + n_1)]^2$ . Os fótons refletidos tendem a expulsar a esfera do foco do laser conforme mostra a Figura 3.5. Dessa forma, a reflexão gera uma força que se contrapõe à força restauradora da pinça óptica. Normalmente a reflexão é muito menor que a transmissão, mas conforme a diferença entre os índices de refração aumenta, o papel da reflexão será cada vez mais significativo, impedindo a operação da pinça óptica quando  $n_1 \gg n_2$ .



**Figura 3.5** Efeito da reflexão na força óptica. Modificado de [64].

Outro efeito que também pode impossibilitar a captura de uma partícula pela pinça óptica é a absorção. Isso pode acontecer de forma direta, por transferência de momento do fóton, expulsando a partícula do foco do laser. Também pode acontecer de forma indireta, através do calor gerado pela absorção do fóton, que também tende a expulsar a partícula do foco do laser. Quando aparece um gradiente de temperatura assimétrico entre amostra e o meio externo, as moléculas do fluido que atingem a superfície da partícula adquirem maior

velocidade por aumento de temperatura e são relançadas, transferindo a diferença de momento para a partícula.

Resumidamente, o efeito da refração é deslocar o centro da esfera para o foco do feixe (força de gradiente). Por outro lado, o efeito da reflexão é empurrar a esfera no sentido da incidência do raio (pressão de radiação). A competição entre estes dois efeitos é que faz com que a esfera fique presa com seu centro próximo ao foco do feixe

A alta densidade de fótons necessária para o aprisionamento óptico pode ser criada por um raio laser focalizado por uma lente objetiva de um microscópio. Para obter um gradiente suficientemente acentuado é necessária uma objetiva com alta abertura numérica (N.A.). Objetivas com grandes N.A. fornecerão uma armadilha mais forte, no entanto suas distâncias de trabalho (W.D.) reduzidas irão diminuir a profundidade em que a armadilha pode ser criada. Pode-se verificar a ordem de grandeza dessa força através de uma superestimativa. Para isso, considere os dois limites: o feixe laser é completamente absorvido pela partícula, com a força neste caso sendo  $F = P_{ot}/c$ ; e o laser é totalmente refletido, com a força dada por  $F = 2P_{ot}/c$ . Supondo um feixe de laser CW, unidirecional, e com 100 mW de potência, e  $c$  a velocidade da luz no vácuo. Neste caso, a força será da ordem de:

$$\frac{100 \cdot 10^{-3} W}{3 \cdot 10^8 m/s} \approx 300 pN < \mathbf{F} < 600 pN \approx \frac{200 \cdot 10^{-3} W}{3 \cdot 10^8 m/s}$$

Na prática, as forças que uma pinça óptica exerce sobre uma partícula são da ordem de femto a pico Newtons. Supondo uma partícula esférica de poliestireno de  $10 \mu m$  de diâmetro, com densidade  $\rho = 1050 kg/m^3$ . A força peso,  $\mathbf{P}$ , dessa partícula será da ordem de:

$$\mathbf{P} = 1050 \frac{kg}{m^3} \cdot \frac{4\pi}{3} (5 \cdot 10^{-6})^3 m^3 \cdot 10 \frac{m}{s^2} \cong 5,5 pN$$

A análise apresentada nos permite entender, do ponto de vista qualitativo, como um único feixe de laser pode capturar uma partícula, inclusive se opondo à gravidade. Uma abordagem quantitativa mais detalhada envolvendo essas forças é realizada nas Refs. [64] e [66].

### 3.3 SISTEMA EXPERIMENTAL

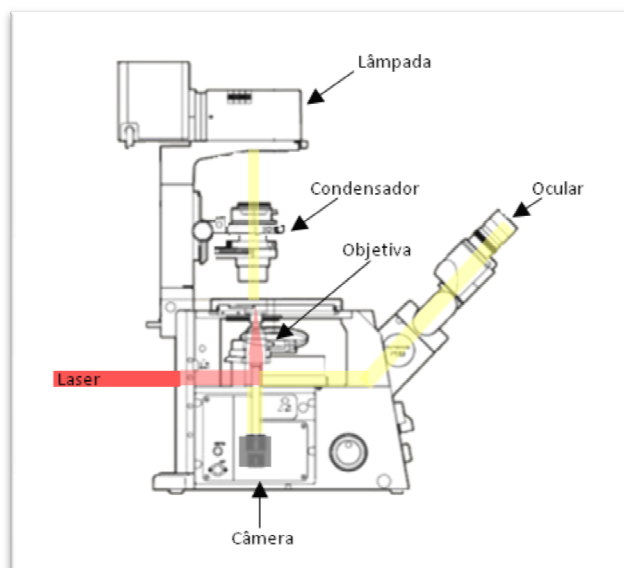
Nesta seção será descrita a importância dos principais componentes do sistema experimental da pinça óptica: o laser; o microscópio; a objetiva e o telescópio.

A escolha do laser para aplicações da pinça óptica, destinadas ao estudo de sistemas biológicos vivos, precisa evitar principalmente comprimentos de onda,  $\lambda$ , do laser para o qual a amostra apresente grande absorção. Desta forma, previne-se dos danos térmicos que podem

levam à morte em pouco tempo [20]. Muitas substâncias orgânicas apresentam alta absorção na região visível do espectro, que é onde encontram as ressonâncias eletrônicas dos elétrons de valência. A absorção dos modos vibracionais tende a ocorrer no infravermelho mais longínquo, deixando uma janela no infravermelho próximo com pouca absorção. Um dos principais objetivos da pinça óptica, durante o estudo de partículas biológicas vivas, é capturar sem danificá-las termicamente, para tanto, a ideia é utilizar lasers com comprimentos de onda na região do NIR [61].

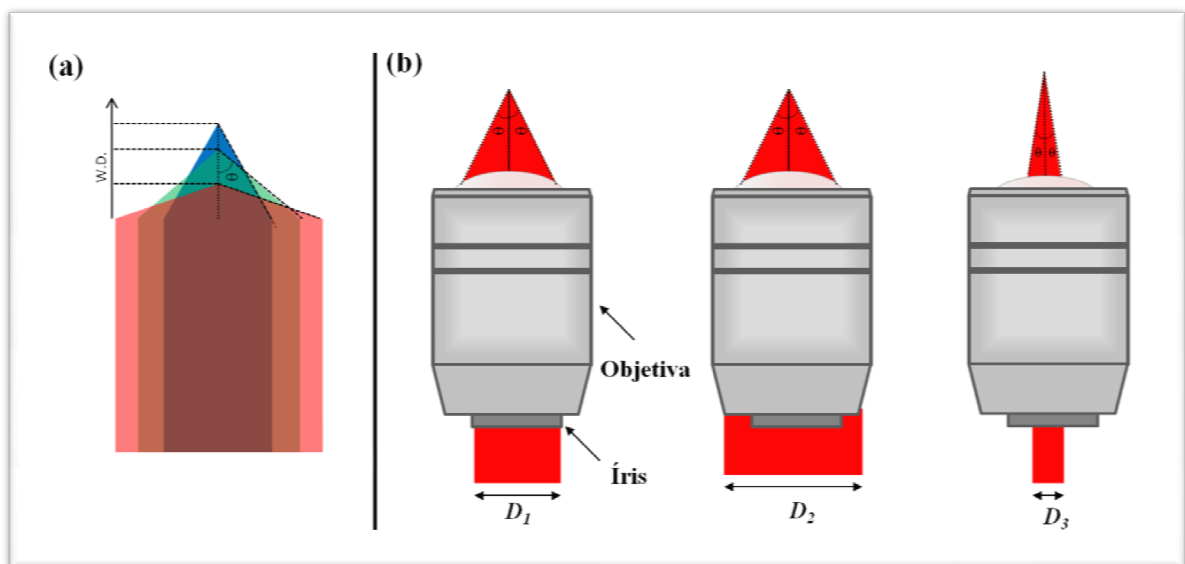
Outra componente importante para a montagem experimental da pinça óptica é o microscópio óptico. A maioria dos microscópios ópticos modernos, inclusive o utilizado nesta tese, utiliza a geometria invertida representada na Figura 3.6, que apresenta algumas vantagens sobre o microscópio tradicional, o ‘upright’. Nele, a luz é gerada por uma lâmpada acima do plano da amostra e, ao passar pelo condensador, incide no espécime, antes de ser coletada pela objetiva. A imagem do espécime é, então, enviada à ocular e/ou uma câmera digital para análise. O laser, no entanto, entra por baixo, e ao passar através da objetiva é focalizado sobre a amostra.

Uma vantagem do uso do microscópio invertido em relação ao ‘upright’, é o espaço considerável que há entre a lamínula, que contém a amostra em estudo, e o condensador, o qual nos propicia trabalhar com câmaras abertas que é bastante desejável para estudos com aplicações biológicas ou também quando a experiência requer o uso de micromanipuladores.



**Figura 3.6** Esquema do microscópio invertido. Modificado de [67].

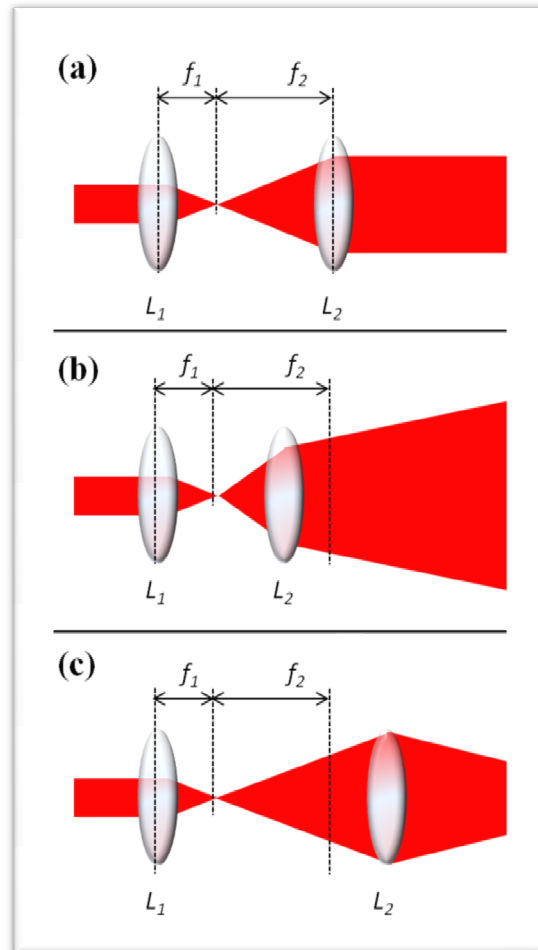
Entre os principais parâmetros da objetiva, responsável por gerar a alta densidade de fótons capazes de gerar a armadilha óptica, temos a abertura numérica,  $N.A.$ , e a distância de trabalho,  $W.D.$ . A abertura numérica é definida como o ângulo,  $\theta$ , do cone de luz na saída na objetiva.  $N.A. = n \cdot \text{sen}(\theta)$ , onde  $\theta$  é a abertura angular de um cone de luz que atravessa uma objetiva e  $n$  é o índice de refração do meio. A abertura numérica e a distância de trabalho estão intrinsecamente relacionadas. Quanto maior for a  $N.A.$ , maior é o ângulo de abertura do cone de luz formado e menor a  $W.D.$ , como mostrado na Figura 3.7(a). Desta forma, para podermos utilizar as objetivas de grande abertura numérica utilizamos uma lamínula com espessura entre 0,13 e 0,17 mm respeitando assim os pequenos valores de distâncias de trabalho. As objetivas de amplificação 60X são bastante utilizadas em pinças ópticas por terem uma ótima relação entre  $N.A.$  e  $W.D.$



**Figura 3.7** (a) Relação entre a abertura numérica e a distância de trabalho. (b) Relação entre abertura numérica efetiva comparada ao diâmetro do feixe. Fonte: Arquivo do autor.

Um feixe com diâmetro igual ao da íris da objetiva será focalizado, com máxima eficiência, com a  $N.A.$  nominal informada pelo fabricante, como no caso do feixe de diâmetro  $D_1$  da Figura 3.7(b). Se o diâmetro do feixe for maior que o da íris da objetiva, como no caso do feixe de diâmetro  $D_2$ , a  $N.A.$  será a mesma que no caso anterior, no entanto, ocorrerá uma diminuição na intensidade que será tão maior quanto for o diâmetro do feixe. Já no caso do diâmetro do feixe ser menor que o da íris da objetiva, como por exemplo, o diâmetro  $D_3$  da Figura 3.7(b), o feixe será focalizado com  $N.A.$  menor do que a nominal informada pelo fabricante. Para isso o uso do telescópio também é importante. O telescópio é um sistema de

duas lentes colocadas uma no foco da outra que nos permite expandir (ou reduzir) o diâmetro do feixe laser, além de ser utilizado para controlar a profundidade  $z$  em que o laser é focalizado conforme ilustra a Figura 3.8.



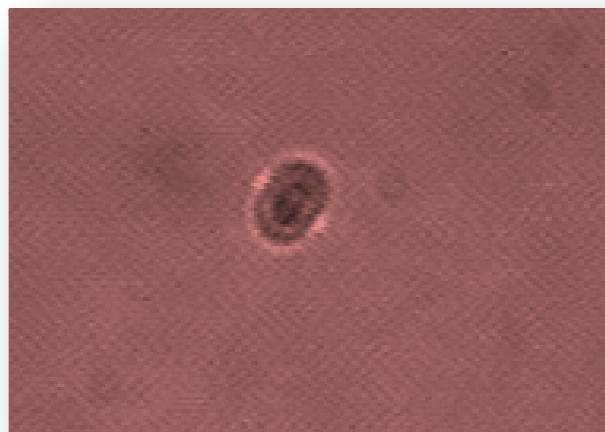
**Figura 3.8** Esquema de um telescópio.  $L_1$  e  $L_2$  são lentes convergentes de distâncias focais  $f_1$  e  $f_2$ , respectivamente. Fonte: Arquivo do autor.

### 3.3.1 O ALINHAMENTO DA PINÇA ÓPTICA

Para um bom funcionamento da pinça óptica, é necessário que os elementos citados anteriormente estejam ajustados de forma a maximizar a eficiência do sistema. Alguns procedimentos já conhecidos na literatura ajudaram para o alinhamento da pinça óptica no microscópio [64]. O laser precisa incidir perpendicularmente na objetiva, quando isto acontecer veremos um padrão simétrico de círculos concêntricos, no plano focal do microscópio, que irá abrir e fechar uniformemente, com o centro numa posição fixa, conforme movemos o ajuste focal da objetiva.

