

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
CAMPINAS

Instituto de Física Gleb Wataghin

Tese de Mestrado

Uso de Lasers para Manipulação e
Medida de Células Vivas

Autora: **Adriana Fontes**

Orientador: **Prof. Dr. Carlos Lenz Cesar**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Carlos Barbosa (IFGW-Unicamp)

Prof. Dr. Paulo Arruda (IB-Unicamp)

Agosto de 1999

Agradecimentos:

Aos meus pais Leonides e Dailson pela compreensão e apoio.

À meu orientador Carlos Lenz Cesar pela dedicação, estímulo e amizade.

Ao meu namorado Alexandre.

Aos meus amigos do laboratório: Mônica, Cristiane, Valéria e Raquel.

Aos meus amigos da pós-graduação.

À Simone.

Aos funcionários e amigos do DEQ: Raimundo, Júlio, Virginere e José Aparecido.

À FAPESP pela ajuda financeira essencial no desenvolvimento do trabalho.

Ao Hemocentro.

Resumo:

Neste trabalho usamos uma Pinça Óptica para quantificar propriedades essenciais responsáveis pelo bom desempenho da hemácia na corrente sanguínea. A Pinça Óptica consiste basicamente de um laser infravermelho que, quando focado no interior de uma partícula biológica de índice de refração maior do que o do meio onde está, é capaz de capturá-la e movimentá-la sem lhe causar danos. Usamos também essa microferramenta para medir forças da ordem de piconewtons em microesferas em função de seu deslocamento e dessa forma realizar uma calibração de um medidor de forças da ordem de *piconewtons*. Essas aplicações são feitas obrigando hemácias ou microesferas a se movimentarem em um fluido apropriado com velocidades controladas pelo computador.

Finalmente apresentamos uma outra microferramenta chamada Bisturi Óptico. Ela é composta de um laser pulsado operando no verde com o qual podemos produzir cortes em paredes e membranas celulares por absorção de luz transformada em calor. Acoplando a Pinça Óptica ao Bisturi Óptico fizemos manipulações biológicas tais como cortes em paredes vegetais e transporte de organelas entre células.

Abstract:

In this work we used an Optical Tweezer to quantify essential properties responsible for the efficiency of red blood cells in the blood stream. The Optical Tweezer consists basically of a infrared laser that, when focussed inside a biological particle, is capable of capturing and moving this particle with no harm to it. We also used this microtool to measure forces of piconewton order in microspheres in function of their displacements. Both, the calibration of the piconewtometer and the elasticity of red blood cells, were done by moving the trapped object in a field of hidrodynamical forces in viscous liquids with computer controlled speeds.

Finally we present another microtool, called Optical Scissors. It consists of a pulsed laser operating in the green range which allowed us to produce cuts and punched holes in walls and membranes of cells by absorption of light tranformed into heat. By coupling the Optical Tweezer to the Optical Scissors we succeed in making biological manipulations such as punch holes in vegetable cellular walls to transport organelles between two neighbouring cells.

Índice

1	Introdução	1
2	Teoria Óptica	5
2.1	Introdução	5
2.2	Modelo Teórico	10
2.3	Resultados Numéricos e Conclusões	16
3	Teoria Hidrodinâmica	21
3.1	Introdução	21
3.2	Modelo Teórico para Hemácias	26
3.3	Modelo Hidrodinâmico para Microesferas	31
4	Sistema Experimental	37
4.1	Pinça Óptica	37
4.2	Acoplamento do Sistema: Pinça Óptica + Bisturi Óptico.	43

4.2.1	Motivação	43
4.2.2	Bisturi Óptico	44
4.2.3	Resultados e Conclusões	48
5	Aplicações à Medida das Elasticidade e Viscosidade de Membranas de Hemácias	51
5.1	Motivação	51
5.2	Materiais e Métodos	53
5.3	Resultados e Conclusões	56
5.4	Aplicação do Método de Medida às Hemácias Estocadas.	62
6	Aplicações à Medida de Forças em Microesferas	65
6.1	Motivação	65
6.2	Materiais, Métodos e Resultados	67
6.3	Conclusão	77
7	Conclusão e Perspectivas	79
	Bibliografia	81
	Apêndices	85

Capítulo 1

Introdução

O laser tem sido um instrumento de trabalho cada vez mais utilizado na área da Biologia Celular e Medicina com propósitos de medidas, diagnóstico e como ferramenta de manipulação.

Dentre as várias utilizações de lasers nessas áreas, destaca-se o trabalho pioneiro de Ashkin e colaboradores. Em 1986, eles demonstraram o uso de uma técnica, nomeada pinça óptica, baseada na transferência de momento de fótons para capturar partículas dielétricas [11]. Posteriormente, a partir de 1987, eles aplicaram essa técnica na captura e manipulação de partículas biológicas com tamanhos variando de décimos a centenas de micra.

A princípio, Ashkin utilizou um laser de argônio ($\lambda = 514nm$). Porém, devido ao alto coeficiente de absorção de radiação no comprimento de onda visível, esse causava danos aos organismos vivos levando-os à morte celular [12]. Passaram, assim, a utilizar um laser Nd:YAG - Neodímio Yttrium Aluminum Garnet ($\lambda = 1064nm$). Como a maioria das substâncias que compõem o ser vivo são transparentes ao infravermelho, a absorção nessa região é pequena e não há danos nesses organismos. A partir de então, a pinça óptica tem sido utilizada basicamente em duas vertentes: manipulação direta de microorganismos e

medidas de propriedades mecânicas e de forças em sistemas biológicos.

Como microferramenta de manipulação, a pinça óptica acoplada com outra microferramenta nomeada bisturi óptico já foi utilizada para inserir DNA no interior de diferentes tipos de células [1], para conectar DNA ao silício na tentativa de construção de uma interface biomecânica [2], para fertilizações *in vitro* [4] e para fusão de células. O bisturi óptico é fundamental para uma completa manipulação celular pois é essencialmente um laser capaz de fazer perfurações em paredes e membranas celulares. Como os cortes são feitos por transferência de calor e não se pode danificar o material biológico, usa-se nessa ferramenta um laser pulsado operante no verde. Geralmente, os tecidos orgânicos têm alta absorção nessa região do espectro.

Por outro lado, como microferramenta de medida, a pinça óptica já foi utilizada para medir e comparar deslocamentos celulares e forças de miosinas cardíacas [5], para caracterização de motores biológicos moleculares [3] e rigidez flexural de microtúbulos [6], para medir o comprimento de uma molécula de DNA [7] e a motilidade de espermatozóides humanos [8], para detectar concentrações ao nível de femtomolar de antígenos [9] e para observar a ausência de travamento do movimento de rotação reversa de flagelos motores de bactérias [10].

Nesta dissertação apresentaremos aplicações da pinça óptica e do bisturi óptico, tais como, manipulações em células vegetais, medida de propriedades de membranas de hemácia e medidas de força da ordem de *piconewtons* em microesferas. Também apresentaremos um tratamento teórico dos processos envolvidos nessas aplicações.

A função das hemácias na corrente sanguínea está fortemente ligada a sua deformabilidade que é mantida pelas propriedades de elasticidade e viscosidade de sua membrana. A fim de quantificar essas propriedades simulamos a deformação dessas células no laboratório. Para isso, capturamos a hemácia com a pinça óptica, a submetemos a velocidades constantes e estudamos as forças elástica e hidrodinâmica que agem sobre a mesma. A

determinação da elasticidade e viscosidade é muito importante pois a partir de uma caracterização de hemácias normais podemos observar, por exemplo, o quanto as hemácias doentes ou o quanto as hemácias estocadas para transfusão estão com suas propriedades alteradas.

Para medidas de forças em microesferas calculamos, teórica e experimentalmente, as forças óptica e hidrodinâmica atuantes sobre essa partícula quando induzida a movimentar-se em um líquido. Um dos objetivos de medir forças em microesferas é poder determinar forças atuantes em partículas de geometria complexa. O cálculo de forças óptica e hidrodinâmica em objetos que não são esféricos é praticamente impossível. Assim, a microesfera é usada como um calibrador cuja precisão está intimamente ligada com a concordância entre as forças que agem sobre a mesma. Do mesmo modo que o centro da microesfera sofre um deslocamento na direção contrária ao seu movimento no líquido, ele também sofrerá quando a microesfera estiver acoplada a partícula causadora da força que se quer determinar. Podemos usar o deslocamento como uma medida do valor dessa força. Afinal, ela é igual e contrária a força óptica, que por sua vez é calibrada com esse deslocamento.

Outro objetivo de medir forças em microesferas é permitir a determinação de valores de viscosidades de fluidos em geral. O processo de medida é o mesmo do cálculo de forças de partículas, movimentamos a esfera no líquido que se quer caracterizar e medimos o deslocamento sofrido pela mesma. Dado o deslocamento temos o valor da força óptica, no equilíbrio essa é igual a força hidrodinâmica que é uma função da viscosidade do fluido. A vantagem desse método com a pinça óptica frente a outros é a pequena quantidade de líquido necessária para a medida ($1\mu L$). Assim, uma das suas possíveis aplicações seria determinação de viscosidades de fluidos que não dispomos em grande quantidade, tais como líquidos biológicos.

Finalmente, para a realização das manipulações em células vegetais desenvolvemos o bisturi óptico, a pinça óptica já está em operação em nosso laboratório desde 1990.

Capítulo 2

Teoria Óptica

2.1 Introdução

Neste capítulo desenvolveremos um modelo teórico para a força que a pinça óptica exerce em microesferas a fim de usá-lo na comparação com um modelo hidrodinâmico e futuramente em cálculos de forças em sistemas biológicos e de viscosidades. Porém, antes de entrarmos diretamente na questão, é importante termos uma idéia geral dessa microferramenta.

As pinças ópticas a laser consistem basicamente em um feixe de laser infravermelho que, após incidir perpendicularmente a uma lente, tem seus raios fortemente focados num ponto interior a uma partícula ou amostra. Essas pinças ópticas, como já falado antes, podem ser usadas para capturar, mover e posicionar uma ampla variedade de células. A forma mais simples de entender o princípio de operação da “armadilha óptica” é examinar dois raios, um de cada lado de um feixe de laser cônico, que se encontrariam no foco se não existisse um objeto capturado de índice de refração maior do que o meio a sua volta.

Para comprimentos de ondas menores do que as partículas aprisionadas, a captura

pode ser entendida a partir da óptica geométrica. Essa “armadilha” óptica acontece devido a transferência de momento do fóton para o objeto capturado. Pode-se imaginar o fóton como uma partícula que ao ter sua trajetória desviada obriga o objeto que a desviou a sofrer um recuo na direção de \vec{F} , como mostra a figura 1a. Os raios a e b da figura 1b se encontrariam no foco f se não houvesse uma esfera com índice de refração diferente do meio exterior. O desvio desses raios produzem os recuos na direção \vec{F}_a e \vec{F}_b , e a combinação dos dois leva ao recuo na direção \vec{F} . Note que o recuo \vec{F} tende a obrigar o centro o da esfera a coincidir com o foco do laser f . Dessa forma, um feixe de laser focalizado cria uma armadilha que mantém o centro das partículas no seu foco. O mesmo se dá para quando o foco está em outra posição (figura 2). Quando o foco do laser coincide com o centro o , o raio passa sem sofrer desvio e não há mais forças agindo na partícula (figura 3).