Uma vez que garantimos que o laser incide perpendicular na objetiva, introduzimos o telescópio. Uma lente por vez, de tal forma que o centro do círculo não seja deslocado. Para isso, antes de inserirmos a primeira lente, utilizamos uma íris, de mesmo diâmetro do feixe, de tal forma que o feixe passe exatamente pelo seu centro. Utilizamos um sistema de translação  $xy$  fixado à lente para ajustá-la de tal forma que o feixe continue passando pelo centro da íris. Repetimos o mesmo procedimento para a segunda lente, com um translador  $xyz$  acoplado a ela. O ajuste no eixo  $z$ , agora, nos permite colocar o foco do laser no plano de visão do microscópio, de tal forma que movendo a segunda lente do telescópio apenas na direção  $z$ , devemos ver esse círculo abrindo e fechando, como mostram as Figuras 3.8(b) e 3.8(c), respectivamente. Isso nos permite encontrar a distância  $z$  para o menor ponto focal do laser e, desta forma, a captura ocorrerá bem próxima do plano de visão do microscópio. A utilização de lentes com distâncias focais bem curtas ajuda a ganhar sensibilidade. Ou seja, um pequeno deslocamento entre as lentes, da ordem de milímetros, com um translador micrométrico  $xyz$  terá um efeito apreciável na posição do foco do laser. Fica difícil manter o alinhamento quando é necessário mover a lente por vários centímetros até encontrar o foco.

Após capturar-se uma partícula, ao mover o foco da objetiva do microscópio para cima, pode-se elevá-la ligeiramente em direção à superfície da solução de forma a isolá-la das outras partículas que gradativamente vão se depositando no fundo da lamínula. Por fim, pode-se obter um ajuste mais preciso da posição relativa entre as lentes do telescópio, movendo-se uma das lentes na direção  $z$  até obter uma imagem bem focalizada, como mostra a Figura 3.9, de uma hemácia aprisionada pela pinça óptica.



**Figura 3.9** Hemácia aprisionada pela pinça óptica.

## **4 APLICAÇÃO**

### **4.1 INTRODUÇÃO**

Estudos espectroscópicos podem fornecer, por exemplo, importantes percepções sobre a evolução temporal de um sistema quimicamente dinâmico. Pinças ópticas têm sido amplamente utilizadas em associação com a Espectroscopia Raman, a fim de obter informações precisas sobre as alterações bioquímicas de uma única célula [17, 18, 51, 53, 68]. Uma das maiores vantagens do acoplamento da pinça óptica com a espectroscopia é que agregando microanálise à pinça óptica, pode-se analisar a composição e metabolismo de uma única célula, inclusive de células vivas em movimento. No entanto, devido ao alto fluxo de fótons dentro das armadilhas ópticas, consideráveis danos ópticos podem ser infligidos às células presas devido aos fótons absorvidos por estas células.

Neste capítulo, a pinça óptica foi utilizada, através da associação à espectroscopia Raman, para estudar os danos ópticos causados pelo laser, durante o aprisionamento, às hemácias isoladas. O trabalho, desenvolvido nesta tese, associa um sistema de microespectroscopia Raman a uma pinça óptica para a avaliação multidimensional dos danos causados às hemácias após longa exposição à radiação laser. Para isso utilizamos um algoritmo de caracterização de espectros Raman desenvolvido na plataforma Matlab, que nos possibilitou o monitoramento da dinâmica temporal das intensidades e das posições dos picos nos espectros Raman simultaneamente. Uma caracterização da fotodegradação das hemácias aprisionadas opticamente foi realizada, para diferentes intensidades do feixe laser, através do monitoramento dos espectros Raman.

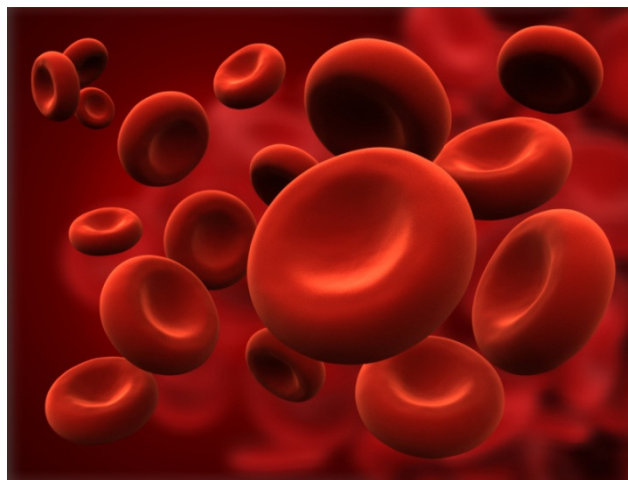
### **4.2 A HEMÁCIA**

O sangue, que tem como principal função a manutenção da vida do organismo, tem aproximadamente 45% do seu volume total ocupado por glóbulos vermelhos. Em seres humanos adultos, isso representa cerca de  $4,5$  a  $6,0 \times 10^6$  glóbulos vermelhos/mm<sup>3</sup> de sangue [69]. Os glóbulos vermelhos são produzidos na medula vermelha dos ossos longos, a qual se encontra sob o controle da eritropoetina produzida pelos rins. Originam-se dos hemocitoblastos (células-mãe), cuja divisão celular simples gera outros novos hemocitoblastos, e que gradativamente começam a se diferenciar, podendo ser encontrados em diferentes estágios de maturação. Seu núcleo vai reduzindo de tamanho e em seu



citoplasma vão aparecendo cada vez mais moléculas de hemoglobina. Quando os hemocitoblastos chegam a essa fase, são denominados eritroblastos. O processo de diferenciação celular dá sequência nos eritroblastos, que se transformam em células globulares sem núcleo, também conhecidas como hemácias.

As hemácias, como mostradas na Figura 4.1, são vermelhas devido à grande quantidade de moléculas de hemoglobina presentes. Em seu estado normal, de repouso, assumem a forma de um disco bicôncavo ou discócito [70], com diâmetro e espessura médios de 8  $\mu\text{m}$  e 2  $\mu\text{m}$ , respectivamente.



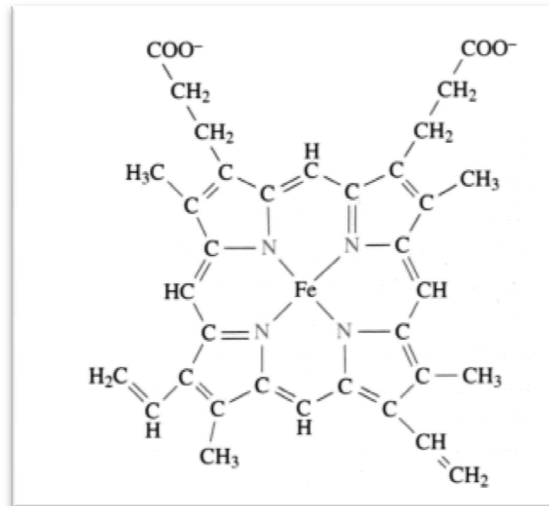
**Figura 4.1** Hemácias de ser humano. [71]

A estrutura das hemácias é projetada para otimizar o trânsito através da microvasculatura, com a finalidade de trocar oxigênio. A membrana celular do eritrócito é uma estrutura flexível, constituída por uma bicamada lipídica que contém proteínas integrais. Estas proteínas ancoram a membrana a um esqueleto proteico subjacente, que mantém a forma discoidal bicôncava da célula. Esta forma otimiza a passagem da célula pela circulação e facilita as trocas gasosas através do endotélio capilar. As vias metabólicas ativas nas hemácias também sustentam a função de troca gasosa. Em seu ciclo natural, as hemácias vivem em nosso organismo por até 120 dias, tendo sua fase terminal no baço.

No caso das hemácias, particularmente, a maioria das bandas Raman observadas nos espectros são provenientes da hemoglobina intracelular, pois 98% das proteínas presentes no proteoma citoplasmático das hemácias são hemoglobina [72]. Desta forma, quando se obtém o espectro Raman de hemácias, a assinatura da hemoglobina prevalece sobre todas as outras proteínas.

### 4.2.1 A HEMOGLOBINA

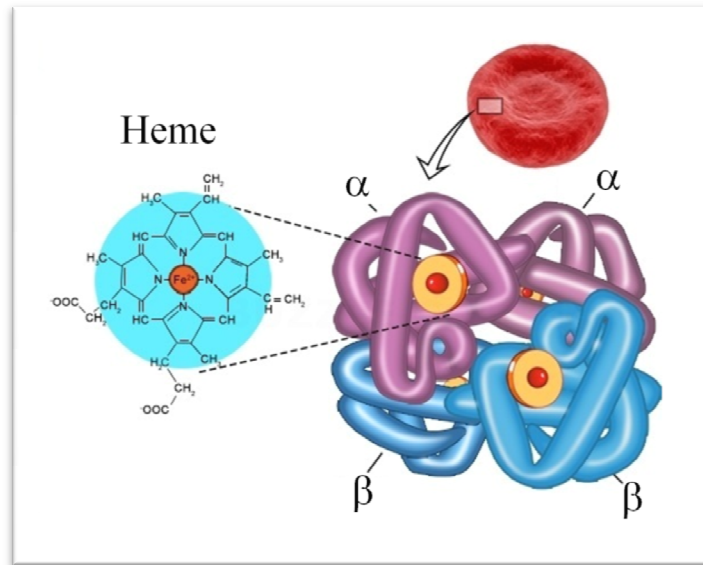
A hemoglobina, que é esférica, é composta por 4 cadeias de globina, cada uma com um grupo heme, a ferroprotoporfirina IX mostrada na Figura 4.2, ligado de forma covalente a um sítio em sua cadeia [73].



**Figura 4.2** Grupo heme da hemoglobina, a ferroprotoporfirina IX. [74]

As globinas, que inicialmente associam-se em pares, dímeros e depois em quatro cadeias, formando os tetrâmeros [75], constituem a maior porção da molécula da hemoglobina, e estão presentes de quatro formas diferentes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ou  $\delta$ ) [76]. O grupo heme, que é formado na mitocôndria dos eritroblastos a partir dos aminoácidos glicina e ácido succinico, é constituído por quatro anéis pirrólicos, ligados entre si por um átomo de ferro, no estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ), tendo à periferia 4 radicais metil ( $-CH_3$ ), 2 radicais vinil ( $-CH-CH_2$ ) e 2 radicais propionil ( $-CH_2-CH_2-COO^-$ ) em arranjos diferentes.

A principal hemoglobina do adulto, a hemoglobina A, que representa cerca de 98% da hemoglobina na hemácia, é formada a partir de duas cadeias  $\alpha$  (cada uma contendo 141 aminoácidos) e duas cadeias  $\beta$  (contendo 146 aminoácidos cada), é representada como  $\alpha_2\beta_2$ , como mostrado na Figura 4.3.

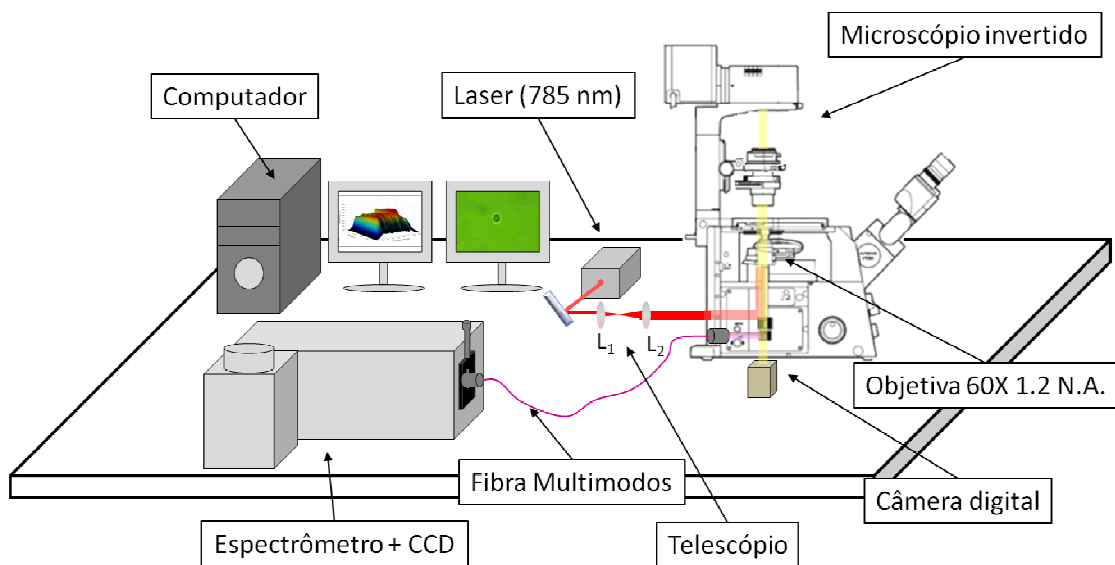


**Figura 4.3** Estrutura da hemoglobina A, representada como  $\alpha_2\beta_2$ . Modificado de [77]

Os dois componentes, heme e globina, promovem funções importantes: o grupamento heme acomoda o átomo de ferro funcional, capaz de ligar reversivamente ao  $O_2$ ; e a globina protege o ferro contra oxidação em um ambiente hidrofóbico e permite a solubilidade da molécula em água [78]. A hemoglobina é capaz de transportar oxigênio,  $O_2$ , através do íon  $Fe^{2+}$ , numa quantidade superior a vinte vezes seu volume, fazendo com que a hemácia chegue a se alongar em até 230% da sua dimensão original. A perda ou diminuição dessa capacidade de deformação leva a uma retirada prematura das hemácias da circulação sanguínea e, conseqüentemente, à diminuição da oferta de oxigênio aos tecidos. A methemoglobina, a forma oxidada da hemoglobina, que ocorre quando o  $Fe^{2+}$  do grupo heme passa para sua forma férrica ( $Fe^{3+}$ ), perde sua capacidade de combinar-se com o  $O_2$ , diminuindo também a oferta de oxigênio aos tecidos e, conseqüentemente, causando danos ao organismo. Neste caso, a presença da methemoglobina na corrente sanguínea diminui a capacidade de transporte de oxigênio, por não se ligar ao  $O_2$ , e aumenta a afinidade do  $O_2$  pelo  $Fe^{3+}$  do grupo heme, o que dificulta a liberação de oxigênio aos tecidos. Sua concentração aumentada no sangue pode levar ao óbito. Por apresentarem diferentes composições moleculares, por exemplo, a hemoglobina e a methemoglobina podem ser identificadas pela espectroscopia Raman.

### 4.3 SISTEMA DE MICROESPECTROSCOPIA RAMAN COM PINÇA ÓPTICA

A montagem experimental, do sistema de microespectroscopia Raman desenvolvido nesta tese, mostrado na Figura 4.4, utiliza um laser de diodo (CrystaLaser) de onda contínua na região do infravermelho, 785 nm, para aprisionar e excitar as células estudadas. Ao passar por um telescópio com lentes  $L_1$  e  $L_2$  com distâncias focais de  $f_1 = 12,5$  e  $f_2 = 100$  mm respectivamente, separadas por uma distância de  $\approx f_1 + f_2$ , o diâmetro do feixe laser é expandido aproximadamente 8 vezes. Além disso, o telescópio pode ser utilizado para controlar a profundidade  $z$  em que o laser é focalizado. O feixe expandido, ao chegar ao microscópio invertido (OLYMPUS IX71), e utiliza a abertura numérica nominal de sua objetiva 60X, 1,2 N.A. e 0,28 mm W.D. (Olympus UPLSAPO 60WX), de imersão em água, produzindo um feixe de luz capaz de aprisionar as hemácias. Um filtro passa banda centrado em 785 nm (Chroma bp 785) foi utilizado para obter uma banda espectral mais estreita do laser.



**Figura 4.4** Sistema experimental de microespectroscopia Raman com pinça óptica. Fonte: Arquivo do autor.

As imagens de transmissão das células foram geradas a partir de uma lâmpada de mercúrio (Olympus U-LH 100 HGAPO) acima do plano da amostra, que ao passar pelo condensador incide no espécime, antes de ser coletada pela objetiva, e finalmente enviada à porta lateral esquerda do microscópio, onde havia uma câmera digital, que permitia a visualização em tempo real. O laser, no entanto, entrava por baixo do plano da amostra, e ao atravessar o filtro passa banda, incidia na objetiva e era focalizado sobre a amostra. O ponto

luminoso, limitado por difração, produzido pela objetiva tinha uma intensidade máxima de 22 mW na amostra, capaz de prender a célula. Diferentes filtros de densidade neutra foram associados ao sistema para variar a potência do laser incidente na amostra. A intensidade mínima utilizada foi 2 mW, na amostra.

A luz a partir das células individuais, proveniente do espalhamento Raman Stokes, foi coletada pela mesma objetiva e direcionada para a porta lateral direita do microscópio por um filtro dicróico (785 long-pass filter, Chroma) onde o sinal Raman foi acoplado a uma fibra óptica multimodos, (Thorlabs, ASF 50/125Y) com um núcleo de  $50\mu\text{m}$  de diâmetro, e enviado para um espectrômetro (PRINCETON INSTRUMENTS ACTON SP2300i), que dispersa a luz para uma câmera CCD retroiluminada (PI/Acton, PIXIS 100) com  $1340 \times 100$  pixels. O sistema não permitia a detecção simultânea das imagens por transmissão e da emissão Stokes, de tal forma que uma vez que a célula era aprisionada pela pinça, trocava-se a porta de detecção, da esquerda para a direita, para obter os espectros Raman.

#### **4.3.1 AMOSTRAS CONTENDO HEMÁCIAS**

Para a preparação das amostras contendo hemácias, coletou-se sangue, por punção venosa, de voluntários adultos saudáveis utilizando tubos EDTA para armazenagem. Esses tubos contém o EDTA na sua parede interna, que é o anticoagulante recomendado para hematologia, por ser o melhor para preservar a morfologia celular. Todas as hemácias utilizadas em nossos estudos originam-se de 5 diferentes doadores voluntários. Todos são adultos saudáveis, e com idades entre 25 a 35 anos.

Instantes antes das medições diluía-se o sangue em DPBS (Dulbecco Phosphate-Buffered Salina). O DPBS é uma solução tampão que mantém o meio de cultura de células em seu pH fisiológico. É muito utilizado para diluir as células, mantendo a tonicidade e viabilidade celular. Também mantém a osmolaridade do meio suspenso e inibe a aderência das células nas lamínulas de vidro. Grandes diluições das células na solução tampão (~ 250.000 vezes) foram usadas nos experimentos de forma a assegurar que todas as medições fossem originadas de uma única célula e para reduzir a chance de outras células suspensas, flutuantes na amostra, interferissem na armadilha óptica durante os longos tempos de medição utilizados em nosso estudo.

#### 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para cada hemácia estudada, foram adquiridos espectros Raman em série (~ 200 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ ) continuamente, por aproximadamente 40 minutos. As várias células utilizadas no estudo foram medidas para potências do laser de 22 mW, 13 mW, 10 mW, 4,5 mW e 2 mW, com tempos de integração para espectros individuais de 5 s, 10 s, 15 s, 35 s e 50 s, respectivamente. Cada célula foi medida apenas uma vez, e repetimos a experiência dez vezes para cada potência, num total e 50 diferentes hemácias analisadas neste estudo, e 10 mil espectros como mostra a Tabela 4.1 abaixo:

**Tabela 4.1** Procedimento de aquisição dos espectros Raman em série no estudo da dependência do dano fotoquímico em função da potência do laser.

<b>Potência do Laser (mW)</b>	<b>Tempo de integração (s)</b>	<b>Número de espectros em série / hemácia</b>	<b>Total de espectros / hemácias</b>
22	5	480 / 1	4.800 / 10
13	10	240 / 1	2.400 / 10
10	15	160 / 1	1.600 / 10
4,5	35	70 / 1	700 / 10
2	50	50 / 1	500 / 10
			<b><math>\Sigma = 10.000 / 50</math></b>

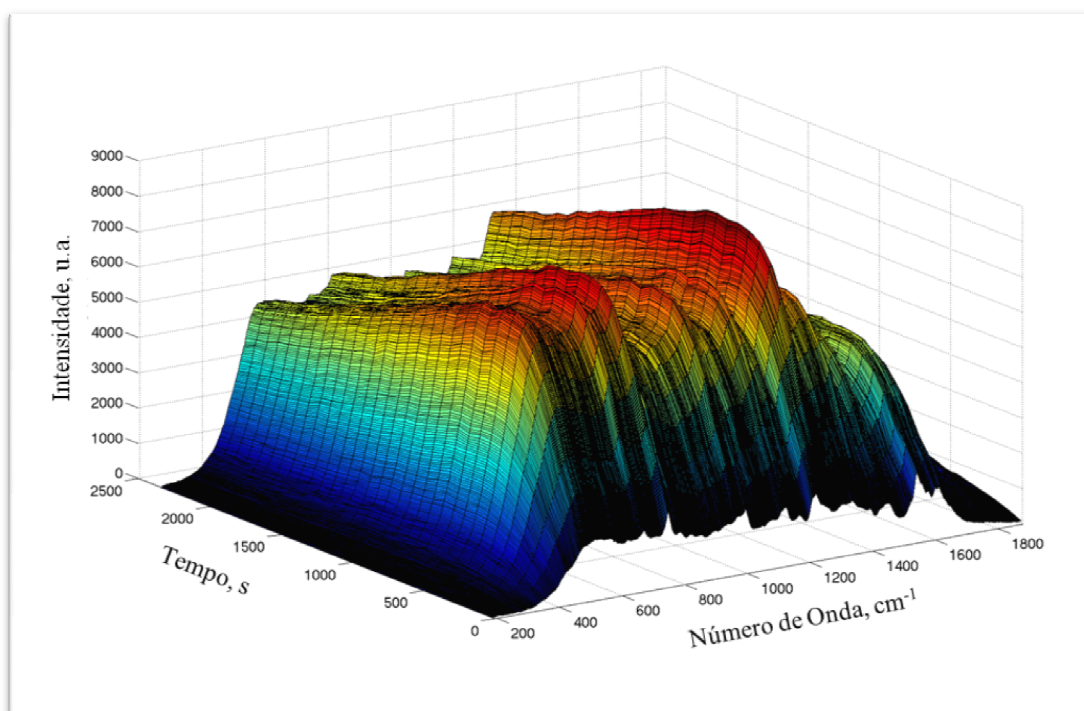
Para monitorar as dinâmicas dos espectros com grande precisão, foi utilizada uma técnica de ajuste de curva espectral, o LADS (Localization Analysis of Dynamic Spectra). Esta técnica, descrita em detalhes na ref. [79], realiza todo o processamento de dados na plataforma Matlab (The Mathworks, Natick, MA), e possibilita a determinação da posição, largura, e altura dos picos dos espectros, sendo capaz de processar múltiplos picos simultaneamente através de uma localização aproximada do pico como parâmetro de entrada [\*].

Durante o processamento dos dados, os espectros adquiridos através do software WINSPEC foram convertidos do formato binário da câmera (.SPE) para um arquivo de texto delimitado por tabulação (.xls). Cada espectro foi ajustado na região espectral desejada com os parâmetros das curvas definidos pelo usuário. Cada região do espectro teve seu ajuste por uma curva Gaussiana, com o número de picos a ser determinado com base no conhecimento a priori do espectro da amostra. Os ajustes dos picos aconteceram para um grande número de espectros em série que variam no tempo, permitindo monitorar quaisquer alterações no espectro Raman com elevada precisão e confiança. O monitoramento de alta

[\*] APÊNDICE A

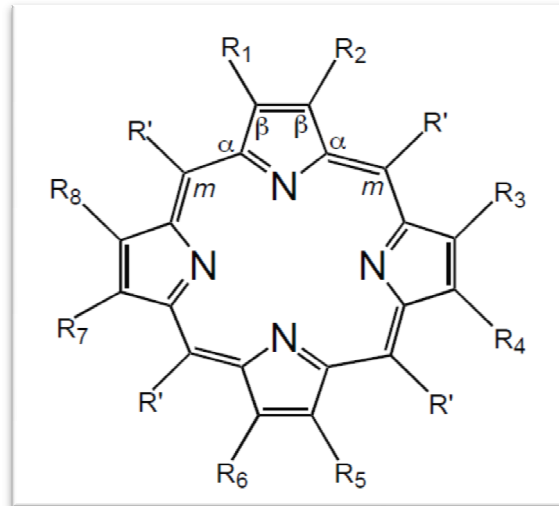
precisão, de variações sutis nos espectros, pode fornecer importantes informações a cerca da dinâmica proveniente de alterações físicas e/ou química na amostra em estudo.

A Figura 4.5 mostra uma representação dos espectros Raman em série adquiridos a partir de uma das 10 hemácias que foram aprisionadas pelo laser com uma potência de aprisionamento /excitação de 10 mW. Durante os 40 minutos de exposição, com um tempo de 15s de aquisição para cada espectro, adquiriu-se 160 espectros, como mostrado na Tabela 4.1.



**Figura 4.5.** Espectros Raman em série de uma hemácia aprisionada por um laser de 10 mW de potência. Os espectros mostram variações tanto nas intensidades quanto nas posições dos picos ao longo do tempo.

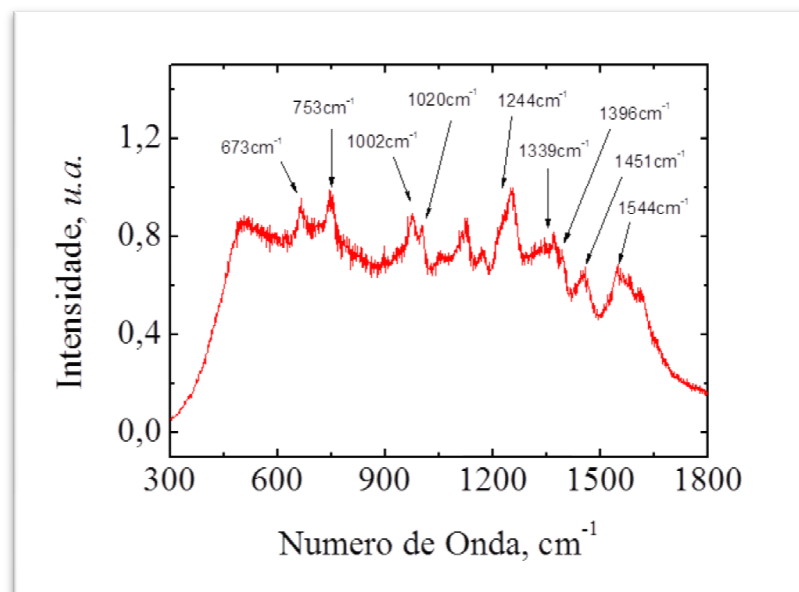
Todas as hemácias avaliadas neste trabalho foram mantidas em equilíbrio com o oxigênio atmosférico. Os espectros obtidos aqui estão de acordo com os relatados em estudos anteriores para hemácias oxigenadas [16, 17]. As bandas Raman observadas são devido ao acoplamento com os estados do macrociclo da porfirina. Os espectros vibracionais de porfirinas são extremamente complicados, mesmo a porfirina mais simples: porfina. A molécula de porfina, mostrada na Figura 4.6, tem  $3 \times 37 - 6 = 105$  modos normais de vibração. Na simetria  $D_{4h}$  [80], existem 102 graus de liberdade vibracionais previstos para a porfina base livre.



**Figura 4.6** Molécula de Porfina. [80]

A atribuição para algumas importantes bandas Raman de hemácias, deduz-se do trabalho por Abe *et al.* [80] e Wood *et al.* [81]. As mudanças espectrais observadas foram similares para todas as hemácias medidas, com a principal diferença sendo a rapidez com que elas ocorreram, tanto para intensidade quanto para o deslocamento dos picos.

O algoritmo de caracterização de espectros Raman, LADS, permitiu o estudo da evolução temporal dos espectros em série. Os picos 673, 753, 1002, 1220, 1244, 1339, 1396, 1451 e 1544  $\text{cm}^{-1}$ , identificados na Figura 4.7, do espectro Raman de uma hemácia mostraram variações temporais significativas em suas posições e intensidades.



**Figura 4.7** Espectro Raman de uma hemácia, aprisionada por um laser de 10 mW de potência, com a identificação dos principais picos envolvidos no estudo.