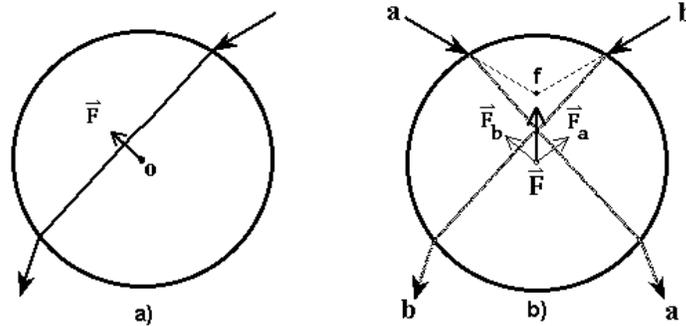


Figura 1: Esquema de captura, foco em z acima do centro o .

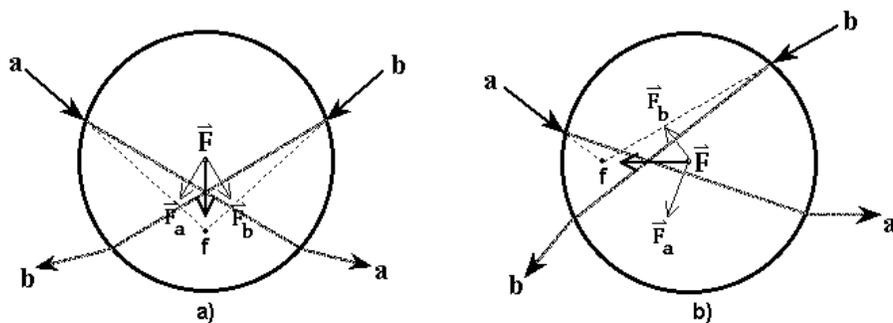


Figura 2: Esquema de captura, foco em z abaixo do centro o e foco em x .

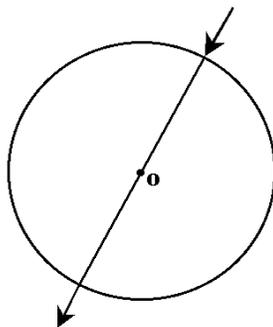


Figura 3: Raios passando pelo centro o.

Note, o fóton não tem um momento muito grande, por isso essas forças somente são consideráveis porque a partícula é da ordem de micrometros ou menor (para esse último caso, o modelo óptico não se aplicaria e sim o modelo eletromagnético). De fato, tome por exemplo um laser de $1W$ de potência. Sendo o momento de um fóton $p_{fóton} = h\nu/c$:

$$F = \frac{dp}{dt} = \frac{n^{\circ} \text{fótons}}{\text{tempo}} \times p_{fóton} = \frac{\text{potência}}{h\nu} \times \frac{h\nu}{c} = \quad (2.1)$$

$$\frac{\text{potência}}{c} \Rightarrow F = \frac{1W}{3 \cdot 10^8 m/s} \cong 3 \cdot 10^{-9} N.$$

Suponha primeiramente uma partícula cúbica de $1\mu m$ de aresta com densidade igual a da água, ou seja

$$m = 10^3 \frac{kg}{m^3} \times (10^{-6})^3 m^3 = 10^{-15} kg \quad (2.2)$$

a aceleração feita pelo laser nessa partícula é então

$$a = \frac{F}{m} = \frac{3 \cdot 10^{-9} N}{10^{-15} kg} = 3 \cdot 10^6 m/s^2 = 3 \cdot 10^5 \cdot g \quad (2.3)$$

onde g é a aceleração da gravidade. Suponha agora uma partícula cúbica de $1mm$ de aresta, temos

$$m = 10^3 \frac{kg}{m^3} \times (10^{-3})^3 m^3 = 10^{-6} kg \quad (2.4)$$

$$a = \frac{F}{m} = 3 \cdot 10^{-3} m/s^2 = 3 \cdot 10^{-2} \cdot g. \quad (2.5)$$

Dessa forma fica claro que a aceleração causada pela força do laser só é considerável para partículas microscópicas. Para partículas macroscópicas essa aceleração é desprezível e não é possível capturar e mover a partícula. Na prática essa força óptica é ainda menor que $10^{-9} N$, da ordem de dezenas de *piconewtons*.

É também importante dizer que estamos exemplificando o funcionamento da pinça óptica com dois raios do laser mas na realidade é um cone de raios que incide na partícula. Independentemente da posição do foco, a expressão para a força é sempre obtida somando-se as contribuições de cada raio.

Os raios, quando focados, permitem não só que a partícula fique presa somente com a ação do laser, como também que movamos a partícula nas três dimensões. Caso os raios não fossem focados teríamos um falso trapping (ver figura 4 e 5), que na verdade só prende a partícula se houver uma força contrária a do laser agindo sobre a mesma. Devido a essa força contrária só podemos movimentar o objeto em duas dimensões.

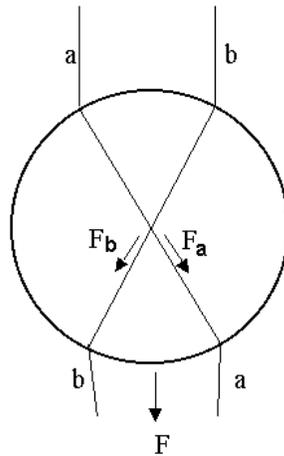


Figura 4: Falso trapping, raios simétricos em z.

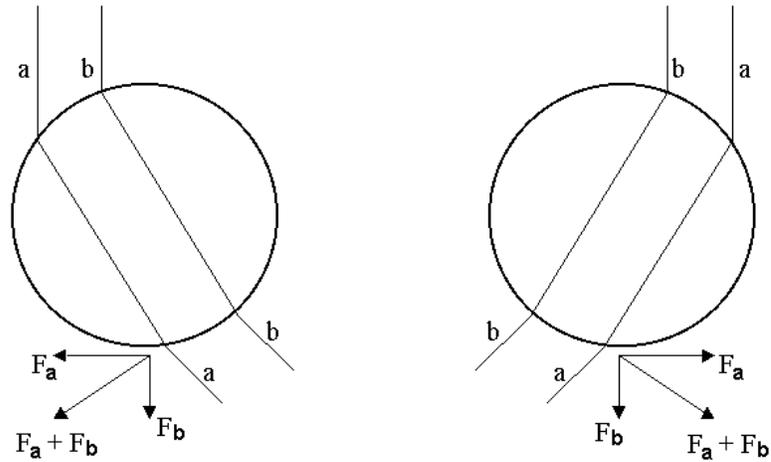


Figura 5: Falso trapping, raios antisimétricos em z .

A explicação acima exemplifica claramente como a partícula é presa, mas na realidade, mesmo na aproximação geométrica, os raios de laser não são só transmitidos como também refletidos e retransmitidos várias vezes no interior da partícula. Portanto a física do problema não é tão simples e é isto que vamos mostrar a seguir. Se não considerarmos esse processo de sucessivas reflexões e transmissões, a teoria não permite obter resultados quantitativos próximos aos experimentais.

Calcularemos as forças que agem em uma amostra esférica. Teoricamente, pode-se considerar essa amostra como uma região esférica de índice de refração distinto do meio que a circunda. Após atravessar a lente, o feixe convergente para o foco, localizado no interior dessa amostra, pode ser descrito como um conjunto de vetores na região cônica definida pela lente e o foco (figura 6). A direção do eixo desse cone é a mesma que a do feixe incidente na lente.

2.2 Modelo Teórico

Dadas as direções do feixe incidente e do segmento que une o centro da amostra ao foco, podemos usar um sistema de coordenadas conveniente (ver figura 6). Assumiremos como z a primeira dessas direções, e que o plano xz contém o segmento dado. Fixando a origem no foco e usando coordenadas esféricas (ρ, θ, φ) , o cone do feixe convergente está contido numa região determinada por $0 \leq \theta \leq \theta_{max}$. Nesse contexto, consideramos um raio como sendo um diferencial $d\theta d\varphi$ nessa região, cuja potência é proporcional à área na superfície da lente que esse diferencial abrange. Essa área é proporcional a $\tan \theta \sec^2 \theta d\theta d\varphi$.

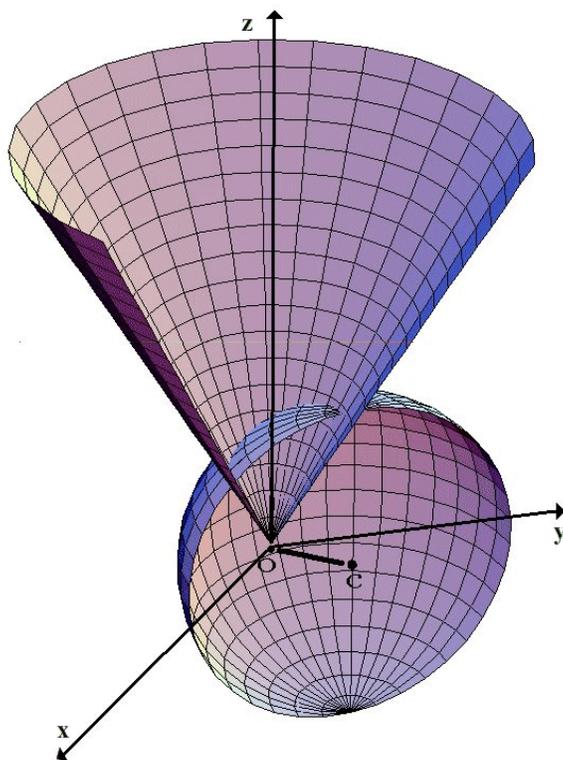


Figura 6: Feixe do laser, sistema de coordenadas e esfera.

De fato, podemos descrever algebricamente a superfície da lente usando o sistema de coordenadas adotado, e dessa forma tomar um elemento diferencial de área nessa

superfície. Sendo f a distância focal, um ponto genérico na superfície da lente faz parte do conjunto

$$\{(\rho \sin \theta \cos \varphi, \rho \sin \theta \sin \varphi, \rho \cos \theta) \text{ tal que } \rho \cos \theta = f, 0 \leq \theta \leq \theta_{max}\} \quad (2.6)$$

ou ainda,

$$(\rho \sin \theta \cos \varphi, \rho \sin \theta \sin \varphi, \rho \cos \theta) = (f \tan \theta \cos \varphi, f \tan \theta \sin \varphi, f). \quad (2.7)$$

Diferenciando em relação a θ , resulta o vetor

$$(f \sec^2 \theta \cos \varphi d\theta, f \sec^2 \theta \sin \varphi d\theta, 0) \quad (2.8)$$

que tem comprimento $f \sec^2 \theta d\theta$.

Na direção φ , a diferencial é

$$(-f \tan \theta \sin \varphi d\varphi, f \tan \theta \cos \varphi d\varphi, 0), \quad (2.9)$$

que tem comprimento $f \tan \theta d\varphi$.

Assim, o elemento de área é dado por $f^2 \tan \theta \sec^2 \theta d\theta d\varphi$.

Calcularemos então primeiramente a força devido a um único raio de potência P e momento incidente (por unidade de tempo) dado por $n_1 P/c$, onde n_1 é o índice do meio. Após incidir na superfície da microesfera dielétrica com um ângulo σ em relação à normal, esse é parcialmente refletido e parcialmente refratado. A porção transmitida interage com a superfície interna, dando origem a uma série de raios espalhados que emergem da amostra com potências sucessivamente menores. Portanto, do raio incidente resultam raios emergentes com potências $PR, PT^2, PT^2R, \dots, PT^2R^n$, etc. As quantidades R e T são os coeficientes de reflexão e transmissão de Fresnel. Na figura 7 é esquematizado esse

processo. Denotamos por x o ângulo de refração.