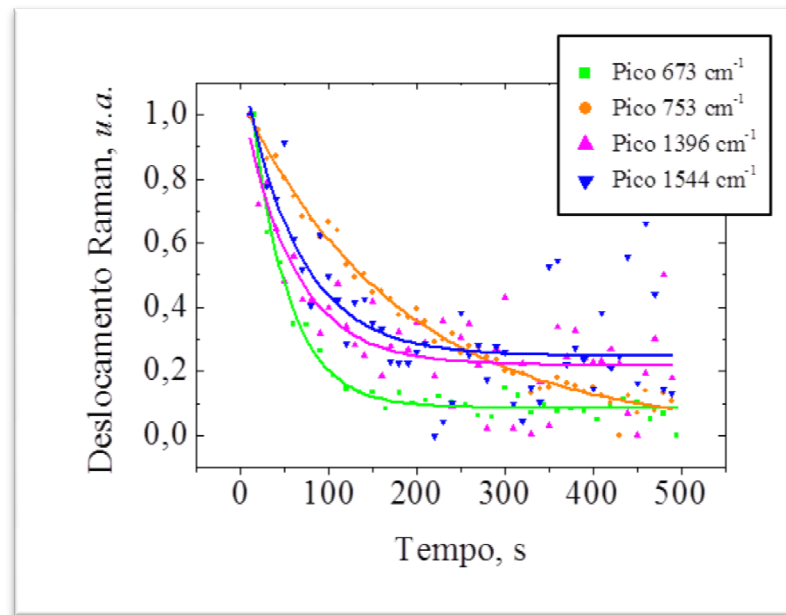


Dentre os picos estudados, os com números de onda mais baixos (entre 600 e 1200  $\text{cm}^{-1}$ ) são atribuídos a um modo de deformação pirrole, 673  $\text{cm}^{-1}$ , e uma “respiração” pirrole, 753  $\text{cm}^{-1}$ . Os picos em 1220 e 1244  $\text{cm}^{-1}$  estão associados à vibração  $C_m - H$  no plano de hidrogênio metino da porfirina macrociclo [82-84]. Entre 1300 e 1400  $\text{cm}^{-1}$ , os modos de vibrações estudados aqui, 1339 e 1396  $\text{cm}^{-1}$ , são provenientes do alongamento, com diferentes fases, do anel de pirrole. As bandas na região entre 1500 e 1700  $\text{cm}^{-1}$  são conhecidas por servir como marcadores de estado de rotação. O modo normal em 1544  $\text{cm}^{-1}$  consiste principalmente de alongamento da ligação  $C_\beta - C_\beta$  e é sensível à degradação óptica da hemácia [82]. A Tabela 4.2 mostra as atribuições das coordenadas locais dos principais picos analisados nesta tese.

**Tabela 4.2** Atribuições das coordenadas locais dos picos Raman estudados da hemoglobina. [81]

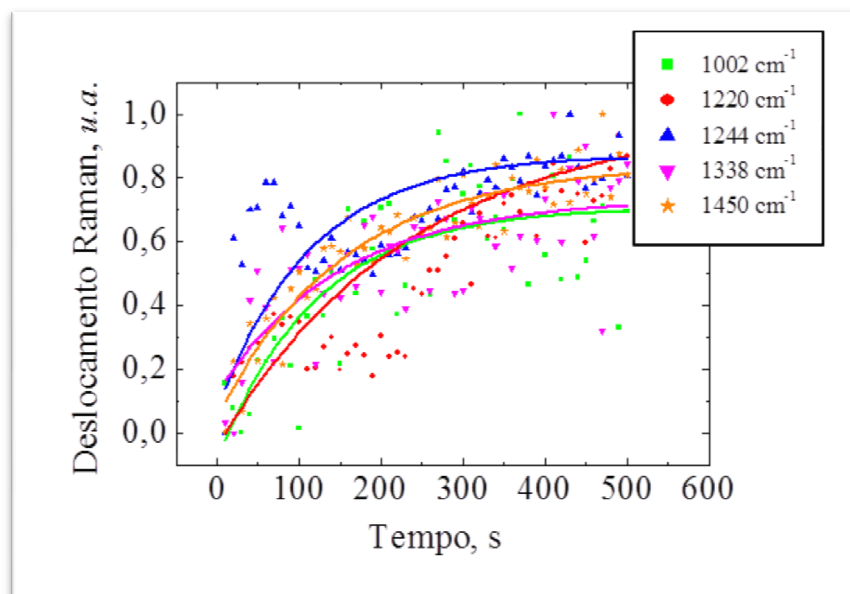
<b>Posição do Pico Raman (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>	<b>Atribuição do Pico (Coordenada Local)</b>
<b>673</b>	$\delta(\text{pyr deform})_{\text{sym}}$
<b>753</b>	$\nu(\text{pyr breathing})$
<b>1002</b>	$\nu(C_\beta C_1)_{\text{asym}}$
<b>1220</b>	$\delta(C_m H)$
<b>1244</b>	$\delta(C_m H)$
<b>1339</b>	$\nu(\text{pyr half - ring})_{\text{sym}}$
<b>1396</b>	$\nu(\text{pyr quater - ring})$
<b>1451</b>	$\delta(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$
<b>1544</b>	$\nu(C_\beta C_\beta)$

Os picos da Tabela 4.2 foram divididos em dois grupos, que se baseiam em suas dinâmicas de posição. No grupo I, os picos 673, 753, 1396 e 1544  $\text{cm}^{-1}$  apresentaram deslocamento do número de onda dos picos Raman para valores menores ao longo do tempo, Figura 4.8. Para quantificar as dinâmicas dos deslocamentos dos picos Raman, ajustamos estas evoluções temporais através de curvas exponenciais da forma  $\propto \exp(-t/\tau_0)$ .



**Figura 4.8** Deslocamento Raman dos picos do grupo I. Os pontos são os dados experimentais obtidos para a potência do laser de 10 mW e as linhas sólidas são ajustes exponenciais  $\propto \exp(-t/\tau_0)$ .

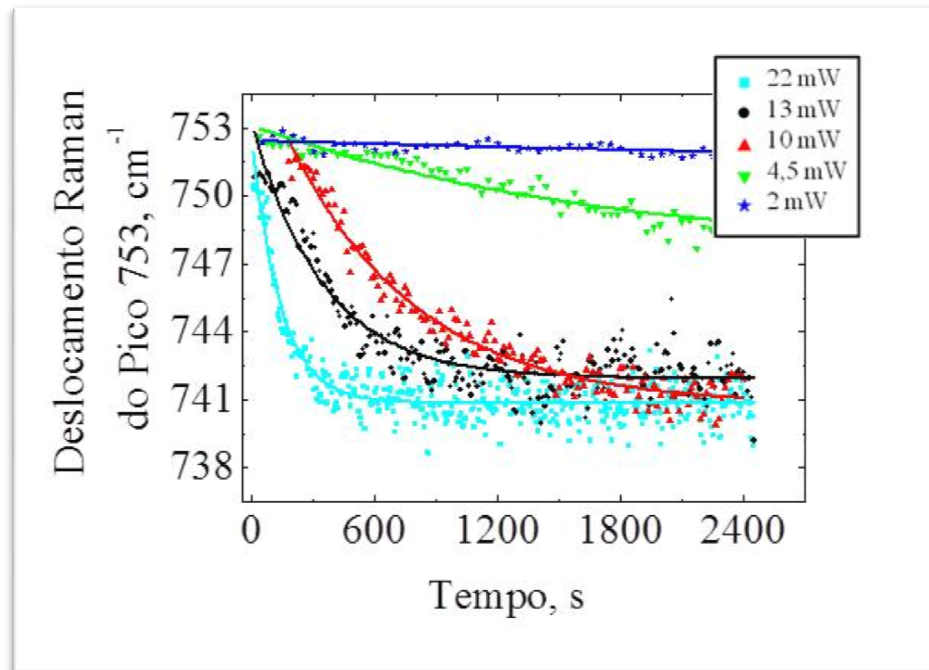
No grupo II, os picos 1002, 1220, 1244, 1339 e 1451  $\text{cm}^{-1}$  mudaram para números de onda superiores, como mostrado na Figura 4.9.



**Figura 4.9** Deslocamento Raman dos picos do grupo II. Os pontos são os dados experimentais obtidos para a potência do laser de 10 mW e as linhas sólidas são ajustes exponenciais  $\propto \exp(-t/\tau_0)$ .

Na Figura 4.10 observa-se a evolução temporal do pico, 753  $\text{cm}^{-1}$ , pertencente ao grupo I, para diferentes potências do laser. Seu comportamento transiente é determinado pela potência

de laser, com maiores potências levando a mudanças mais rápidas nas posições dos picos Raman.



**Figura 4.10** Comportamento do Deslocamento Raman do pico  $753 \text{ cm}^{-1}$ . Os pontos são os dados experimentais obtidos em diferentes potências do laser e as linhas sólidas são ajustes exponenciais  $\propto \exp(-t/\tau_0)$ .

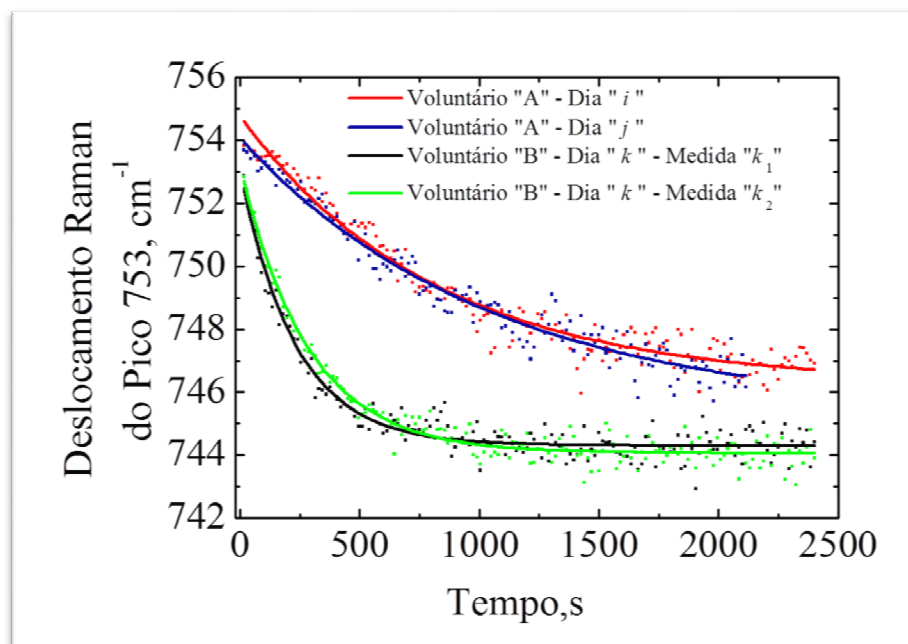
A Tabela 4.3 mostra os valores de  $\tau_0$  obtidos dos ajustes dos picos  $673$ ,  $753$ ,  $1002$ , e  $1451 \text{ cm}^{-1}$ , no estudo dos deslocamentos espectrais para diferentes potências do laser. Para cada uma das diferentes potências do laser, foram realizadas dez medidas. Cada medida foi realizada com uma hemácia diferente. A amostra contendo as hemácias era diluída em DPBS imediatamente antes das medições, e para cada amostra apenas uma hemácia era exposta à armadilha óptica, ao final das medições a amostra era descartada.

**Tabela 4.3.** Deslocamento dos picos Raman (em segundos) em função da potência do laser para os picos  $673$ ,  $753$ ,  $1002$  e  $1451 \text{ cm}^{-1}$ . Os erros indicam o desvio padrão sob as 10 medidas.

Potência do Laser (mW)	Posição dos Picos Raman			
	$673 \text{ cm}^{-1}$	$753 \text{ cm}^{-1}$	$1002 \text{ cm}^{-1}$	$1451 \text{ cm}^{-1}$
	$\tau_0$ (s)	$\tau_0$ (s)	$\tau_0$ (s)	$\tau_0$ (s)
22	$67 \pm 20$	$219 \pm 66$	$-143 \pm 39$	$-193 \pm 55$
13	$132 \pm 37$	$452 \pm 76$	$-266 \pm 80$	$-429 \pm 118$
10	$272 \pm 71$	$1048 \pm 197$	$-315 \pm 47$	$-518 \pm 116$
4,5	$1003 \pm 189$	$2121 \pm 549$	$-1564 \pm 389$	$-2155 \pm 300$

Observa-se que embora a dinâmica temporal seja facilmente verificada, existe uma variabilidade significativa nos dados. Os erros associados aos tempos na Tabela 4.3, foram obtidos pelo desvio padrão entre as dez medidas realizadas para cada potência do laser. Os tempos  $\tau_0$  para a potência de 2 mW do laser não são apresentados na Tabela 4.3, pois como pode-se verificar na Figura 4.10, praticamente não há deslocamento do pico para esta potência e, desta forma,  $\tau_0 \rightarrow \infty$  no ajuste.

A Figura 4.11 a seguir mostra a evolução temporal do pico  $753 \text{ cm}^{-1}$  de 2 dos 5 diferentes doadores voluntários, “A” e “B”, adultos e saudáveis. As hemácias do sangue coletado de cada um deles foram estudadas em duas medidas diferentes: para a o voluntário “A” coletou-se sangue em dois dias diferentes, “i” e “j”, resultando em duas medidas, curvas vermelha e azul; para o voluntário “B” coletou-se sangue num único dia, “k”, que resultou em duas medidas distintas, “ $k_1$ ” e “ $k_2$ ”, curvas preto e verde.

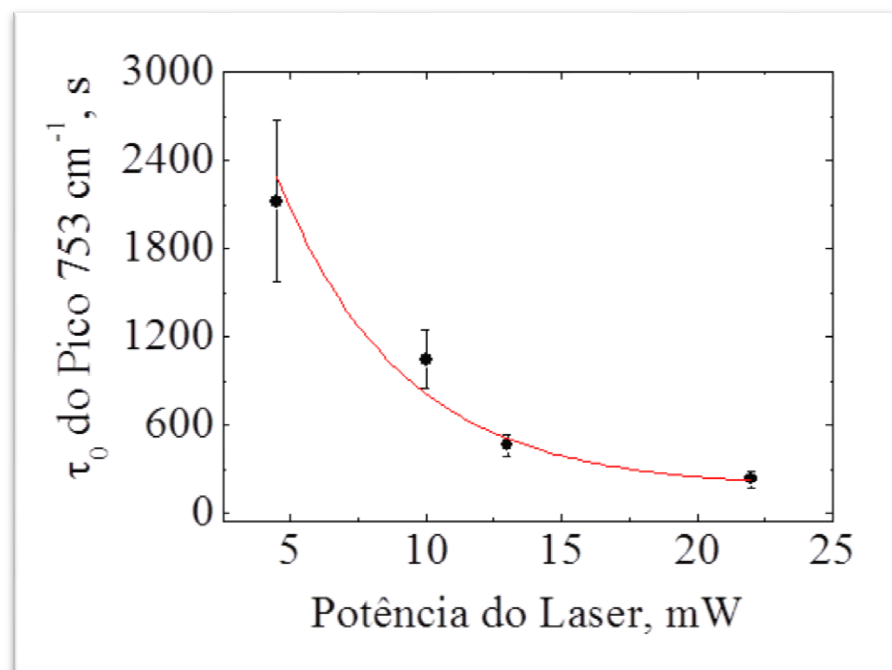


**Figura 4.11** Dinâmica temporal do pico  $753 \text{ cm}^{-1}$  utilizando 10 mW de potência do laser, das hemácias de 2 diferentes voluntários. Os pontos são os dados experimentais e as linhas sólidas são ajustes exponenciais  $\propto \exp(-t/\tau_0)$ .