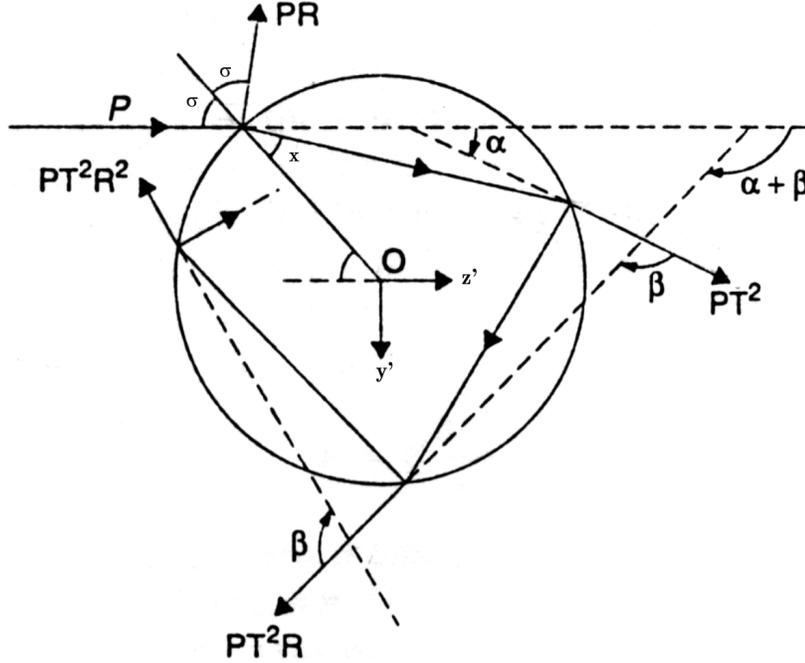


Figura 7: Esquema de reflexões e transmissões.

Em relação ao raio incidente, os ângulos dos raios espalhados são $\pi + 2\sigma$, α , $\alpha + \beta$, ..., $\alpha + n\beta$, etc.

Assim, de acordo com o sistema de coordenadas (y', z') na figura, obtemos as seguintes expressões de força:

$$F_{z'} = \frac{n_1 P}{c} \left[1 - R \cos(\pi + 2\sigma) + \sum_{n=0}^{\infty} T^2 R^n \cos(\alpha + n\beta) \right], \quad (2.10)$$

$$F_{y'} = \frac{n_1 P}{c} \left[-R \sin(\pi + 2\sigma) + \sum_{n=0}^{\infty} T^2 R^n \sin(\alpha + n\beta) \right]. \quad (2.11)$$

Essas forças podem ser descritas no plano complexo como $F_c = F_{z'} + iF_{y'}$. Nessa

forma, a soma em n é uma série geométrica, e temos

$$F_c = \frac{n_1 P}{c} \left(1 + R \exp(2i\sigma) - T^2 \exp(i\alpha) \left[\frac{1}{1 - R \exp(i\beta)} \right] \right). \quad (2.12)$$

Pela figura 7 também obtêm-se $\alpha = 2(\sigma - x)$ e $\beta = \pi - 2x$ por simples geometria.

Sendo n_2 o índice de refração da microesfera e $n = n_1/n_2$ o índice relativo. Temos, pela lei de Snell, $\sin x = n \sin \sigma$. Como $0 \leq x \leq \pi/2$, vale $\cos x = \sqrt{1 - \sin^2 x}$.

Dessa forma, os ângulos x , α e β dependem do ângulo de incidência σ . Na verdade, basta explicitar as dependências entre as exponenciais complexas desses ângulos. A saber, essas são dadas por

$$\exp i\alpha = \left(\frac{\exp i\sigma}{\exp ix} \right)^2 \quad (2.13)$$

e

$$\exp i\beta = -(\exp ix)^{-2}. \quad (2.14)$$

Cada uma dessas forças ($F_{z'}$, $F_{y'}$) é dependente da polarização devido aos coeficientes de Fresnel. A reflectância R e a transmitância T são obtidas considerando-se um laser linearmente polarizado incidindo obliquamente em uma superfície. Se o laser estiver polarizado paralelamente ao plano de incidência, R e T são dadas por

$$R_p = \left(\frac{\tan(\sigma - x)}{\tan(\sigma + x)} \right)^2 \quad \text{e} \quad T_p = 1 - R_p \quad (2.15)$$

Por outro lado, se o laser está polarizado perpendicularmente ao plano de incidência, R e T são

$$R_s = \left(\frac{\sin(x - \sigma)}{\sin(x + \sigma)} \right)^2 \quad \text{e} \quad T_s = 1 - R_s \quad (2.16)$$

Assim, R e T são também funções do ângulo de incidência σ .

Obtida a força F_c no sistema (y', z') , é preciso escrevê-la no sistema de coordenadas (x, y, z) .

Consideremos o centro da esfera no plano xz (*figura 8*) a uma distância r ($0 < r < 1$) do foco e a um ângulo γ com o eixo z ou seja, na posição dada pelo vetor $(\vec{r} = r \sin \gamma, 0, \cos \gamma)$.

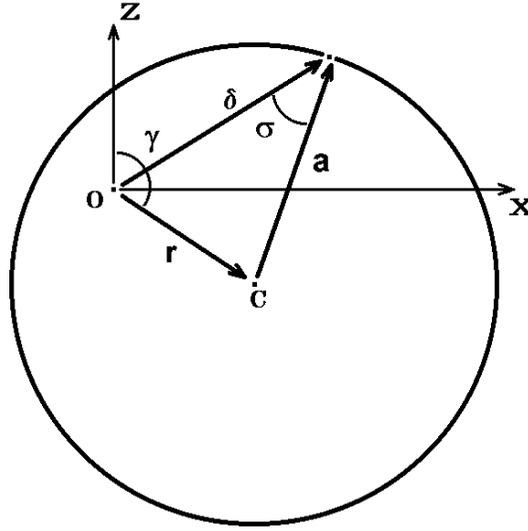


Figura 8: Parâmetros e sistema de coordenadas.

Cada raio no cone é descrito pelas coordenadas (θ, φ) que determinam a sua direção. Variando θ de 0 a θ_{max} e φ de 0 a 2π , todos os raios são considerados. O ângulo de convergência θ_{max} está relacionado à abertura numérica da objetiva pela relação $NA = D/2f$, onde f e D são a distância focal e o diâmetro da lente.

Fixemos um raio na direção (θ, φ) . Sendo $\vec{\delta}$ o vetor nessa direção que liga o foco ao ponto de incidência do raio na superfície, temos $|\vec{\delta} - \vec{r}| = a$ (a é o raio da esfera). Essa equação determina unicamente o módulo do vetor $\vec{\delta}$. Para

$$\vec{\delta} = (d \cos \varphi \sin \theta, d \sin \varphi \sin \theta, d \cos \theta) \quad (2.17)$$

resulta

$$d = \sqrt{1 - \left(\frac{r}{a}\right)^2 + \left(\frac{r}{a}\right)^2 (\sin \gamma \sin \theta \cos \varphi - \cos \gamma \cos \theta)^2} - \left(\frac{r}{a}\right) (\sin \gamma \sin \theta \cos \varphi - \cos \gamma \cos \theta). \quad (2.18)$$

Pela lei dos cossenos,

$$\cos \sigma = \frac{1 + d^2 - (r/a)^2}{2d}. \quad (2.19)$$

Sendo $0 \leq \sigma \leq \pi/2$, vale $\sin \sigma = \sqrt{1 - \cos^2 \sigma}$, e esse ângulo fica bem determinado como função dos módulos r e d . Temos determinadas então as forças $F_{z'}$ e $F_{y'}$ para o raio em (θ, φ) .

Da forma que são definidos os versores \hat{z}' e y' , vemos que \hat{z}' está na direção e sentido do raio incidente, e y' é perpendicular a esse e contido no semiplano determinado pela direção de \vec{r} .

Os versores \hat{z}' e y' escritos no sistema (x, y, z) são então dados por

$$\hat{z}' = (-\cos \varphi \sin \theta, -\sin \varphi \sin \theta, -\cos \theta) \quad (2.20)$$

e

$$y' = \frac{\hat{z}' \times (\vec{r} \times \hat{z}')}{|\hat{z}' \times (\vec{r} \times \hat{z}')|}. \quad (2.21)$$

Desse modo, a força resultante para o raio em questão é

$$\vec{F} = (\operatorname{Re} F_c) \hat{z}' + (\operatorname{Im} F_c) y'. \quad (2.22)$$

A força total devido ao feixe é calculada pela integral

$$\mathbf{F} = \frac{\int_{\theta} \int_{\varphi} \vec{F} \tan \theta \sec^2 \theta \, d\theta \, d\varphi}{\int_{\theta} \int_{\varphi} \tan \theta \sec^2 \theta \, d\theta \, d\varphi} \quad (2.23)$$

Aqui, foi considerada a dependência da potência (e conseqüentemente da força) de cada raio com a área que ele abrange na superfície da lente. Dessa forma, a integral pode ser entendida como

$$\mathbf{F} = \frac{\int \vec{F} dA}{\int dA}. \quad (2.24)$$

Foi elaborado um programa computacional no *Mathematica* para integrar numericamente a expressão da equação (2.23) (ver apêndice). Isso foi feito de forma a poder variar os parâmetros γ , n e r para que possamos não só analisar o comportamento de \mathbf{F} como também obter valores numéricos de \mathbf{F} dadas as condições experimentais.

2.3 Resultados Numéricos e Conclusões

Nos gráficos abaixo não levamos em consideração o fator $n_1 P/c$ pois é constante e claramente não terá influência no comportamento desses.

Assumiremos, os valores $r = 0.5$, $\gamma = \pi/2$, $n = n_1/n_2 = 1.33/1.61$ e $\theta_{max} = 66^\circ$ ($NA = 1.25$) para quando não estiverem variando ou quando não mencionarmos o uso de outros valores. Escolhemos $n_2 = 1.61$ pois esse é o valor do índice de refração, para $\lambda = 1064nm$, das esferas que usaremos nas medidas (n_1 é o índice de refração da água). Também escolhemos $\theta_{max} = 66^\circ$ porque esse é o valor do ângulo de convergência da objetiva do nosso microscópio. E por fim escolhemos a polarização vertical ao plano de incidência pois esse é o caso do nosso laser. Os outros valores foram escolhidos arbitrariamente.

Primeiramente fizemos o gráfico da figura 9 das componentes F_x e F_z da força óptica em função de γ .

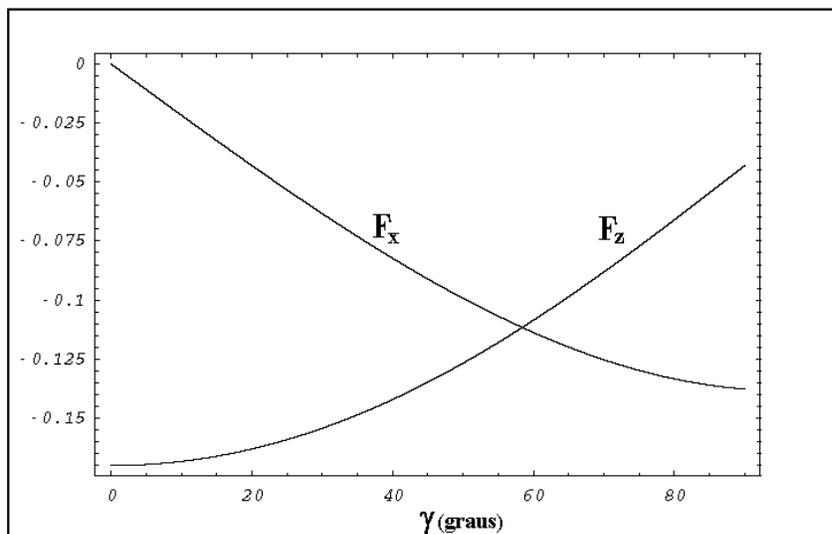


Figura 9: Gráfico das componentes F_x e F_z em função de γ .

Analisando a figura acima vemos que a componente z da força é grande para $\gamma = 0$ e diminui conforme γ aumenta, mas não é nula para $\gamma = 90^\circ$. Já a componente x da força tem comportamento contrário, é zero para $\gamma = 0$ e aumenta até atingir seu valor máximo quando $\gamma = 90^\circ$.

Para entendermos porque esse comportamento é correto, vamos olhar para as equações (2.10) e (2.11) das expressões de $F_{z'}$, $F_{y'}$ e para as figuras 10, 11 abaixo.

Essas figuras, mostram respectivamente as direções das forças $F_{z'}$ e $F_{y'}$ (de acordo com a definição de z' e y' dada na figura 7) para dois raios se encontrando simetricamente em f . Na primeira figura o foco está no eixo z ($\gamma = 0$) e na segunda o foco está no eixo x ($\gamma = 90^\circ$).

Embora R não seja zero e tenhamos contribuições de $F_{z'}$ e $F_{y'}$ para as componentes z e x da força, o comportamento em $\gamma = 0$ se justifica. Afinal $F_{y'}$ é sempre maior que

$F_{z'}$ e as contribuições de $F_{z'}$ em x se cancelam resultando em apenas uma componente da força não nula: F_z .

Por outro lado, o comportamento em $\gamma = 90^\circ$ justifica-se porque, embora as contribuições de $F_{y'}$ se cancelem em z , as contribuições de $F_{z'}$ não se cancelam e temos ainda uma força em z . Isso ocorre justamente porque o coeficiente de reflexão R não é nulo. Se R fosse nulo, o termo constante da equação (2.10) (que é igual a 1) se cancelaria com o termo de transmissão T^2 e $F_{z'}$ seria nula mas $F_{y'}$ não. Isso resultaria numa força total na direção x . Mas como R não é nulo, os termos positivos não cancelam os termos negativos em (2.10) e a força resultante é uma combinação de F_x e F_z .

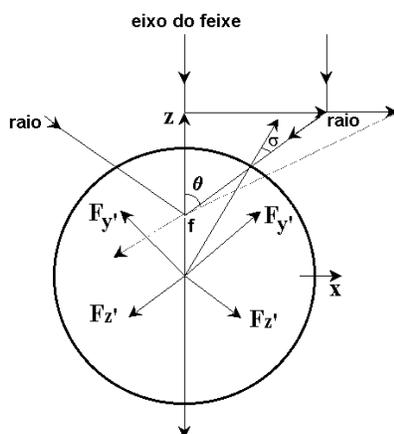


Figura 10: Esquema para $\gamma = 0$ (foco no eixo z).

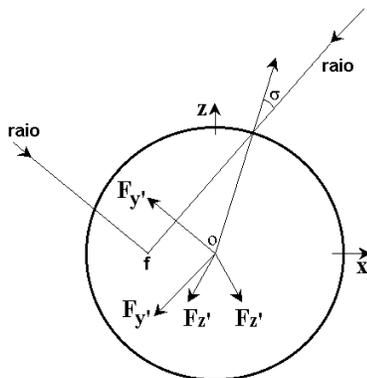


Figura 11: Esquema para $\gamma = 90^\circ$ (foco no eixo x).

Depois fizemos o gráfico das componentes F_x e F_z da força óptica em função da distância centro-foco r .

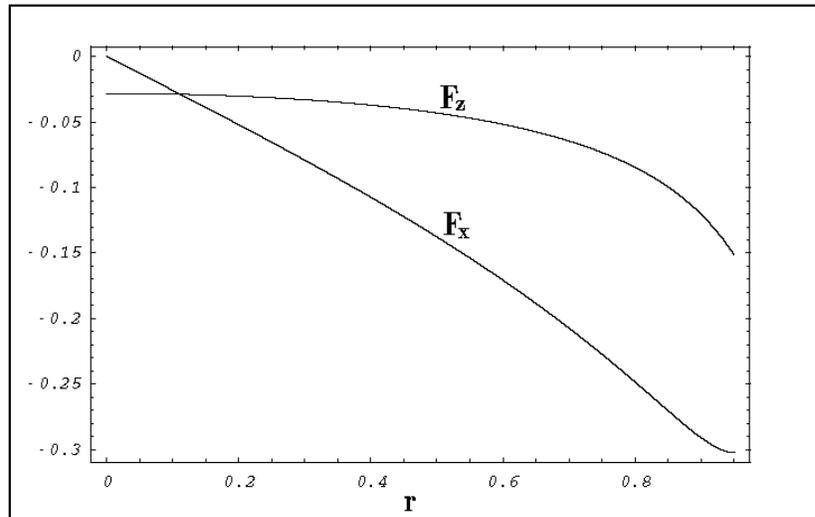


Figura 12: Gráfico das componentes F_x e F_z em função de r .

Analisando esse gráfico vemos que tanto F_x como F_z aumentam quando r aumenta. Note que a componente F_z nunca é nula, mesmo quando $r = 0$. Isso é por causa das reflexões e é intuitivo pois elas sempre vão empurrar a partícula. Na figura 13 podemos observar esse fato. As componentes horizontais dos primeiros raios refletidos se cancelam por simetria mas as componentes verticais não, então sempre haverá uma força em z agindo na partícula.

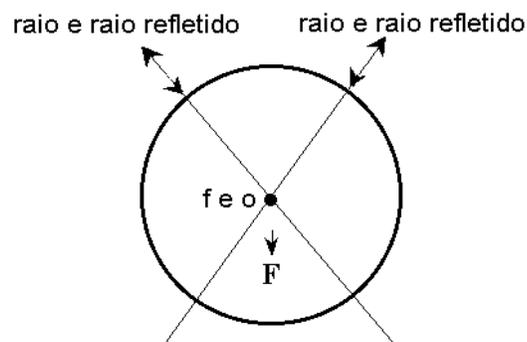


Figura 13: Reflexões para $r = 0$.

Para finalizar a análise fizemos o gráfico das componentes F_x e F_z da força óptica em função do índice de refração relativo $n = n_1/n_2 = n_{fluido}/n_{esfera}$.

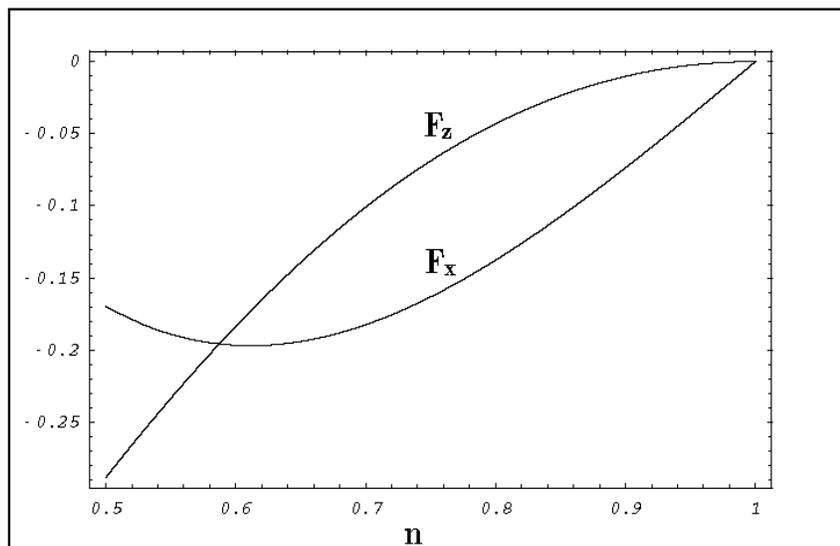


Figura 14: Gráfico das componentes F_x e F_z em função de n .

Analisando esse último gráfico vemos que ambas as componentes F_x e F_z diminuem quando n aumenta. Esse comportamento já era esperado pois quanto maior n mais perto o índice de refração da esfera está do índice de refração do meio em que ela está, e quanto mais perto estão esses índices de refração menor deve ser a força. Isso é coerente porque quando os índices (do meio e da amostra) são iguais, os raios passam pela esfera sem sofrer desvio, não ocorre reflexão e conseqüentemente não há força.

Em [11] Ashkin faz um modelamento totalmente geométrico da força e discute o seu comportamento quando variada a posição do foco e o índice de refração. O nosso modelo é diferente do proposto por Ashkin e tem um tratamento mais simplificado para a polarização, entretanto os nossos resultados estão completamente coerentes com os dele.

Capítulo 3

Teoria Hidrodinâmica

3.1 Introdução

Neste capítulo desenvolveremos a teoria elástica e hidrodinâmica que será a base para a obtenção das propriedades de elasticidade e viscosidade de membranas de hemácias. Essas propriedades caracterizam a deformação da célula que é causada pela força hidrodinâmica atuante na hemácia quando movimentada a uma velocidade constante em um líquido com o auxílio da pinça óptica. Note, aqui a força óptica só é utilizada para movimentar a célula.

Também desenvolveremos a teoria hidrodinâmica para microesferas que será a base para a comprovação do modelo óptico. Lembre que quando movimentamos uma esfera capturada pela pinça óptica a uma velocidade constante em um fluido, forças óptica e hidrodinâmica agem sobre a mesma. No equilíbrio essas forças são iguais. Assim se o modelo teórico e hidrodinâmico forem adequados, elas deverão coincidir experimentalmente.

Nos experimentos, as hemácias e microesferas estão em um fluido que está delimi-

tado pelo fundo da câmara de Neubauer (lâmina com $100\mu m$ de profundidade) e pela lamínula. Então, o primeiro passo para o desenvolvimento das teorias hidrodinâmica dessas partículas é analisar o comportamento desse líquido. As hemácias e esferas são acrescentadas a fluidos diferentes, mas veremos que o comportamento deles será o mesmo. De fato, qualquer fluido que estiver entre o fundo da lâmina e a lamínula sempre terá o mesmo comportamento, ou seja, estará no mesmo regime de escoamento.

Para a velocidade que usamos, da ordem de $200\mu m/s$, o fluido contido na câmara de Neubauer pode ser considerado incompressível, pois um líquido só é compressível quando a velocidade a que está submetido é maior que a velocidade do som ($340m/s$ no ar) nesse meio.

Considere um fluido formado de várias camadas com velocidades constantes em x (ver figura 15). Quando em regime viscoso, as camadas exercem entre si uma força tangencial à direção da velocidade do fluido, fazendo com que cada uma dessas tenha uma velocidade diferente em z .

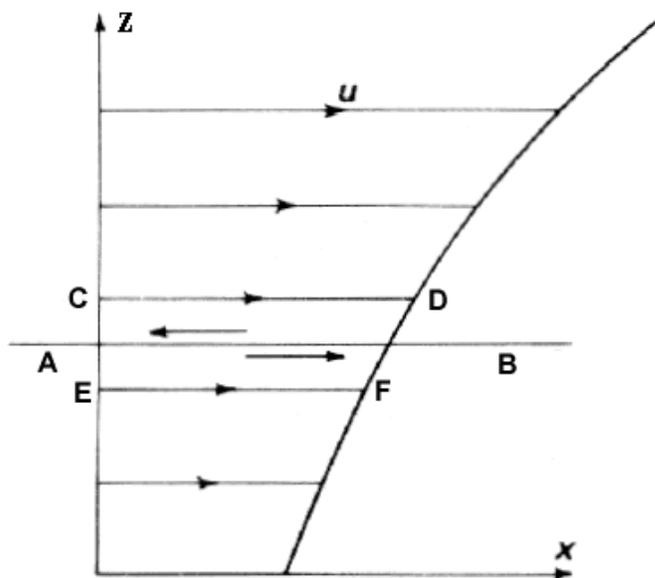


Figura 15: Esquema de camadas de um fluido viscoso.