Baseado em nossos resultados, para uma mesma potência do laser, a variabilidade nos tempos característicos,  $\tau_0$ , dos picos é atribuída ao doador das hemácias. Pode-se observar que os ajustes temporais foram muito similares para o mesmo doador independente se medidas foram realizadas em dias diferentes. Nota-se que os dados a partir de um mesmo voluntário são muito similares uns aos outros, mesmo que tenham sido adquiridos em dias

distintos, enquanto que os dados de doadores diferentes têm comportamentos ligeiramente diferentes, mesmo que tenham sido adquiridos no mesmo dia. Observa-se que as variações analisadas devem ocorrer principalmente devido às diferenças biológicas entre os vários indivíduos. Um possível motivo pode ser devido às diferentes quantidades de hemoglobina em cada célula. Se a velocidade da reação do dano óptico da hemoglobina for dependente da concentração, os indivíduos com menores quantidades de hemoglobina por célula podem ter sua hemoglobina "consumida" mais rapidamente e, portanto, a mudança Raman poderia ocorrer de forma mais rápida. No entanto, isto é meramente especulativo e pode ser devido a outras variabilidades biológicas, tais como a idade média dos glóbulos vermelhos, ou concentrações de outras proteínas na membrana da célula, que podem atuar como um papel protetor.

Pelos valores de  $\tau_0$ , na Tabela 4.3, nota-se que os picos Raman possuem diferentes dinâmicas espectrais, para diferentes potências do laser. A Figura 4.12 mostra o comportamento dos tempos característicos,  $\tau_0$ , em função da potência do laser, para os ajustes exponenciais do pico  $753\text{ cm}^{-1}$ .

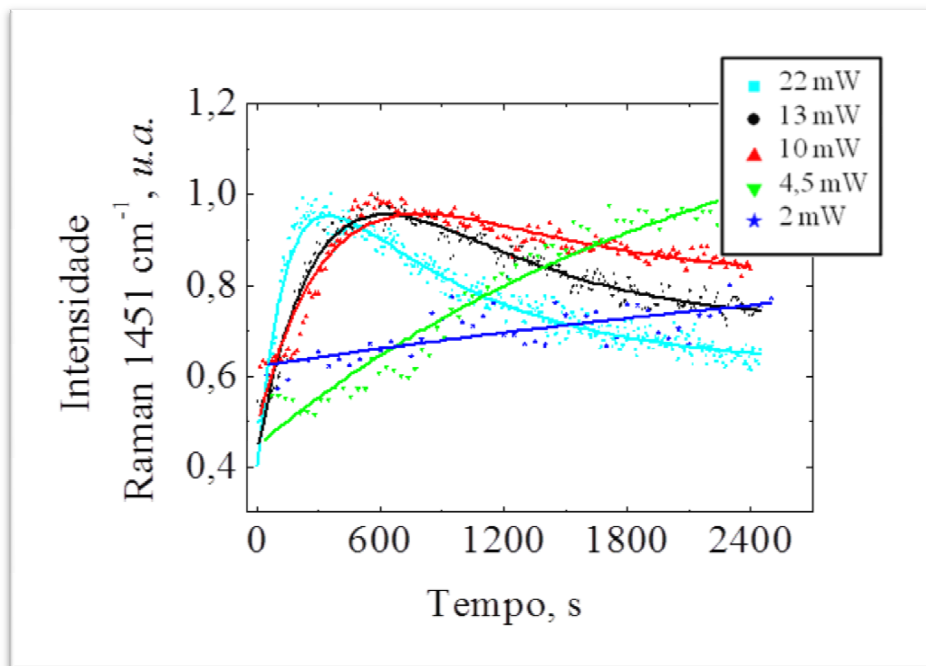


**Figura 4.12.** Dinâmica da posição do pico  $753\text{ cm}^{-1}$  para diferentes potências do laser. Os pontos são dados fornecidos pela Tabela 4.3 e a linha sólida é o ajuste obtido da curva  $y(x) = C \exp(-x/\tau) + c_0$ .

Observa-se que  $\tau_0$ , o tempo relacionado ao deslocamento dos picos Raman, tem um comportamento não linear com a potência do laser e foi ajustado pela curva exponencial:

$$\tau_0^{753\text{cm}^{-1}}(s) = 5641 \exp\left(-\frac{\text{Pot}(mW)}{4,6}\right) + 179. \quad (4.1)$$

Com relação às intensidades Raman dos picos estudados, observamos que praticamente todos os picos apresentam um mesmo comportamento característico como mostrado na Figura 4.13 abaixo. Verifica-se um rápido aumento seguido por uma redução mais lenta, para as potências do laser  $\geq 10mW$ , enquanto que para as potências  $< 10mW$  observa-se apenas um aumento mais lento da intensidade.



**Figura 4.13** Variação na intensidade do pico  $1451\text{ cm}^{-1}$  para diferentes potências do laser.

A dinâmica das intensidades dos picos Raman para potências  $\geq 10mW$  foram, portanto, ajustadas com uma exponencial dupla, como descrito na Equação (4.1),

$$I(t) = A_1 \exp(-t/\tau_D) - A_2 \exp(-t/\tau_S) + A_3 \quad (4.2)$$

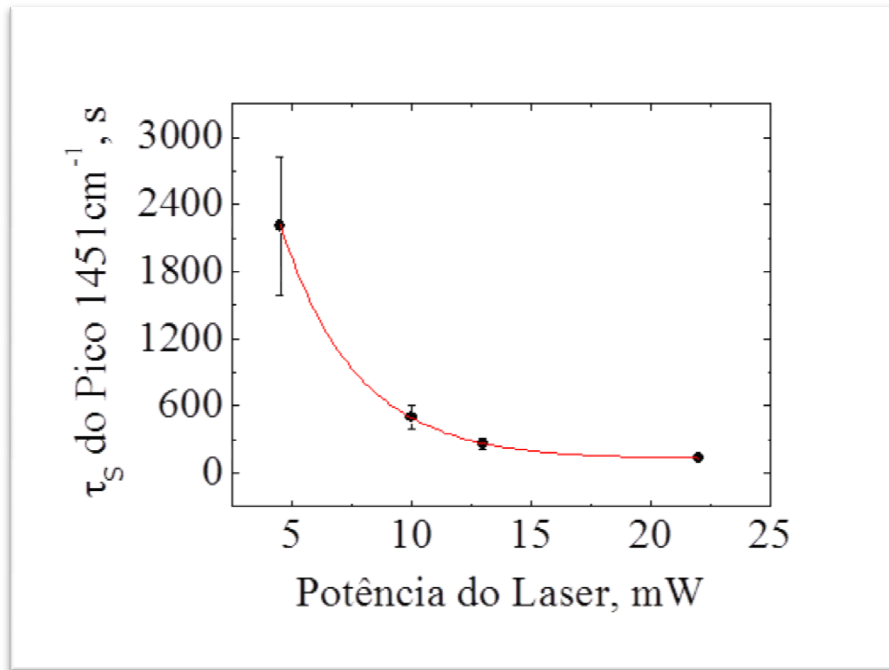
onde  $A_1$ ,  $A_2$  e  $A_3$  são constantes de ajuste e  $\tau_S$  e  $\tau_D$  são os tempos característicos de subida e de descida, respectivamente. Para potências do laser  $< 10mW$ , apenas uma única exponencial foi utilizada, e assim apenas tempos de subida foram calculados com  $A_1 = 0$  na Eq. (4.2). As pequenas alterações nas intensidades dos picos não nos forneceu ajustes robustos.

A Tabela 4.4 resume os tempos característicos de subida e de descida obtidos para os picos  $673$  e  $1451\text{ cm}^{-1}$  nas diferentes potências do laser mas, como pode-se verificar na Figura 4.13, praticamente não há variação na intensidade do pico para a potência de  $2\text{ mW}$ , ou seja,  $\tau_S \rightarrow \infty$  no ajuste da curva para esta potência. Portanto estes dados não estão apresentados na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4.** Tempos característicos de subida e de descida dos picos Raman (em segundos) em função da potência do laser para os picos 673 e 1451  $\text{cm}^{-1}$ . Os erros indicam o desvio padrão sob as 10 medidas.

Potência do Laser (mW)	Posição dos Picos Raman			
	673 $\text{cm}^{-1}$		1451 $\text{cm}^{-1}$	
	$\tau_S$ (s)	$\tau_D$ (s)	$\tau_S$ (s)	$\tau_D$ (s)
22	248 ± 100	435 ± 115	133 ± 25	1033 ± 154
13	302 ± 68	1017 ± 293	261 ± 52	1745 ± 801
10	440 ± 81	1385 ± 372	500 ± 110	1462 ± 559
4,5	1434 ± 368	-	2207 ± 619	-

A Figura 4.14 mostra a dependência do tempo de subida,  $\tau_S$ , do pico 1451  $\text{cm}^{-1}$ , obtidos dos ajustes apresentados na Tabela 4.4, para diferentes potências do laser.

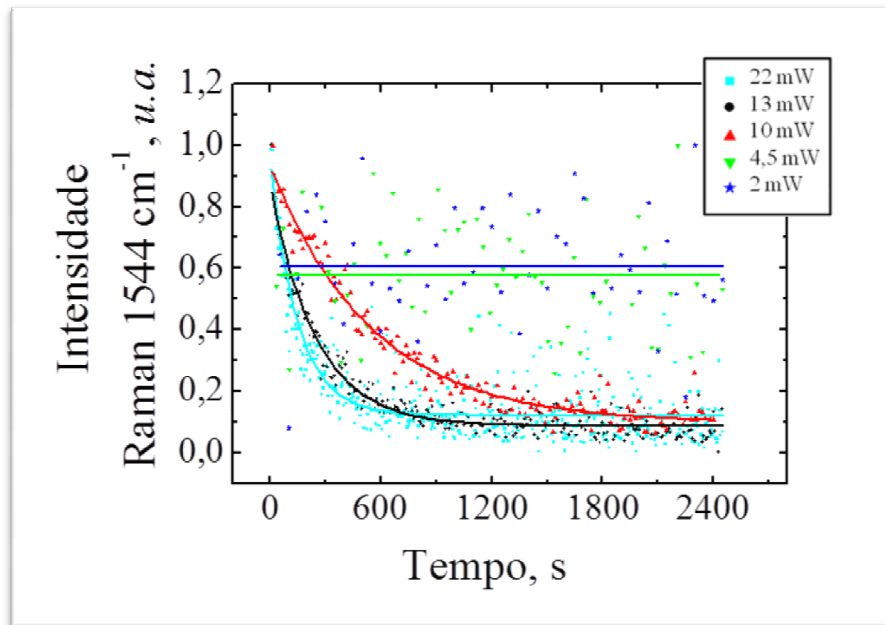


**Figura 4.14** Dinâmica do aumento da intensidade, representada por  $\tau_S$ , do pico 1451  $\text{cm}^{-1}$ , para diferentes potências do laser. Os pontos são dados fornecidos pela Tabela 4.4 e a linha sólida é o ajuste obtido da curva  $y(x) = C \exp(-x/\tau) + c_0$ .

Observa-se que  $\tau_S$ , o tempo relacionado com o aumento na intensidade dos picos Raman, também tem um comportamento não linear com a potência do laser e foi bem ajustado pela curva exponencial:

$$\tau_S^{1451\text{cm}^{-1}} (\text{s}) = 8797 \exp\left(-\frac{\text{Pot}(\text{mW})}{3,1}\right) + 124 \quad (4.3)$$

Verificou-se que o pico Raman  $1544\text{ cm}^{-1}$ , dentre todos os picos estudados, foi o único que apresentou uma dinâmica diferente na intensidade, apenas com uma redução ao longo do tempo, como mostrado na Figura 4.15 abaixo.

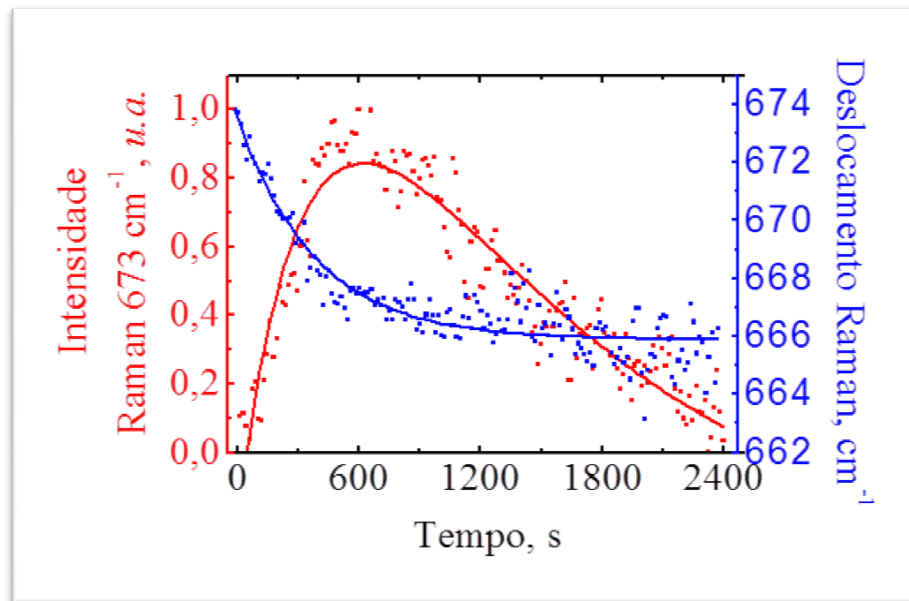


**Figura 4.15** Variação na intensidade do pico  $1544\text{ cm}^{-1}$  para diferentes potências do laser.

A dinâmica da intensidade deste pico foi, portanto, ajustada com  $A_2 = 0$  na Eq. (4.2). Como apenas uma única exponencial foi utilizada, apenas tempos de decaimento foram obtidos.

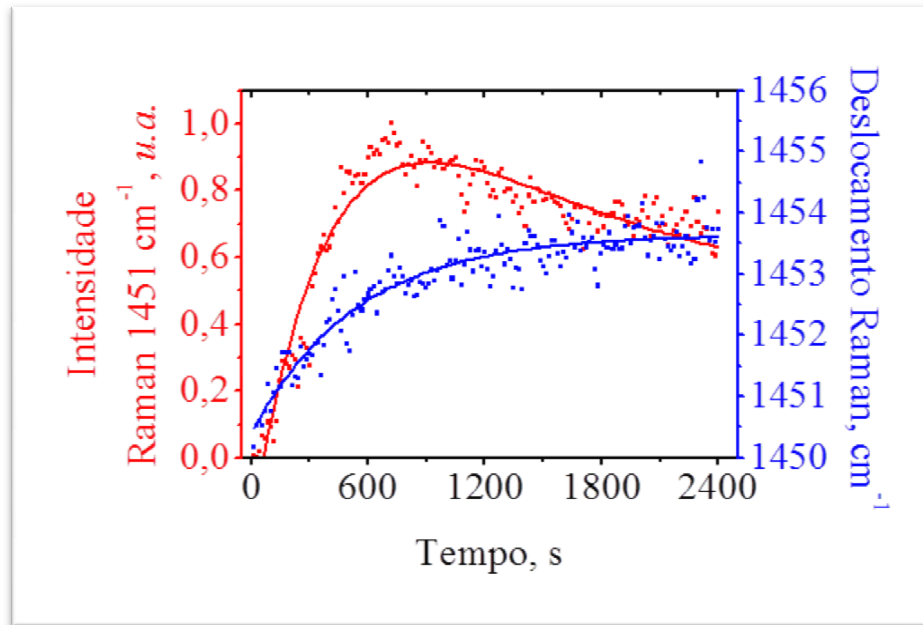
A Figura 4.16 mostra as evoluções temporais da posição e da intensidade do pico  $673\text{ cm}^{-1}$ , que pertence ao grupo I, utilizando  $10\text{ mW}$  de potência do laser. Nesta análise multidimensional, observou-se simultaneamente a intensidade e a posição de cada pico individual. Ao olhar para ambas, podemos elucidar os efeitos fotoinduzidos nas células sob um entendimento mais abrangente.