Considere agora a camada AB com velocidade $v(x, z_1) = u$ constante em x . A camada CD com velocidade $v(x, z_1 + \Delta z_1) = u + \Delta u$ e a camada EF com velocidade $v(x, z_1 - \Delta z_1) = u - \Delta u$, exercem uma força igual e oposta em AB . Assim, não há somente uma pressão agindo sobre essa e outras camadas do líquido. Há também uma tensão interna T .

A tensão T é conhecida como ação viscosa e é dada por:

$$T = \eta \frac{dv}{dz}, \quad (3.1)$$

onde η é definido como coeficiente estático de viscosidade do fluido.

Como toda tensão é *força/área*, a camada arbitrária AB também sofre uma força F expressa por:

$$F_{AB} = F_{CD} - F_{EF} = \left[\eta \left(\frac{dv}{dz} \right)_{z_1 + \Delta z_1} - \eta \left(\frac{dv}{dz} \right)_{z_1 - \Delta z_1} \right] \Delta x \Delta y. \quad (3.2)$$

Se Δz_1 for muito pequeno,

$$F_{AB} = \frac{d}{dz} \left(\eta \frac{dv}{dz} \right) \Delta x \Delta y \Delta z = \eta \frac{d^2 v}{dz^2} \Delta x \Delta y \Delta z, \quad (3.3)$$

onde $\eta d^2 v / dz^2$ é a força viscosa por unidade de volume.

Caso v tenha componentes não constantes nas coordenadas x, y, z , a tensão T e a força F por unidade de volume serão:

$$T = \eta \nabla \cdot \vec{v} \quad \text{e} \quad \frac{F}{V} = \eta \nabla^2 \vec{v}. \quad (3.4)$$

Um líquido, no qual T e a força viscosa são dadas pelas expressões acima, é chamado fluido Newtoniano.

Não é preciso que os líquidos tenham viscosidade grande para sofrerem forças viscosas. Fluidos com viscosidade pequena, se estiverem delimitados por bordas, também podem estar em regime viscoso. Para decidir em qual regime está o líquido, analisa-se o número de Reynolds R e o tamanho da camada limite δ .

Considere que u é a velocidade de uma camada do líquido, L é a distância entre as bordas que o delimitam e ρ é sua densidade, o número de Reynolds é definido por:

$$R = \frac{\rho u L}{\eta}. \quad (3.5)$$

Um fluido sofre a ação de forças viscosas bem como de forças de inércia ocasionadas pela translação. A força de inércia é da ordem de mu^2/L e a força viscosa é da ordem de $\eta u V/L^2 = m\eta u/\rho L^2$, então

$$\frac{\textit{termo inercial}}{\textit{termo viscoso}} = o\left(\frac{mu^2/L}{m\eta u/\rho L^2}\right) = o(R). \quad (3.6)$$

Assim, o número de Reynolds é importante porque diz o quanto a força viscosa é maior ou menor que a inercial. Quando R é pequeno, o termo do denominador da equação é grande e o fluido está em regime viscoso. Quanto menor R , mais viscoso é o regime. Por outro lado quando R é muito grande, o termo inercial da equação também é muito grande e o fluido está em regime turbulento.

O tamanho da camada limite δ é a distância de L a partir da qual não existe mais gradiente de velocidade (ver figura 16) e é dada por:

$$\delta \approx \frac{L}{\sqrt{R}}. \quad (3.7)$$

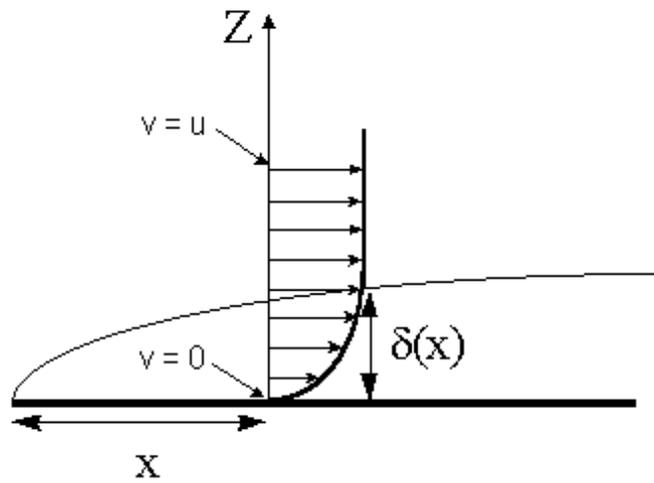


Figura 16: Camada limite.

De acordo com a expressão acima, a estimativa de δ só é necessária e importante quando o número de Reynolds R é grande. Para valores grandes de R , o tamanho da camada limite é menor que a distância entre as bordas L . As forças viscosas só atuarão na porção do fluido que está a uma distância δ de uma das bordas.

Para determinarmos o número de Reynolds e o tamanho da camada limite para o nosso experimento, consideraremos os maiores valores de ρ , u e o menor valor de η usados nas medidas. Essa escolha maximiza os parâmetros R e δ . A densidade é $\rho = 1.12g/cm^3$, a velocidade é $u = 350\mu m/s$ e a viscosidade é $\eta = 2.85 \text{ centipoise}$. O valor de L é fixo e vale $100\mu m$. Então,

$$R \leq 0.025 \text{ e } \delta \geq 630\mu m. \quad (3.8)$$

De posse dos valores do número de Reynolds R e da camada limite δ podemos concluir que todos os fluidos usados nas medidas estão em regime viscoso. Também podemos concluir que devido a velocidade u e a distância entre as bordas L serem sempre muito pequenas, R é pequeno e qualquer fluido que estiver delimitado entre o fundo da lâmina e a lamínula estará em regime viscoso.

Nos experimentos, o valor de u usado nas estimativas acima é tanto a velocidade da partícula capturada como a velocidade da camada de fluido adjacente a ela. Como veremos a seguir, a camada de líquido com maior velocidade é sempre a mais próxima ao objeto que está sendo capturado e movimentado.

3.2 Modelo Teórico para Hemácias

Como já dissemos anteriormente, as propriedades de elasticidade e viscosidade de membranas de hemácias são determinadas a partir da deformação sofrida por essa célula quando submetida a velocidade constante em um fluido. Então para obtermos essas propriedades, antes de mais nada, é necessário desenvolver um modelo para as várias forças atuantes na mesma. Para isso, assumiremos a hemácia como duas superfícies planas retangulares, distantes Z_1 do fundo da lâmina e Z_2 da lamínula. Podemos fazer essa consideração porque o comprimento da hemácia é muito maior que a sua largura.

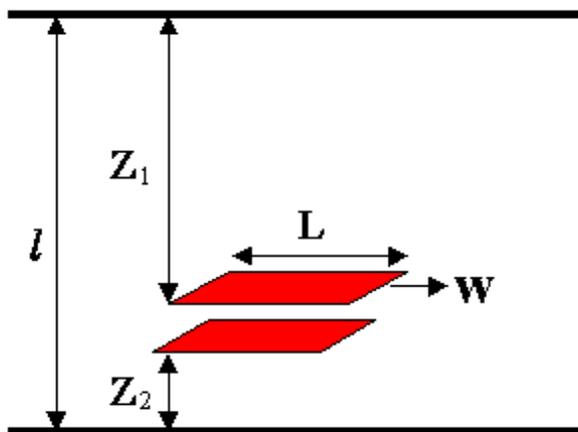


Figura 17: Hemácia entre a lâmina e a lamínula.

Do ponto de vista físico, tanto faz capturar a hemácia e movimentar as paredes

da lâmina e lamínula, como deixar essas paredes em repouso e movimentar o glóbulo vermelho capturado. Assim, consideraremos que a hemácia se move a uma velocidade constante u contra um fluido viscoso delimitado por bordas em repouso.

A equação de movimento para um líquido é chamada equação de Navier-Stokes e é dada por:

$$m \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = -m (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} - \frac{m}{\rho} \nabla p + \frac{m\eta \nabla^2 \vec{v}}{\rho} + mg + \text{forças complementares}, \quad (3.9)$$

onde $m (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v}$, $m\eta \nabla^2 \vec{v}/\rho$ e mg são respectivamente as forças de inércia, viscosa, peso. A força $m \nabla p/\rho$ é devido à pressão p no fluido. As forças complementares podem ser elétricas, magnéticas, etc.

A força de inércia pode ser desprezada porque o número de Reynolds R é pequeno. O peso é cancelado pela força complementar de contato líquido-lâmina e a velocidade é independente do tempo. Como as camadas do fluido se movem com velocidade constante na direção x , ficamos com:

$$\frac{m}{\rho} \frac{dp}{dx} = \frac{m\eta}{\rho} \frac{d^2 v}{dz^2}. \quad (3.10)$$

A equação diferencial acima, com as devidas condições de contorno, fornece as expressões para a pressão p e a velocidade v do líquido. Assim, a força que o líquido faz em uma ou outra superfície da hemácia é:

$$\mathcal{F} = \left(p(x) - p_o + \eta \frac{dv}{dz} \right) A, \quad (3.11)$$

onde p_o é a pressão inicial e A é a área.

A equação (3.10) foi resolvida por separação de variáveis e as seguintes soluções foram obtidas:

$$p(x) = p_o + ax \text{ e}$$

$$v(z) = \begin{cases} b \exp(az) & \text{se } a > 0 \\ c \exp(-az) & \text{se } a < 0 \\ d + gz & \text{se } a = 0 \end{cases} . \quad (3.12)$$

O fluido entre uma das superfícies da hemácia e a lâmina/lamínula se movimentam conforme o escoamento de Couette, ou seja, a velocidade desse líquido varia linearmente de 0 até u (ver figura 18).

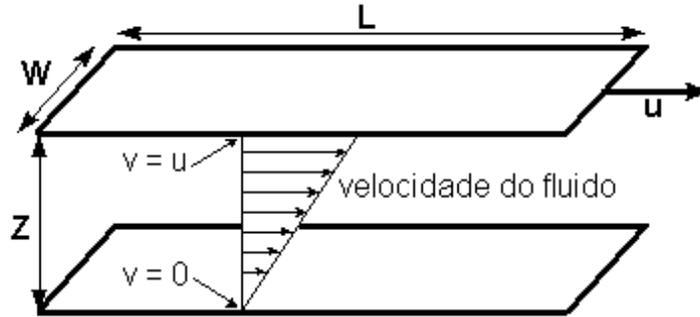


Figura 18: Escoamento de Couette.

Desse modo, a única solução possível para $v(z)$ é quando $a = 0$. Como, $v(0) = 0$ e $v(Z) = u$, temos que

$$p = p_o \text{ e } v(z) = \frac{u}{Z}z. \quad (3.13)$$

Só para lembrar, no nosso modelo existem quatro superfícies envolvidas, duas do glóbulo vermelho, uma da câmara de Neubauer e outra da lamínula (veja figura 17). A parcela do líquido que ocupa a região Z_2 , faz uma força $\mathcal{F}_1 = \eta u W L / Z_2$ no plano inferior da hemácia e a parcela que ocupa a região Z_1 faz uma força $\mathcal{F}_2 = \eta u W L / Z_1$ no plano superior. É claro, as superfícies do glóbulo vermelho se movimentam com a mesma

velocidade u . Portanto, a força hidrodinâmica total agindo sobre a hemácia é

$$\mathcal{F}_{Hidro} = \eta u W L \left(\frac{1}{Z_1} + \frac{1}{Z_2} \right) = \frac{\eta u W L}{Z_{eq}}, \quad (3.14)$$

onde η é a viscosidade do fluido no qual a célula está presente, ou seja, o plasma sangüíneo.

Devido a essa força hidrodinâmica, a hemácia se deforma criando uma força elástica igual e contrária dada por:

$$\mathcal{F}_{Elast} = K \Delta L = K (L - L_o), \quad (3.15)$$

Podemos pensar na membrana da hemácia como um arranjo microscópico de molas de constante elástica k . Esse arranjo é tal que na direção de deformação essas molas estão ligadas em série e na direção perpendicular estão ligadas em paralelo. Numa associação de n molas em série, a constante elástica equivalente é $K = k/n$. Por outro lado, numa associação de m molas em paralelo $K = mk$. Assim, a constante elástica total desse arranjo é $K = mk/n$. Como n é proporcional ao comprimento L da hemácia e m é proporcional a sua largura W . Temos

$$K = \mu \frac{W}{L} \text{ e}$$

$$\mathcal{F}_{Elast} = \mu \frac{W}{L} (L - L_o), \quad (3.16)$$

onde a constante de proporcionalidade μ é a elasticidade intrínseca do glóbulo vermelho.

No equilíbrio, as forças hidrodinâmica e elástica se contrabalançam, ou seja,

$$\mu \frac{W}{L} (L - L_o) = \frac{\eta u W L}{Z_{eq}} \Rightarrow L = L_o + \frac{\eta L^2}{\mu Z_{eq}} u. \quad (3.17)$$

A equação acima prediz o comportamento linear da deformação ΔL ($L - L_o$) em função

da velocidade. Medindo o comprimento L podemos fazer um gráfico cujo coeficiente angular α será usado no cálculo de μ ,

$$\alpha = \frac{\eta L^2}{\mu Z_{eq}} \Rightarrow \mu = \frac{\eta L^2}{\alpha Z_{eq}} \quad (3.18)$$

Assim de posse dos valores de η e Z_{eq} , a elasticidade da hemácia fica bem determinada.

A equação (3.17) também prediz um comportamento não linear com Z_{eq} (ou com Z_1) que nós também iremos provar no trabalho experimental.

O modelo acima aplica-se ao caso estacionário, onde a somatória das forças que atuam na célula é nula. Obviamente, tanto nos estágios iniciais antes de se completar a deformação, quanto nos finais antes de retornar completamente à morfologia inicial, temos uma situação dinâmica onde não existe equilíbrio de forças.

Durante essa situação não estacionária, a membrana da hemácia sofre resistências viscosas ocasionados pelo citoplasma, pelo meio extra-celular e pela sua própria estrutura interna. Evans e Hochmuth [16, 18], demonstraram em um de seus artigos que para efeitos rápidos, tais como a volta da célula para o repouso, as dissipações no meio externo e citoplasma podem ser desprezadas frente à dissipação na própria membrana. Eles também demonstraram que nessa situação de não equilíbrio, a membrana do glóbulo vermelho se comporta como um oscilador super-amortecido e volta a posição inicial segundo uma exponencial decrescente com o tempo, na forma,

$$L = L_o + \Delta L \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right), \quad (3.19)$$

o parâmetro τ definido como $\eta_{membrana}/\mu$ é chamado tempo característico, onde $\eta_{membrana}$ é a viscosidade da membrana. Medindo o tempo t e o comprimento L podemos fazer o gráfico da equação acima, extrair o valor de τ e $\eta_{membrana}$. É importante ressaltar que como a membrana da hemácia tem um comportamento sólido-líquido, a viscosidade

intrínseca da membrana tem unidade diferente (*poise · cm*) de comuns viscosidades de fluidos (*poise*).

3.3 Modelo Hidrodinâmico para Microesferas

Nesta seção, obteremos a força hidrodinâmica que age em uma microesfera submetida a uma velocidade u , constante em x , contra um fluido viscoso delimitado por bordas em repouso. Abordaremos, primeiramente, a questão geral de uma esfera com velocidade com componentes constantes nos eixos x , y , z . Depois, no momento apropriado, faremos a particularização para o nosso caso. Como já dissemos, a determinação dessa força é importante pois será usada na calibração da pinça óptica.

Essa partícula está nas mesmas condições experimentais que a hemácia, então, novamente a equação de movimento do fluido circundante tem apenas componentes viscosa e inercial. Assim,

$$\frac{m}{\rho} \nabla p = \frac{m\eta}{\rho} \nabla^2 \vec{v} \Rightarrow \nabla^2 \vec{v} = \frac{\nabla p}{\eta}. \quad (3.20)$$

Calcular a força hidrodinâmica para uma microesfera é um processo complicado devido à influência que as bordas exercem sobre o líquido no qual ela está presente e à simetria do problema. Por isso, usaremos um procedimento chamado “Método das Reflexões” [29] para resolver a equação diferencial acima. Devido a sua linearidade, o primeiro passo para a solução é separá-la em três outras equações,

$$\begin{aligned} \eta \nabla^2 U &= \frac{\partial p}{\partial x} \\ \eta \nabla^2 V &= \frac{\partial p}{\partial y} \\ \eta \nabla^2 W &= \frac{\partial p}{\partial z} \end{aligned} \quad (3.21)$$

onde $\vec{v}(x, y, z) = U(x, y, z) \hat{x} + V(x, y, z) \hat{y} + W(x, y, z) \hat{z}$ é a velocidade do líquido. As

condições de contorno são $\vec{v} = \vec{u}$ para o fluido adjacente à partícula e $\vec{v} = \vec{0}$ para o fluido mais próximo das bordas.

Cada uma das velocidades U , V e W pode também ser escrita como uma superposição de várias outras velocidades,

$$\begin{aligned}U &= U^{(1)} + U^{(2)} + U^{(3)} + U^{(4)} + \dots \\V &= V^{(1)} + V^{(2)} + V^{(3)} + V^{(4)} + \dots \\W &= W^{(1)} + W^{(2)} + W^{(3)} + W^{(4)} + \dots\end{aligned}\tag{3.22}$$

Qualquer variável do tipo $X^{(1)}$ deve satisfazer as condições $X^{(1)} = u$ sobre a esfera e $X^{(1)} \rightarrow 0$ no infinito, ou seja, encontrar a solução para $X^{(1)}$ é o mesmo que encontrar a solução para o problema de uma esfera em um fluido não delimitado por bordas.

Como $X^{(1)}$ só é zero no infinito, o seu valor nas paredes não é nulo, mas deveria ser para que as condições de contorno de \vec{v} fossem satisfeitas. Assim, é necessário determinar a expressão para uma velocidade $X^{(2)}$ de modo que essa contrabalance o valor de $X^{(1)}$ nas bordas. Isto é, $X^{(2)} = X^{(1)}$ nas paredes e $X^{(2)} \rightarrow 0$ no infinito.

Por sua vez, $X^{(2)}$ não pode ocasionar nenhum efeito na velocidade do fluido adjacente à esfera, então é preciso encontrar uma expressão para a velocidade $X^{(3)}$ que cancele o valor de $X^{(2)}$ na superfície da partícula. Ou seja, $X^{(3)} = X^{(2)}$ para o líquido mais próximo à microesfera e $X^{(3)} \rightarrow 0$ no infinito.

E assim o processo continua até que as condições de contorno $\vec{v} = \vec{u}$ para o fluido adjacente à partícula e $\vec{v} = \vec{0}$ para o fluido mais próximo das bordas sejam satisfeitas. É claro, somente as velocidades com índices ímpares contribuirão para a força porque só essas possuem condições de contorno sobre a superfície da esfera.

A partir do método acima, Faxen [29] obteve as seguintes expressões para as veloci-

dades e pressões do fluido circundante à partícula:

$$\begin{aligned}
U^{(1)} &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i(\alpha x + \beta y) - k|z|} \left[\frac{\alpha^2 a^3 u}{4k} + \frac{6au}{4k} - \frac{3\alpha^2 au}{4k^3} (k|z| + 1) \right] d\alpha d\beta \\
V^{(1)} &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i(\alpha x + \beta y) - k|z|} i\beta \left[-\frac{i\alpha a^3 u}{4k} + \frac{i3\alpha au}{4k^3} \right] d\alpha d\beta \\
W^{(1)} &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i(\alpha x + \beta y) - k|z|} \left[\frac{i\alpha a^3 uz}{4|z|} - \frac{i3\alpha auz}{4k} \right] d\alpha d\beta \\
U^{(3)} &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i(\alpha x + \beta y) - kz} \left[\frac{i\alpha}{k} g_2 + \frac{2}{k} g_1 - \frac{\alpha^2}{k^3} g_1 (kz + 1) + \frac{\alpha^2 z}{k} g_3 \right] d\alpha d\beta \\
V^{(3)} &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i(\alpha x + \beta y) - kz} i\beta \left[\frac{g_2}{k} + \frac{i\alpha}{k^3} g_1 (kz + 1) - \frac{i\alpha z}{k} g_3 \right] d\alpha d\beta \\
W^{(3)} &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i(\alpha x + \beta y) - kz} \left[-g_2 - \frac{i\alpha z}{k} g_1 + \frac{i\alpha}{k} g_3 (kz + 1) \right] d\alpha d\beta \\
U^{(5)} &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i(\alpha x + \beta y) - kz} \left[\frac{i\alpha}{k} g_5 + \frac{2}{k} g_4 + \frac{\alpha^2}{k^3} g_4 (kz - 1) - \frac{i\alpha z}{k} g_6 \right] d\alpha d\beta \\
V^{(5)} &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i(\alpha x + \beta y) - kz} i\beta \left[\frac{g_5}{k} + \frac{i\alpha}{k^3} g_4 (1 - kz) - \frac{i\alpha z}{k} g_6 \right] d\alpha d\beta \\
W^{(5)} &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i(\alpha x + \beta y) - kz} \left[g_5 - \frac{i\alpha z}{k} g_4 - \frac{i\alpha}{k} g_6 (kz - 1) \right] d\alpha d\beta \tag{3.23}
\end{aligned}$$

$$p^{(1)} = \frac{\eta}{\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i(\alpha x + \beta y) - k|z|} \frac{i\alpha}{k} \left[-\frac{3au}{4} \right] d\alpha d\beta \tag{3.24}$$

$$p^{(3)} = \frac{\eta}{\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i(\alpha x + \beta y) - kz} \frac{i\alpha}{k} [-g_1 + kg_3] d\alpha d\beta$$

$$p^{(5)} = \frac{\eta}{\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i(\alpha x + \beta y) - kz} \frac{i\alpha}{k} [-g_4 - kg_6] d\alpha d\beta$$

O número necessário de $X^{(n)}$ dependerá do problema. Algumas vezes precisamos só de 3 $X^{(n)}$ para a convergência das condições iniciais, outras vezes precisamos de mais.