**Figura 4.16** Evoluções temporais da posição e da intensidade do pico  $673\text{ cm}^{-1}$ . Os pontos são os dados experimentais obtidos para a potência do laser de 10 mW e as linhas sólidas são ajustes exponenciais da Eq. (4.2).

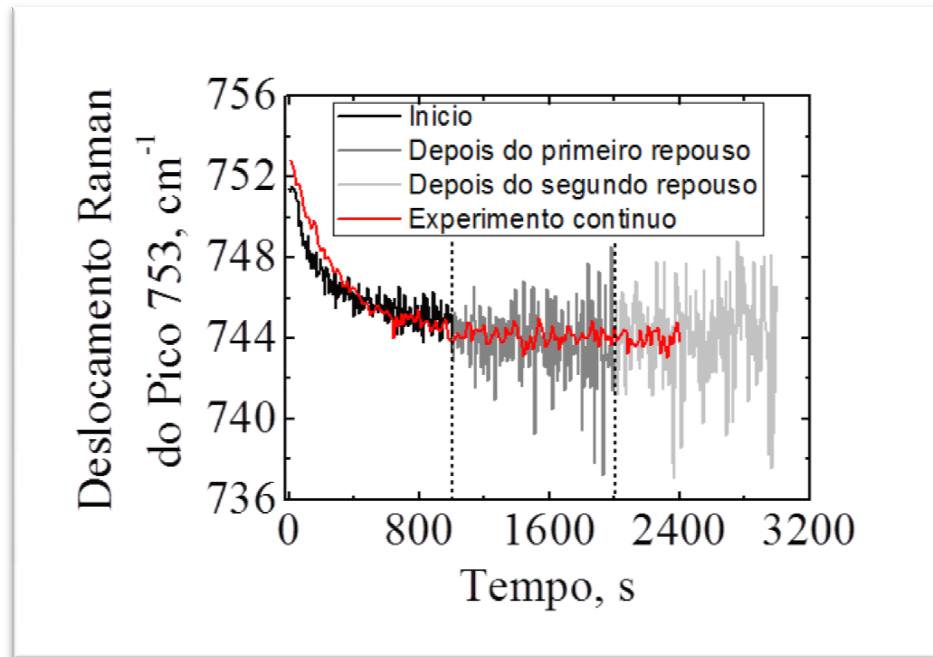
Observa-se que até a intensidade do pico atinge seu máximo, por volta de 600 s, ocorre uma grande variação na sua posição para um número de onda menor. Após este ponto, existe uma deterioração lenta da intensidade do sinal, enquanto a posição do pico permanece praticamente constante. Na Figura 4.17 plotamos as dinâmicas de posição e intensidade do pico  $1451\text{ cm}^{-1}$ , que pertence ao grupo II, utilizando 10 mW de potência do laser.



**Figura 4.17** Evoluções temporais da posição e da intensidade do pico  $1451\text{ cm}^{-1}$ . Os pontos são os dados experimentais obtidos para a potência do laser de 10 mW e as linhas sólidas são ajustes exponenciais da Eq. (4.2).

Neste caso, a variação na posição do pico ocorre para números de onda maior, mas a intensidade do pico também atinge seu máximo por volta de 600 s, e após este ponto, também existe uma deterioração lenta da intensidade do sinal, enquanto a posição do pico permanece praticamente constante.

Realizou-se um estudo para verificar a reversibilidade dos danos causados às hemácias durante o aprisionamento óptico. Para este estudo, utilizou-se 22 mW de potência do laser. Uma hemácia foi exposta à armadilha óptica durante 15 minutos. Após este período foi realizada uma interrupção do laser por 15 minutos. Em seguida essa mesma hemácia foi exposta ao laser por mais uma vez durante 15 minutos. Novamente, após este período foi realizada mais uma interrupção do laser por 15 minutos. Por fim, um último período de exposição de 15 minutos foi estabelecido. A Figura 4.18 mostra o comportamento do pico Raman de  $753\text{ cm}^{-1}$  durante este processo.



**Figura 4.18** Deslocamento do pico Raman em 753 cm<sup>-1</sup>. Experimento contínuo (vermelho) e com interrupção (escala de cinza), obtidos para a potência do laser de 22 mW.

Enquanto a hemácia estava sujeita à ação do laser, espectros Raman foram adquiridos com tempos de integração para espectros individuais de 5 segundos. As mudanças espectrais foram acompanhadas com relação aos deslocamentos das posições dos picos Raman. Pode-se verificar que não houve uma recuperação das condições iniciais após os períodos de descanso, caracterizando, desta forma, um dano irreversível à célula.

## 5 CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

### 5.1 CONCLUSÕES

O desenvolvimento do sistema de microespectroscopia Raman, que permite o estudo de amostras num âmbito microscópico, quando associada à pinça óptica, para manipular e isolar objetos microscópicos durante o estudo de suas propriedades individuais, requereu um refinamento muito grande, na associação de seus componentes principais, para maximizar a SNR dos espectros Raman, principalmente porque o sinal Raman das hemácias é pouco intenso e usualmente suprimido pelo intenso sinal de autofluorescência e/ou espalhamento Rayleigh.

O sistema de microRaman desenvolvido nesta tese utiliza um único laser de radiação infravermelha que permite, simultaneamente, a imobilização das células e a excitação Raman, e desta forma:

- Melhora a eficiência de excitação e detecção do sistema, pois os elementos ópticos como espelhos, filtros e objetiva foram otimizados para um único comprimento de onda: 785 nm;
- Permite o estudo de uma única célula, em vez de uma média do conjunto e assim a heterogeneidade é exaltada, e as alterações fotoquímicas induzidas podem ser obtidas com maior confiabilidade;
- Evita efeitos térmicos, causados por absorção do laser, que podem levar as células ao efeito de apoptose, permitindo o estudo dos efeitos ópticos;
- Evita efeitos de superfície, causados pelo contato físico, além de reduzir os sinais de fundo, causados por espalhamento, provenientes da lamínula. Isso possibilita uma melhor SNR do sinal Raman, que é necessária para a percepção nas variações sutis dos espectros.
- Os ajustes obtidos nas Eqs. (4.1) e (4.3) fornecem parâmetros que quantificam as dinâmicas dos danos fotoquímicos, causados às células, em função da potência do laser;

O sistema desenvolvido, associado ao longo tempo de exposição do estudo das células de sangue, as hemácias, através do algoritmo de caracterização de espectros Raman, permitiu:

- Uma análise multidimensional através da detecção simultânea das variações nas posições e nas intensidades dos espectros Raman, e desta forma um entendimento maior dos efeitos envolvidos no processo, onde propomos um efeito de dois passos;
- O aumento inicial da intensidade e a mudança na posição do pico, que acontecem no intervalo de 0 a 600 s, indicam uma mudança fotoquímica induzida opticamente na hemoglobina: formação de uma hemoglobina modificada. Em nossa hipótese, as dinâmicas das variações na posição e no aumento da intensidade dos picos são representadas, respectivamente, por  $\tau_0$  e  $\tau_S$ ;
- Notamos que as alterações espectrais estudadas, em particular em  $1544\text{ cm}^{-1}$  são consistentes com a formação de metemoglobina, que é a forma oxidada da hemoglobina. A diminuição da intensidade deste pico, assim com o deslocamento para números de onda menores são atribuídos à metemoglobina, no qual oxigênio é irreversivelmente ligado ao heme, conforme indicado em estudos anteriores [85,86];
- Os parâmetros obtidos nos ajustes, através das Eqs. (4.1) e (4.3), quantificam, desta forma, a dinâmica da reação fotoquímica na hemoglobina.
- No outro passo, a redução na intensidade acompanhada por uma invariância na posição dos picos, para tempos maiores que 600 s, indicam que a hemoglobina começa a espalhar para fora das células, mas sem haver alteração química. A dinâmica da redução da intensidade do pico, representada por  $\tau_D$ , indica uma difusão da hemoglobina, possivelmente devido a um aumento na permeabilidade da membrana celular conforme indicado em estudo anterior [16];
- Observou-se que picos diferentes possuem dinâmicas ligeiramente diferentes, isto resulta do fato de que a mudança química não aumenta uniformemente a seção transversal de todos os picos Raman;

- O monitoramento das variações sutis nos espectros Raman e a caracterização de suas dinâmicas permitiu identificar e avaliar a dinâmica do efeito fotoquímico com entendimento ainda não alcançado;
- No estudo da reversibilidade dos danos causados às hemácias, pode-se verificar que a mudança não só é irreversível, sem recuperação notável após 15 minutos de descanso, mas também que ao se ignorar as lacunas temporais devido ao descanso, o resultado obtido possui um comportamento semelhante à dinâmica de um experimento contínuo.

## 5.2 PERSPECTIVAS

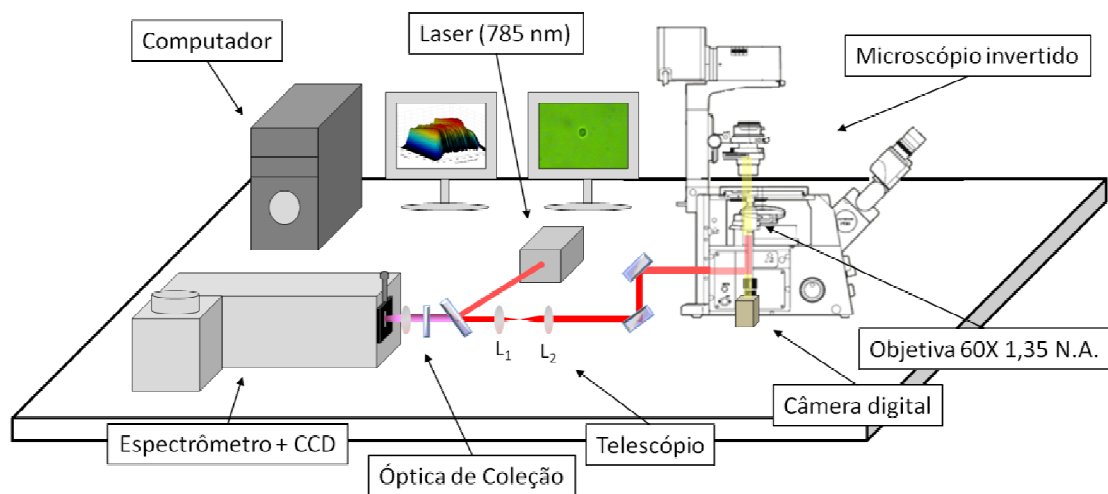
O espectro Raman, que nos fornece uma informação direta das interações entre os átomos constituintes do meio em estudo, além de permitir a identificação de alterações composicionais também permite a identificação de alterações estruturais. De forma geral, efeitos que levem a alterações deste tipo, nas células, podem ser caracterizados através da técnica desenvolvida nesta tese. No caso das hemácias, particularmente, alguns defeitos podem ocorrer durante a produção da hemoglobina, que levam a diferentes patologias, dentre elas: as hemoglobinopatias [87]. Esses defeitos podem causar anormalidades estruturais possibilitando, desta forma, a identificação e caracterização destas patologias pela espectroscopia Raman da hemácia. Outras anomalias podem acontecer durante o procedimento de estocagem de hemácias nos hemocentros. Esse processo pode mudar as propriedades das hemácias, fazendo com que não preservem suas funções vitais esperadas, por exemplo, para o receptor. Tornando a identificação e a caracterização destes danos de grande importância para os hemocentros.

Outros efeitos também podem ser abordados. O uso de lasers na região visível do espectro, por exemplo, podem ser utilizados para estudar os danos térmicos devido à interação do laser com a amostra em estudo.

## 5.3 TRABALHOS FUTUROS

Já está em execução no Laboratório de Óptica Biomédica e Imagens (LOBI) na UFPE um sistema de microespectroscopia Raman similar ao desenvolvido no Center for Biophotonics Science and Technology (CBST) na University of California, Davis. O sistema, representado

na Figura 5.1, que utiliza um microscópio invertido (OLYMPU IX81) equipado com uma objetiva 60X, 1,35 N.A. (OLYMPUS UPLANSAPO), de imersão em óleo, produzindo um ponto luminoso capaz de aprisionar as hemácias. A fonte de excitação/aprisionamento é um laser de diodo (TOPTICA PHOTONICS XR7A) de onda contínua na região do infravermelho, 785 nm. A emissão Raman Stokes a partir da amostra é coletada pela mesma objetiva e direcionada por um filtro dicróico a um espectrômetro (PRINCETON INSTRUMENTS ACTON SP2500i), equipado com duas grades de difração 600 linhas/mm, que dispersa a luz para uma câmera CCD (Princeton Instruments VersArray Back-illuminated 1340 x 1300 Pixel), refrigerada com nitrogênio líquido, que opera a aproximadamente  $-90^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 5.1** Sistema para microespectroscopia Raman desenvolvido na UFPE.

Os elementos ópticos utilizados para coletar o sinal Raman, posicionados antes do espectrômetro, são um filtro notch e uma lente convergente, cuja *N.A.* coincide com a do espectrômetro. Este sistema permite a detecção simultânea das imagens por transmissão e da emissão Stokes. No entanto, durante a aquisição do espectro Raman desligava-se a lâmpada do microscópio para evitar sinal de fundo.

Microesferas de poliestireno de aproximadamente  $10\ \mu\text{m}$  de diâmetro foram utilizadas para realizar os ajustes mais precisos, com o objetivo de maximizar a SNR do espectro Raman da partícula presa à armadilha óptica. Para isso, foi utilizada uma solução dessas microesferas diluídas em água deionizada.

A SNR nos espectros Raman das hemácias ainda não está satisfatória, pois o filtro passa banda e o filtro passa alta utilizado não são os ideais para 785 nm e precisam ser modificados. Outra mudança determinante no sistema experimental a ser realizada no sistema,

principalmente devido à pinça óptica, é o uso uma mesa estabilizada por ar comprimido. As vibrações mecânicas externas são consideráveis e podem ser observadas ao aprisionar a célula.

### **5.3.1 HEMOGLOBINOPATIAS**

As hemoglobinopatias são patologias causadas por defeitos que podem ocorrer durante a produção da hemoglobina e basicamente podem ser de dois tipos distintos. Podem ocorrer anormalidades estruturais, resultantes de alterações sofridas pelos aminoácidos que compõem a cadeia de globina, ou podem ser decorrentes de uma síntese desbalanceada, apresentando quantidades alteradas das cadeias de globina. A anemia falciforme é a mais conhecida, mas já foram identificados mais de 1000 defeitos estruturais da hemoglobina [88].

Na anemia falciforme, por exemplo, existe alteração de um dos resíduos de aminoácido nas cadeias globinas beta, originando um tipo de hemoglobina chamada hemoglobina S. A composição anormal da porção globina da hemoglobina, favorece a fácil cristalização do pigmento no interior das hemácias, além de tornar as células mais frágeis. Os cristais da hemoglobina S são longos e tendem a alongar as hemácias, alterando a sua forma normal no sangue. Estes pacientes podem ter baixa tensão de oxigênio tecidual, por diversas razões, inclusive a formação de grumos celulares que obstruem os capilares e reduzem o fluxo sanguíneo para diversos tecidos.

Um dos primeiros trabalhos futuros é identificar e caracterizar hemácias de pessoas portadoras de diferentes hemoglobinopatias através do sistema desenvolvido.

### **5.3.2 ARMAZENAMENTO DE SANGUE EM HEMOCENTROS**

O sangue, que é de extrema importância para o funcionamento da máquina humana, não pode ser substituído por nenhum outro líquido. Por este motivo a doação, e conseqüentemente o armazenamento, são tão importantes.

O concentrado de hemácias é obtido e separado do sangue total doado, após centrifugação. Usualmente, o tempo de armazenamento dos concentrados de hemácias em hemocentros é de 35 e 42 dias, dependendo da solução conservadora, em refrigeração constante entre 2 e 6 °C [90]. Todo esse processo pode mudar as propriedades da hemácia, desta forma, fazendo com que não realizem suas funções vitais esperadas para o receptor.



Assim, outro estudo imediato é o da eficiência da estocagem de concentrado de hemácias em hemocentros. Neste estudo pretende-se identificar, através do sistema desenvolvido, quais são os danos causados às hemácias e caracterizar sua dinâmica ao longo do tempo de estocagem. Ou seja, verificar a preservação de sua funcionalidade esperada durante o prazo de validade destes concentrados.

## REFERÊNCIAS

- [1] HORIBA. *Raman Spectroscopy: Application Notes & Articles*. Disponível em: <http://www.horiba.com/us/en/scientific/products/raman-spectroscopy/applications/>. Acesso em set. 2014.
- [2] NIEMCZYK, T. M.; DELGADO-LOPEZ, M. M.; ALLEN, F. S.. *Quantitative determination of Bucindolol concentration in intact gel capsules using Raman Spectroscopy*. *Anal. Chem.*, **70**, p. 2762-5, 1998.
- [3] VINHA JR., R.. *Espectroscopia Raman na determinação quantitativa de Paracetamol*. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, 2002.
- [4] DERBYSHIRE, A.; WITHNALL, R.. *Pigment analysis of portrait miniatures using Raman microscopy*. *J. Raman Spectrosc.*, **30**,185 ,1999.
- [5] TRENTELMAN, K.; STODULSKI, L.; PAVLOSKY, M.. *Characterization of pararealgar and other light-induced transformation products from realgar by Raman microspectroscopy*. *Anal Chem.* **68**, 1755–1761, 1996.
- [6] BURGIO,L. *et al. Pigment identification in painted artworks by laser-induced breakdown spectroscopy and Raman microscopy*. *Appl. Spectrosc.*, **54**, 463, 2000.
- [7] FITZGERALD, S.. *Micro-spectroscopy – shedding light on rock formation*. *Spectroscopy Europe* **17** 3 p.24-25, 2005.
- [8] JENKINS, A. L.; LARSEN, R. A.. *Gemstone identification using Raman spectroscopy*. *Spectroscopy* **19** 4, 2004.
- [9] MAHADEVAN-JANSEN, A.; RICHARDS-KORTUN, R.. *Raman spectroscopy for cancer detection: a review*. *Proceedings -19th International Conference IEEE/EMBS, Chicago, 1997*.

- [10] HILL, W.; PETROU, V.. *Detection of Caries and Composite Resin Restorations by Near-Infrared Raman Spectroscopy*. Appl Spectrosc., **51**, pp.1265-1268, 1997.
- [11] ELIASSON, C.; MACLEOD, N. A.; MATOUSEK, P.. *Non-invasive detection of cocaine dissolved in beverages using displaced Raman spectroscopy*. Anal. Chim. Acta **607** 1, 50-53, 2008.
- [12] HORIBA. *Raman Application: Direct Raman Mapped Imaging of Explosive Materials*. Disponível em: <http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/Raman/RA21.pdf>. Acesso em set. 2014.
- [13] ASHKIN, A. *et al. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*. Optics Lett. **11**, 288, 1986.
- [14] ASHKIN, A.; DZIEDZIC, J.. *Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria*. Science **235**, 1517, 1987.
- [15] XIE, C. G.; DINNO, M. A.; LI, Y. Q.. *Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells*. Optics Letters **27**, 249, 2002.
- [16] WOOD, B. R.; HAMMER, L.; DAVIS, L.; MCNAUGHTON, D.. *Raman microspectroscopy and imaging provides insights into heme aggregation and denaturation within human erythrocytes*. Journal of Biomedical Optics **10**, 2005.
- [17] DASGUPTA, R. *et al. Hemoglobin degradation in human erythrocytes with long duration near infrared laser exposure in Raman optical tweezers*. Journal of Biomedical Optics **15**, 2010.
- [18] LIU, R. *et al. Power dependent oxygenation state transition of red blood cells in a single beam optical trap*. Applied Physics Letters **99**, 2011.
- [19] LIU, R. *et al. Novel single-cell functional analysis of red blood cells using laser tweezers Raman spectroscopy: application for sickle cell disease*. Experimental Hematology, **41** 7 656, 2013.

- [20] ASHKIN, A.; DZIEDZIC, J.; YAMANE, T. M.. *Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams*. Nature **330**, 769, 1987.
- [21] WANG, C. L. *et al.* *Optical micromanipulation of active cells with minimal perturbations: direct and indirect pushing*. Journal of Biomedical Optics **18** 4 045001, 2013.
- [22] DELNO, I.; BIZZARRI, A. R.; CANNISTRARO, S.. *Time-dependent study of single-molecule SERS signal from yeast cytochrome c*. Chemical Physics **326**, 356, 2006.
- [23] HAYES, W.; LOUDON, R.. *Scattering of light by crystals*. John Wiley & Sons, 1978.
- [24] MARTINHO, H.. *Advances in Raman-based optical biopsy*. iConcept Press, 2013.
- [25] CHIAO, R. Y.; TOWNES, C. H.; STOICHEFF B. P.. *Stimulated Brillouin scattering and coherent generation of intense hypersonic waves*. Phys. Rev. Lett., **12**, 592, 1964.
- [26] MILLER, F. A.; KAUFFMAN, G. B.. *C. V. Raman and the discovery of the Raman effect*. J. Chem. Educ., **66**, 10, 1989.
- [27] LASERNA, J. J.. *An introduction to Raman spectroscopy: introduction and basic principles*". Disponível em:  
<http://www.spectroscopynow.com/details/education/sepspec1882education/An-Introduction-to-Raman-Spectroscopy-Introduction-and-Basic-Principles.html>. Acesso em set. 2014.
- [28] JORIO, A.; DANTAS, M. S. S.; PIMENTA, M. A.. *Apostila Sobre espectroscopia Raman*. Pós-Graduação em Física. UFMG.
- [29] LONG, D. A.. *The Raman effect: a unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules*. John Wiley & Sons, 2002.
- [30] JORIO, A., *et al.* *Raman spectroscopy in grapheme related systems*. Wilwy VCH Verlag, 2011.

- [31] RODRIGUES, A. G.; GALZERANI, J. C.. *Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades*. *Rev. Bras. Ensino Fís.* **34** 4, 2012.
- [32] SOLIN, S. A.; RAMDAS, A. K.. *Raman Spectrum of Diamond*. *Phys. Rev. B* **1**, 1687, 1970.
- [33] ROUSSEAU, D. L.; BAUMAN, R. P.; PORTO, S. P. S.. *Normal mode determination in crystals*. *Journal of Raman Spectroscopy* 10, 253, 1981.
- [34] CANÇADO, L. G.. *Raman spectroscopy of nano graphites*. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. P 181, 2006.
- [35] PEREIRA, A. P. G.. *Estudo da interação elétron-fônon em nanotubos de carbono por espectroscopia Raman ressonante*. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. P 110, 2009.
- [36] FANTINI, C.. *Estudo de elétrons e fônons em nanotubos de carbono por espalhamento Raman*. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. P 110, 2009.
- [37] MCCREERY, R. L.. *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*. John Wiley & Sons, 2<sup>a</sup> ed. p.163-165, 2000.
- [38] FRANK, C. J. *et al.* *Characterization of human breast biopsy specimens with near-IR Raman spectroscopy*. *Anal. Chem.*, **66**, 319, 1994.
- [39] TAYLOR, J. R.. *Introdução à Análise de Erros: o Estudo de Incertezas Em Medições Físicas*. 2<sup>a</sup> Ed. p246, 2012.
- [40] LANDERS, R. *et al.* *Espectroscopia Experimental de raios gama e investigações de radioatividade ambiente*. Disponível em: <http://www.ifi.unicamp.br/~jmoreira/gama.html>. Acesso em set. 2014.

- [41] SPRING, K. R.; DAVIDSON, M. W.. *Electronic Light Detectors: Photomultipliers*. Disponível em: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/pmtintro.html>. Acesso em set. 2014.
- [42] BUSCH, K. W.; BUSCH, M. A.. *Multielement Detection Systems for Spectrochemical Analysis*. John Wiley, New York, 1990.
- [43] PACKARD, R. T.; MCCREERY, R. L.. *High-sensitivity normal and resonance Raman spectroscopy: applications to transient electrochemistry*. *Anal Chem.*, **59**, 2631, 1987.
- [44] PACKARD, R. T.; MCCREERY, R. L.. *Raman Monitoring of Reactive Electrogenerated Species: Kinetics of Halide Addition to o -Quinones*. *J. Phys. Chem.*, **92**, 6345, 1988.
- [45] SPRING, K. R.; DAVIDSON, M. W.. *Quantum Efficiency*. Disponível em: <http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/concepts/quantumefficiency.html>. Acesso em set. 2014.
- [46] APOGEE. Disponível em: <http://www.ccd.com/ccd101.html>. Acesso em dez. 2014.
- [47] MCCREERY, R. L.. *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*. John Wiley & Sons, 2<sup>a</sup> ed. p.76-77, 2000.
- [48] TKACZYK, T. S.. *Field Guided to Microscopy*. SPIE Press Vol. FG13 p.86, 2010.
- [49] AIST. Disponível em: [http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct\\_frame\\_top](http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top). Acesso em dez. 2014.
- [50] WOOD, B. R.; TAIT, B.; MCNAUGHTON, D.. *Micro-Raman characterisation of the R to T state transition of haemoglobin within a single living erythrocyte*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **58** 1539, 2001.

- [51] XIE, C. G. *et al.* *Study of dynamical process of heat denaturation in optically trapped single microorganisms by near-infrared Raman spectroscopy.* *Journal of Applied Physics* **94**, 6138, 2003.
- [52] WODD, B. R. *et al.* *Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation.* *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387** 1961, 2007.
- [53] MORTIZ, T. J. *et al.* *Characterisation of FXTAS related isolated intranuclear protein inclusions using laser tweezers Raman spectroscopy.* *Journal of Raman Spectroscopy* **41**, 33., 2010.
- [54] FONTES, A. *et al.* *Mechanical and electrical properties of red blood cells using optical tweezers.* *J. of Opt.* **13** 044012, 2011.
- [55] STEUBING R. W. *et al.* *Laser induced cell fusion in combination with optical tweezers: the laser cell fusion trap.* *Cytometry*, **12** 6 p.505-510, 1991.
- [56] LIANG, H. *et al.* *Micromanipulation of chromosomes in ptk2 cells using laser microsurgery (optical scalpel) in combination with laser-induced optical force (optical tweezers).* *Exp Cell Res*, **204** 1:110-120, 1993.
- [57] KOCH, S. J. *et al.* *Probing protein-dna interactions by unzipping a single DNA double helix.* *Biophys J*, **83** 2:1098-1105, 2002.
- [58] BAO, X. R.; LEE, H. J.; QUAKE, S. R.. *Behavior of complex knots in single dna molecules.* *Physical Review Letters*, **91** 26, 2003.
- [59] BUSTAMENTE, C.; BRYANT, Z.; SMITH, S. B.. *Ten years of tension: single-molecule dna mechanics.* *Nature*, **421** 6921:423-427, 2003.
- [60] CHU, S. *et al.* *Experimental observation of optcaly trapped atoms.* *Phys. Rev. Lett.* **57** 3: 314-317, 1986.

- [61] ASHKIN, A.. *History of optical trapping and manipulation of neutral particles using laser*. PNAS, **94** 10: 4853-4860, 1997.
- [62] HARADA, Y.; ASAKURA, T.. *Radiation forces on a dielectric sphere in the rayleigh scattering regime*. Optics Communications, **124** 5-6:529-541, 1996.
- [63] VAN DE HULST, H. C.. *Light Scattering by Small Particles*. Reprint. Originally published: New York : Wiley. Dover Publications, p.200-224, 1981.
- [64] FONTES, ADRIANA. *Sistema de Micromanipulação e Microanálise com Pinças Ópticas*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física, 2004.
- [65] INGRAM, PAUL F. *Optical Tweezers and their applications in Biophysics Research and Education*. Thesis, The College of Arts and Sciences Ohio University, 2008.
- [66] FONTES, ADRIANA. *Uso de lasers para manipulação e medida de células vivas*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física, 1999.
- [67] OLYMPUS IX71. Disponível em: [http://www.olympuslatinoamerica.com/portuguese/seg/seg\\_product\\_detail\\_port.asp?g=839&d=2&s=14&c=55#](http://www.olympuslatinoamerica.com/portuguese/seg/seg_product_detail_port.asp?g=839&d=2&s=14&c=55#). Acesso em jul. 2014.
- [68] SMITH, Z. J. *et al. Integrated Raman and angular scattering microscopy reveals chemical and morphological differences between activated and nonactivated CD8+ T lymphocytes*. Journal of Biomedical Optics **15** 3, 2010.
- [69] BEUTLER, E. *et al. William's Hematology*. McGraw-Hill New York, 5<sup>a</sup> ed. p.349–425, 1995.
- [70] DISCHER, D. E.; CARL, P.. *New insights into red cell network structure, elasticity, and spectrin unfolding—a current review*. Cell Mol Biol Lett **6** p.593–606, 2001.
- [71] HOWARD, J. L.. Disponível em: <http://www.howardluksmd.com/general-faq/what-is-prp-or-platelet-rich-plasma/>. Acesso em out. 2014.