As constantes g_1, g_2, g_3, g_4, g_5 e g_6 são calculadas a partir do requisito $\vec{v} = \vec{0}$ nas paredes, ou seja,

$$\begin{aligned}
 U^{(1)} + U^{(2)} + U^{(3)} &= V^{(1)} + V^{(2)} + V^{(3)} = \\
 W^{(1)} + W^{(2)} + W^{(3)} &= 0 \text{ para } z = b \text{ e} \\
 U^{(1)} + U^{(2)} + U^{(3)} &= V^{(1)} + V^{(2)} + V^{(3)} = \\
 W^{(1)} + W^{(2)} + W^{(3)} &= 0 \text{ para } z = -l.
 \end{aligned} \tag{3.25}$$

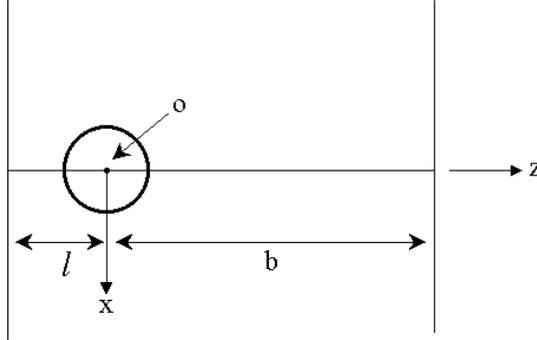


Figura 19: Esfera entre a lâmina e a lamínula.

Considerando agora o nosso caso, onde a esfera se move com velocidade constante u em x (figura 19), temos que a expressão para a força hidrodinâmica, é dada por:

$$\begin{aligned}
 F &= \frac{6\pi\eta au}{1 + \left(\frac{3a}{4c}\right) (U^{(3)} + U^{(5)})_o + \left(\frac{a^3}{8\eta c}\right) \left[\frac{\partial}{\partial x} (p^{(3)} + p^{(5)})\right]_o} \Rightarrow \\
 F &= \frac{6\pi\eta au}{1 - A\left(\frac{a}{l}\right) + B\left(\frac{a}{l}\right)^3},
 \end{aligned} \tag{3.26}$$

onde

$$\begin{aligned}
A = & \frac{3(1-h)}{4} \int_0^{+\infty} \frac{x}{N(st-1)} \{s^2 t^3 (1-h) [(1-h)x-1] + \\
& s^3 t^2 (1+h) [(1+h)x-1] + 4s^2 t^2 [2(1-h^2)x^2 - 2x + 1] + \\
& 2st^2 [(3-h^2)x-h] + 2s^2 t [(3-h^2)+h] - 4st [2(1-h^2)x^2 + 2x + 1] + \\
& s(1-h) [(1-h)x+1] + t(1+h) [(1+h)x+1]\} dx + \\
& \frac{9(1-h)}{8} \int_0^{+\infty} \frac{s+t-2}{st-1} dx,
\end{aligned} \tag{3.27}$$

$$\begin{aligned}
B = & \frac{2(h-1)(1-h)^2}{8(h-2)} \int_0^{+\infty} \frac{x^2}{N} \{st^2 [2(1-h)x-1] + s^2 t [2(1+h)x-1] \\
& + st [(4x-1)^2 + 1] + t [2(1+h)x+1] + s [2(1-h)x+1] - 2\} dx \\
& + \frac{(1-h)^3}{4} \int_0^{+\infty} \frac{x^3}{N(st-1)} \{s^2 t^3 (1-h) + s^3 t^2 (1+h) + s^2 t^2 (8x-4) \\
& - st^2 (8x-2h) - s^2 t (8x+2h) + st (8x+4) - s(1-h) - t(1+h)\} dx \\
& - \frac{(1-h)^3}{8} \int_0^{+\infty} x^2 \frac{s+t-2}{st-1} dx,
\end{aligned} \tag{3.28}$$

$$N = (st-1)^2 - 16x^2 st, \tag{3.29}$$

$$s = e^{2x(1-h)}, \tag{3.30}$$

$$t = e^{2x(1+h)},$$

$$l = (1-h)L \text{ e}$$

$$b = (1+h)L.$$

A contribuição da velocidade $U^{(1)}$ está implícita no termo $6\pi\eta a u$, solução para o problema sem bordas.

O subíndice o na equação (3.26) significa que as velocidades $U^{(3)}$ e $U^{(5)}$ e as pressões $p^{(3)}$ e $p^{(5)}$ foram calculadas no centro da esfera, ou seja, considerando-a como um ponto. Quando a dimensão da esfera é muito pequena (nosso caso) comparada com a distância entre as bordas podemos pensá-la como pontual.

Das equações (3.23) e (3.25) achamos os valores de g_1, g_2, g_3, g_4, g_5 e g_6 através de um programa elaborado no *Mathematica* (ver apêndice). De posse de (3.26) e pelo mesmo programa obtivemos as expressões e valores de A (3.27) e B (3.28) e determinamos a partir dos parâmetros η, a, l e L o valor para a força F . Desse modo, a força hidrodinâmica está bem determinada e poderemos compará-la à óptica no capítulo experimental.

Capítulo 4

Sistema Experimental

Neste capítulo apresentaremos os detalhes da montagem experimental da pinça óptica, do bisturi óptico e do sistema usado nas medidas de hemácias e esferas.

4.1 Pinça Óptica

A montagem da pinça óptica está representada na figura 20. Um feixe de laser *Nd:YAG* com comprimento de onda $1064nm$ é emitido, passa por duas lentes e é focalizado na amostra através de uma objetiva de $100X$ (abertura numérica 1.25) que está acoplada a um microscópio Olympus. As duas lentes funcionam como um telescópio, devem estar aproximadamente uma no foco da outra e têm a função de possibilitar que capturemos no plano de visão do microscópio. Se não tivéssemos essas lentes o foco do laser iria coincidir com o plano focal da objetiva e não poderíamos visualizar a captura. Já com as mesmas podemos mudar a posição do foco do laser até que ele coincida com o plano de visão do microscópio e possamos observar a partícula sendo presa. A mudança da posição de captura é feita ajustando a distância entre as duas lentes (veja figuras

21, 22 e 23).

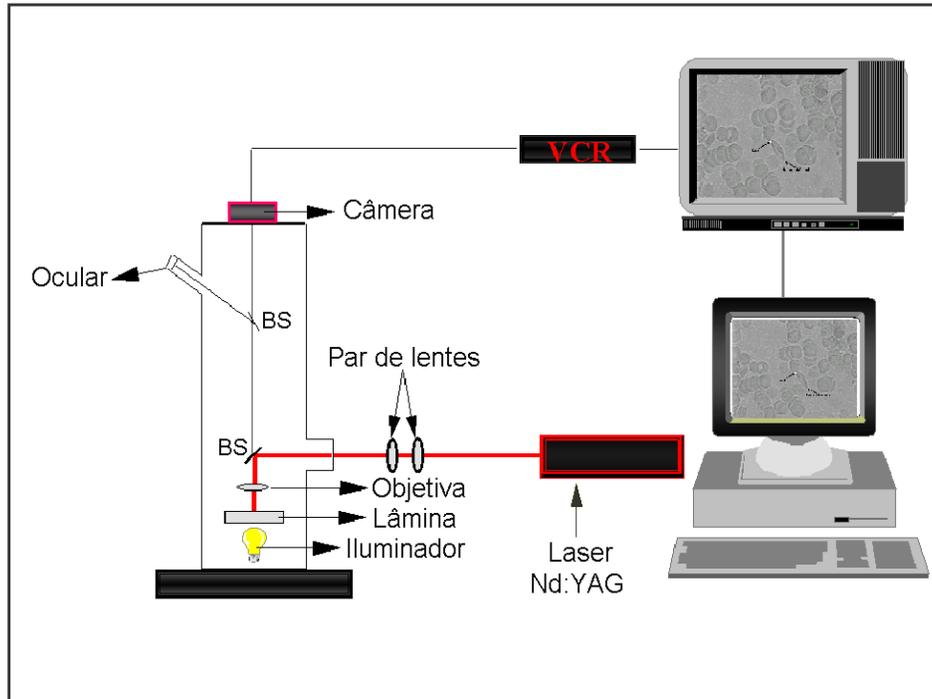


Figura 20: Sistema experimental da pinça óptica.

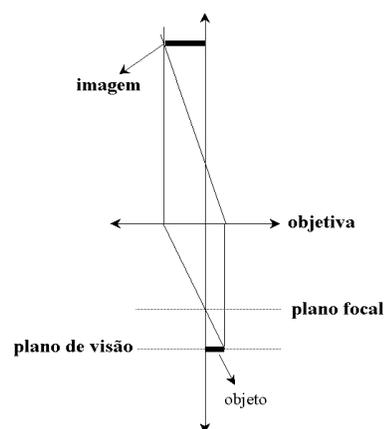


Figura 21: Formação de imagem pela objetiva.

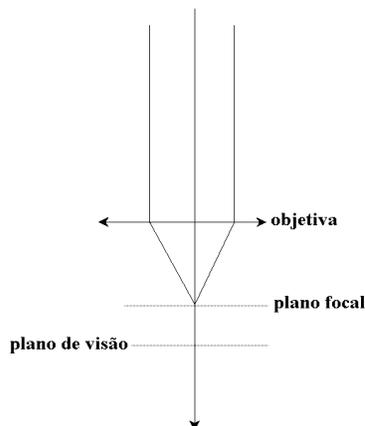


Figura 22: Laser focalizado pela objetiva, sem as lentes.

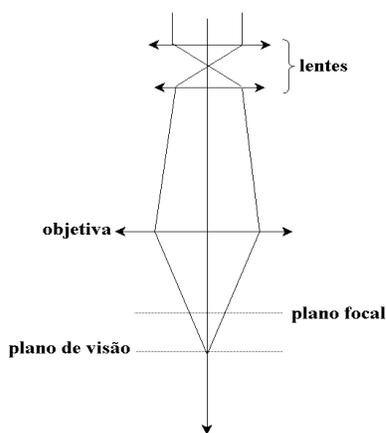


Figura 23: Laser focalizado pela objetiva após passar pelas lentes.

Uma minicâmera JVC faz parte do sistema e registra as imagens das partículas capturadas. Essas imagens, com um aumento de 2500 a 6000 vezes, podem ser gravadas em VHS e no computador, onde podem ser analisadas quantitativamente quadro a quadro.

Vale ressaltar que o processo de alinhamento do sistema da pinça óptica, isto é o procedimento tomado para que o feixe chegue até a amostra e a capture, não é simples e deve ser muito preciso. Como não se pode ver o laser de *Nd:YAG* fazemos todo o

alinhamento com um laser visível. Da seguinte maneira:

1. Sem as duas lentes, obrigamos o laser visível a incidir perpendicularmente na objetiva do microscópio. Para isso é muito importante a visualização do feixe na TV. Quando o laser estiver perpendicular veremos na TV um círculo concêntrico de laser simétrico que irá abrir e fechar uniformemente conforme movemos o parafuso de ajuste focal do microscópio (figura 24). Se o laser não estiver perpendicular, não conseguiremos posteriormente mover a partícula nas três direções x , y e z . Essa “perpendicularização” é feita movimentando alternadamente o espelho BS dentro do microscópio e qualquer outro fora do microscópio de forma que o movimento de um compense o do outro e encontremos o círculo perfeito na TV.
2. Após a etapa acima, obrigamos o laser infravermelho a coincidir com o laser visível em quaisquer dois pontos, desde que um seja após a objetiva e outro antes da entrada do microscópio.
3. Continuamos o alinhamento com o laser visível. Colocamos uma das lentes e obrigamos esse laser a incidir no mesmo ponto, depois da objetiva, que estava antes da lente ser colocada. Repetimos o processo de “perpendicularização”.
4. Colocamos a outra lente e repetimos todo o processo do item anterior.
5. Preparamos uma lâmina com esferinhas de latex e ligamos o *Nd:YAG*. Se o alinhamento estiver bem feito, quando movimentarmos o parafuso de ajuste focal, uma ou mais esferinhas vão ficar presas e podemos regular a distância entre as duas lentes para capturarmos sempre no plano de visão do microscópio.