[72] ROUX-DALVAI, F. *et al.* Extensive analysis of the cytoplasmic proteome of human erythrocytes using the peptide ligand library technology and advanced mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* **7**, 2254–2269, 2008.

[73] HSIA, CC. *Respiratory function of hemoglobin*. *N Engl J Med* **47** 338:239, 1998.

[74] GENOMASUR. Disponível em: <http://genomasur.com/lecturas/Guia02-2.htm>. Acesso em out. 2014.

[75] BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H.. *Bioquímica Médica*. 1ª ed. São Paulo: Manole, p. 21-25, 31-37, 2000.

[76] LORENZI, T. F.. *Manual de Hematologia propedêutica e clínica*. 4ª. ed. Guanabara Koogan, p.44-60, 2006.

[77] DHAKE, K. Disponível em: <http://www.buzzle.com/articles/structure-ofhemoglobin.html>. Acesso em out. 2014.

[78] ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R.. *Hematologia: fundamentos e prática*. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, p.270-273, 2004.

[79] SMITH, Z. J. *et al.* *Precise Monitoring of Chemical Changes Through Localization Analysis of Dynamic Spectra (LADS)*. *Appl Spectrosc* **67** 187, 2013.

[80] NCSU. Disponível em: [http://www4.ncsu.edu/~franzen/public\\_html/CH431/lecture/Group\\_Theory.pdf](http://www4.ncsu.edu/~franzen/public_html/CH431/lecture/Group_Theory.pdf). Acesso em set. 2014

[81] ABE, M.; KITAGAWA, T.; KYOGOKU, Y.. *Resonance Raman spectra of octaethylporphyrinato-Ni(II) and meso-deuterated and 15N substituted derivatives. II. A normal coordinate analysis*. *J. Chem. Phys.* **69**, 4526–4534, 1978.

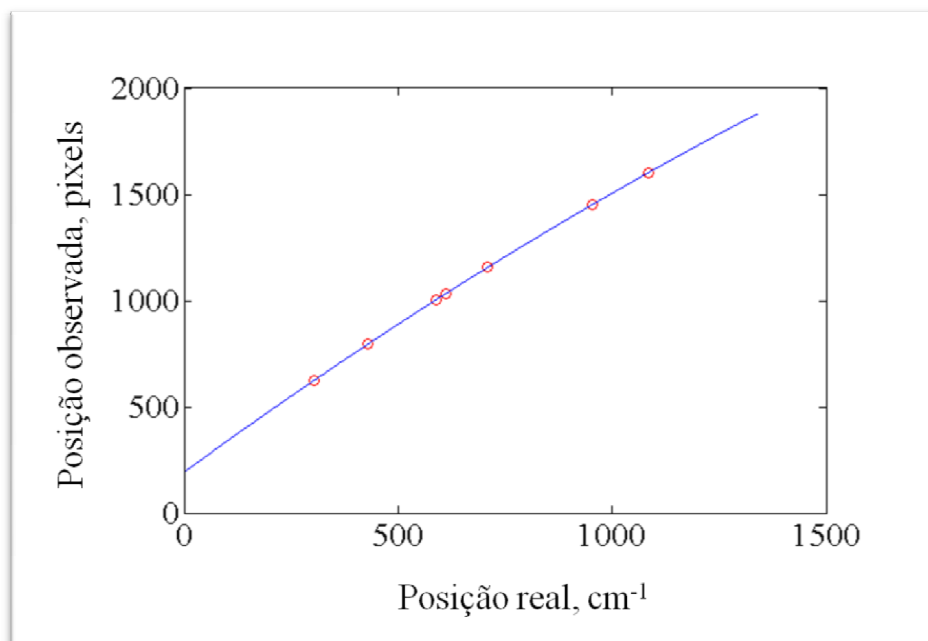
[82] WOOD, B. R. *et al.* *Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near infrared excitation*. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 1691–1703, 2007.

- [83] WOOD, B. R.; TAIT, B.; MCNAUGHTON, D.. *Micro-Raman characterization of the R to T state transition of haemoglobin within a single living erythrocyte*. *Biochim. Biophys. Acta* **1539**, 58–70, 2001.
- [84] HU, S.; SMITH, K. M.; SPIRO, T. G.. *Assignment of protoheme resonance Raman spectrum by heme labeling in myoglobin*. *J. Am.Chem. Soc.* **118**, 12638–12646, 1996.
- [85] WOOD, B. R.; MCNAUGHTON, D.. *Raman excitation wavelength investigation of single red blood cells in vivo*. *J. Raman Spectrosc.* **33**,517–523, 2002.
- [86] RAMSER, K. *et al.* *Resonance Raman spectroscopy of optically trapped functional erythrocytes*. *J. Biomed. Opt.* **9**, 593–600, 2004.
- [87] DE LUCA, A. C. *et al.* *Spectroscopical and mechanical characterization of normal and thalassemic red blood cells by Raman tweezers*. *Opt. Express* **16**, 7943–7957, 2008.
- [88] GIORDANO, P. C.; HARTEVELD C. L.; BAKKER, E.. *Genetic Epidemiology and Preventive Healthcare in Multiethnic Societies: The Hemoglobinopathies*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **11** 6136-6146, 2014.
- [89] THOM, C. S. *et al.* *Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates*. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **1** 3, 2013.
- [90] BRASIL. Ministério da Saúde. *Guia para o uso de hemocomponentes*. Brasília-DF 1ª ed. p.18, 2010.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A – ALGORÍTMO DE CARACTERIZAÇÃO DE ESPECTROS RAMAN

O algoritmo de caracterização de espectros Raman utilizado nesta tese realiza todo o processamento de dados na plataforma Matlab. Os espectros adquiridos em série, através do software WINSPEC, e registrados pela câmera CCD, formam um arquivo binário com extensão .SPE. O algoritmo converte esses espectros em série para um arquivo de texto delimitado por tabulação. Antes mesmo dos ajustes, dos espectros em série das hemácias, adquire-se o espectro Raman de um material de referência, que é utilizado para calibração do espectrômetro. Utilizou-se o poliestireno como referência. O espectro Raman, mostrado na Figura 2.10, foi calibrado por sete picos Raman do poliestireno: 620,9 ; 795,8 ; 1001,4 ; 1031,8 ; 1155,3 ; 1450,5 ; e 1602,3  $\text{cm}^{-1}$ . Para isso, mediu-se a posição central, em pixels, desses picos Raman bem conhecidos na literatura e uma curva de ajuste polinomial foi obtida. A Figura A.1 mostra o ajuste polinomial utilizado para calibração do espectrômetro.



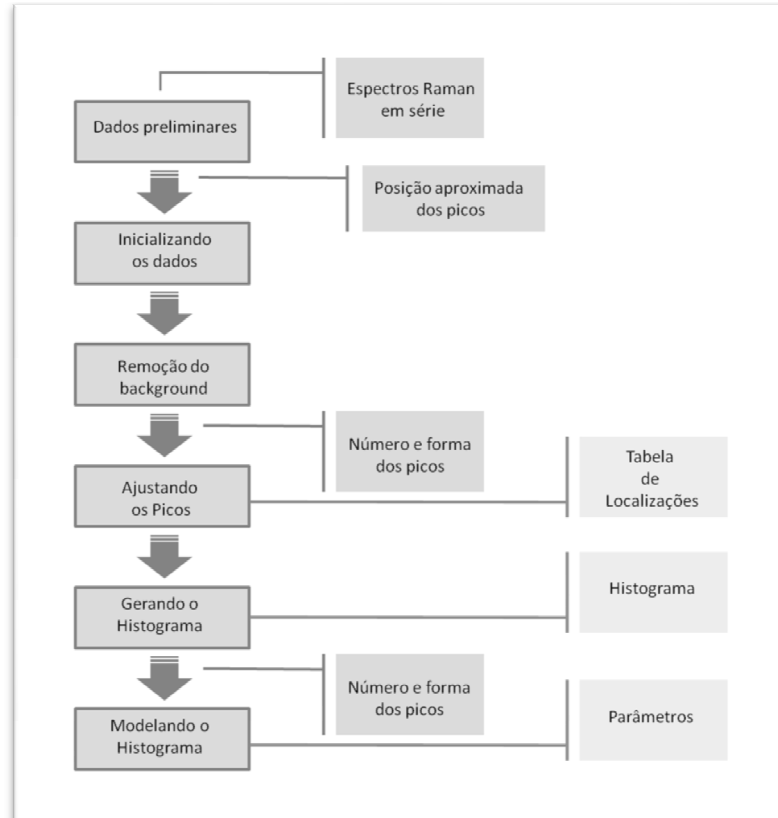
**Figura A.1.** Curva polinomial de calibração do espectrômetro, utilizando os picos Raman do poliestireno: 620,9 ; 795,8 ; 1001,4 ; 1031,8 ; 1155,3 ; 1450,5 ; e 1602,3  $\text{cm}^{-1}$ .

Os espectros, na região de 200 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ , foram processados em 7 bandas. Cada banda do espectro teve seu ajuste por uma curva Gaussiana, com o número de picos a ser determinado com base no conhecimento a priori do espectro da amostra, como mostrado na Tabela A.1

**Tabela A.1.** Região espectral estudada. Localização aproximada dos picos das bandas Raman das hemácias.

<b>Banda Raman</b>				
<b>Número de onda inicial (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Número de onda final (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Número de Picos</b>	<b>Posição (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Largura (cm<sup>-1</sup>)</b>
<b>630</b>	<b>700</b>	1	666	20
<b>700</b>	<b>800</b>	1	750	15
<b>910</b>	<b>1025</b>	3	935	20
			977	30
			1002	20
<b>1190</b>	<b>1280</b>	2	1220	25
			1246	25
<b>1280</b>	<b>1410</b>	4	1310	25
			1338	25
			1371	20
			1395	10
<b>1410</b>	<b>1500</b>	1	1450	10
<b>1530</b>	<b>1595</b>	3	1546	15
			1560	20
			1582	10

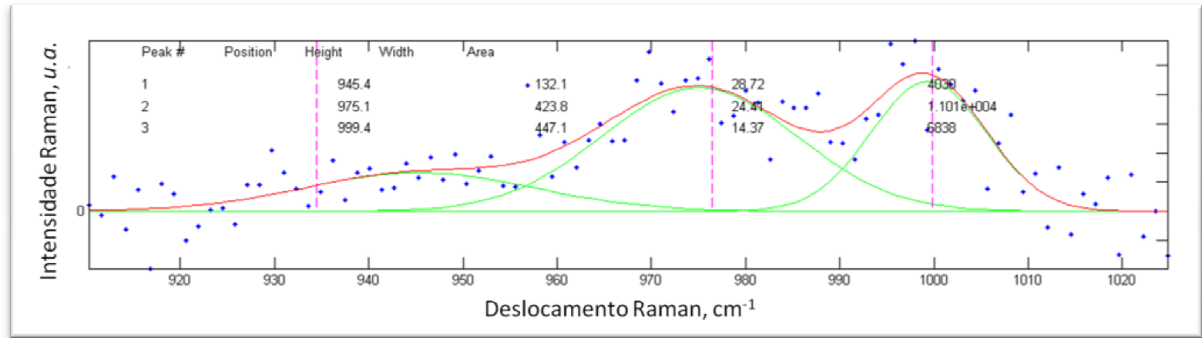
Os dados na Tabela A.1 funcionam como parâmetros iniciais para os ajustes, e não é necessária uma precisão refinada. Um diagrama básico de processamento está representado, na Figura A.2.



**Figura A.2** Diagrama de operação do algoritmo de caracterização de curvas espectrais. Fonte: Arquivo do autor.

Cada região espectral tem seu background removido, por uma correção de linha de base, antes do ajuste. Os ajustes fornecem a posição, largura, e altura dos picos de cada banda, sendo capaz de processar múltiplos picos simultaneamente.

A Figura A.3 mostra o processamento da região entre  $910$  e  $1025\text{ cm}^{-1}$ , onde 3 picos são processados simultaneamente. Os dados experimentais estão representados pelos pontos. Neste caso, a banda desta região é ajustada por uma exponencial tripla, representada pela linha vermelha. As curvas representadas pelas linhas em verde são os ajustes de cada um dos três picos gaussianos, que compõem a banda.



**Figura A.3.** Processamento dos dados experimentais (pontos), na região espectral entre 910 e 1025  $\text{cm}^{-1}$ . A banda é ajustada por uma exponencial tripla (linha vermelha). As curvas representadas pelas linhas em verde são os ajustes de cada um dos três picos gaussianos, que compõem a banda.

## **APÊNDICE B – PARTICIPAÇÃO EM ESCOLAS E CONGRESSOS**

1. 3rd South American Workshop & International Gregorio Weber Conference on New trends in Advanced Fluorescence Microscopy Techniques. Buenos Aires, Argentina 12 a 17 de Dezembro (2011).
2. SPIE Photonics West. San Francisco,USA. 2 a 7 de Fevereiro (2013).
3. I ESCOLA DE ESPECTROSCOPIA RAMAN DO INMETRO. Campus do Inmetro em Xerém, Duque de Caxias/RJ. 22 a 24 de Julho (2013).
4. XXIV CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA BIOMÉDICA. Uberlândia/MG. 13 a 17 de Outubro (2014).



## APÊNDICE C – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

### ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. **DE OLIVEIRA, MARCOS A. S.; SMITH ZACHARY J. ; KNORR FLORIAN; DE ARAUJO, RENATO E. ; WACHSMANN-HOGIU, SEBASTIAN.** Long term Raman spectral study of Power-dependent photodamage in red blood cells. Applied Physics Letters, v.104, p. 103702, 2014.

### TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

1. **Marcos A. S. de Oliveira, Zachary J. Smith, Renato E. de Araujo e Sebastian Wachsmann-Hogiu. Microespectroscopia Raman para a avaliação de danos em hemácias aprisionadas por pinça óptica.** XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2014, Uberlândia-MG.  
**Anais do XXIV CBEB, 2014.**