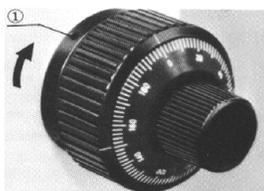


Figura 24: Parafuso de ajuste focal.

Abaixo estão alguns exemplos, feitos em nosso laboratório, de uso da pinça óptica como ferramenta de manipulação.

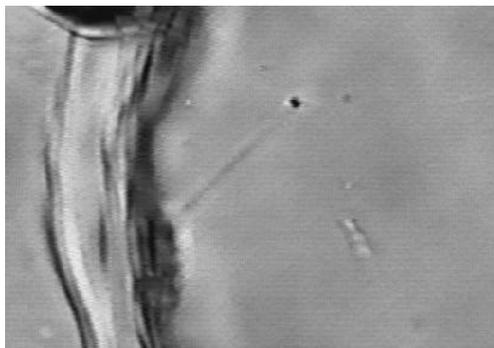


Figura 25: Membrana de célula de cebola sendo puxada pela pinça óptica.

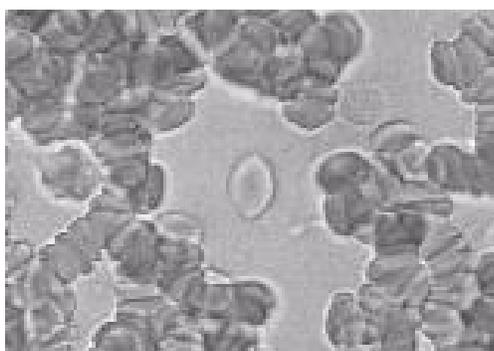


Figura 26: Hemácia sendo alongada pela pinça óptica.

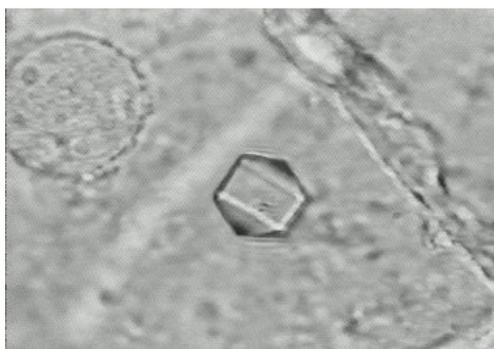


Figura 27: Cristal de oxalato de cálcio de cebola sendo movimentado pela pinça óptica.

Nas medidas com hemácias e microesferas usamos o sistema da pinça óptica e acrescentamos um motor de passo com o qual podemos movimentar essas partículas a velocidades constantes (ver figura 28). Esse motor de passo é equipado com interfaces GPIB/RS232 (saída paralela e serial) e controlado pelo Driver Controller Modelo ITL09 da Microcontrole através do computador, ele pode controlar quatro estágios de translação um que se move a $10\mu\text{m}/\text{passo}$, outro que se move a $1\mu\text{m}/\text{passo}$ e um que se move a $0.1\mu\text{m}/\text{passo}$. Nas medidas utilizamos o de $0.1\mu\text{m}$. Elas foram gravadas em fitas de vídeo com o auxílio da câmera e depois analisadas no computador.

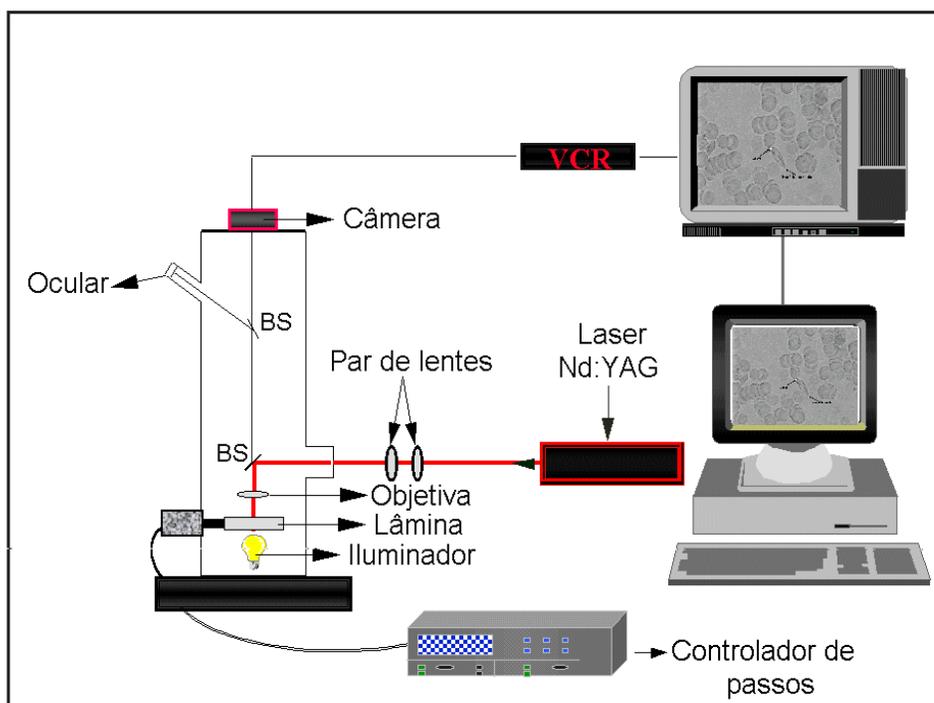


Figura 28: Sistema experimental da medição de hemácias e esferas.

4.2 Acoplamento do Sistema: Pinça Óptica + Bisturi Óptico.

4.2.1 Motivação

A ciência vem tendo não só um grande interesse em manipulações genéticas, tais como introduzir DNA em células, como vem desenvolvendo métodos para a realização dessas manipulações.

Um dos métodos usados para inserção de material biológico consiste em atirar partículas de tungstênio ou ouro embebidas em DNA em uma cultura de células (ver figura 29). Com esse método consegue-se introduzir material genético em poucas células pois a maioria morre.

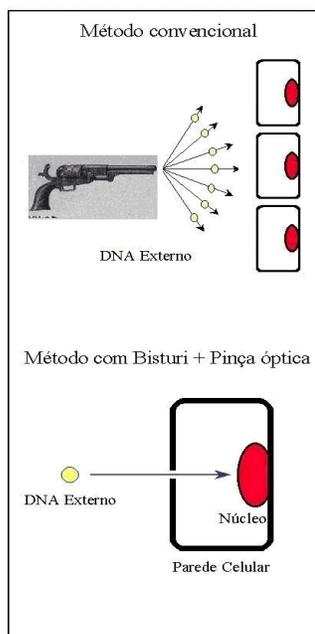


Figura 29: Método convencional *vs* método com laser.

Outro método de inserção de material biológico é o método de inseminação artificial

que é eficiente mas ainda mata muitas vezes o óvulo e não é totalmente asséptico.

Dessa forma fica claro a necessidade de se produzir um novo método de manipulação genética. Como vimos na seção anterior a pinça óptica é uma poderosa ferramenta de medida e captura, mas somente com ela não somos capazes de fazer transportes celulares. Quando a partícula capturada encontra a parede celular ela se solta da pinça. Para solucionar esse problema desenvolvemos uma ferramenta chamada bisturi óptico que é capaz de produzir perfurações microscópicas nas paredes da célula sem contaminação e danificação.

Por enquanto, usamos o bisturi óptico e a pinça óptica para perfurações, troca de materiais entre células, troca de materias entre célula e organela e algumas outras manipulações realizadas sempre com vegetais. Porém, o bisturi ainda pode ser usado para clonagem vegetal, manipulações de cromossomo e fusão de células. Por isso pretendemos, num futuro próximo, demonstrar também essas outras possíveis aplicações.

4.2.2 Bisturi Óptico

O bituri óptico é fundamentalmente um laser de *Nd:YAG* , dobrado e pulsado, com o qual somos capazes de produzir cortes em membranas e paredes celulares sem causar-lhes danos que poderiam prejudicar a manipulação genética.

A luz diretamente gerada pelo *Nd:YAG* em $1064nm$, não é fortemente absorvida pelos materiais orgânicos, e portanto, inútil para ser utilizada como fonte geradora de calor. No entanto se dobramos a frequência dessa radiação, o comprimento de onda se modifica de 1064 para $532nm$ e o laser passa a operar com um comprimento de onda que é altamente absorvido por esses materiais. Um exemplo de como os organismos vivos absorvem muito mais no visível do que no infravermelho pode ser visto na figura abaixo que mostra o comportamento da absorção da hemoglobina e melanina em função dos comprimentos de

onda da luz.

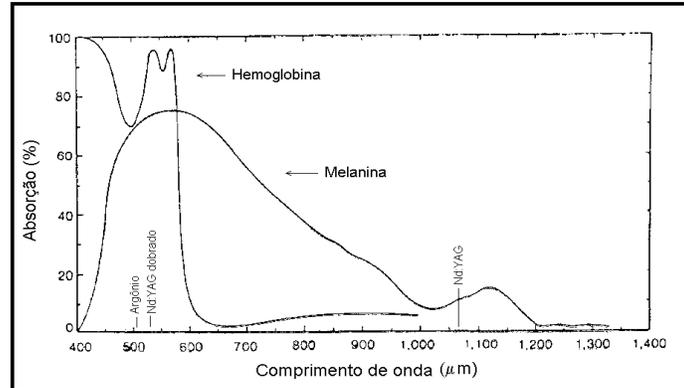


Figura 30: Absorção em função do comprimento de onda.

Em um laser pulsado, diferentemente do laser contínuo, toda energia é concentrada em um único pulso. Isso implica que nesse tipo de laser temos alta potência em um curto intervalo de tempo, o que é ideal para perfurarmos a célula sem indesejáveis efeitos térmicos que a danificariam. Se usássemos um laser contínuo, a célula teria que ficar exposta por um longo tempo até que conseguíssemos perfurá-la. Conseqüentemente haveria propagação de efeito térmico, ocasionando a morte da mesma.

A energia absorvida pelo laser após ser transformada em calor pode ser dada por:

$$E = \rho \left(\frac{4\pi r^3}{3} \right) c (T_{final} - T_{inicial}), \quad (4.1)$$

onde ρ é a densidade do material da amostra, $4\pi r^3/3$ é a região abrangida pela propagação de calor causada pelo laser durante um tempo τ de exposição da amostra, c é o calor específico da célula, $T_{inicial}$ é a temperatura com que o laser incide na célula e T_{final} é a temperatura com a qual perfuramos a célula.

O raio de difusão r da propagação de calor é dado em função de τ pela relação:

$$r = \sqrt{4\pi\alpha\tau}, \quad (4.2)$$

onde α é a difusividade térmica.

Desse modo, se τ é pequeno e a energia E é alta (laser pulsado), T_{final} é alta, r é pequeno e podemos cortar a célula sem danificá-la. Por outro lado, se τ é grande e a energia E não é tão alta (laser contínuo), T_{final} é baixa, r é grande e o laser precisa incidir um longo tempo na amostra até que tenhamos a temperatura necessária para perfurá-la. A célula ficará muito tempo exposta ao laser e o efeito térmico se propagará, ocasionando a morte da mesma.

Por esses motivos, usamos o laser *Quantel Brilliant* de *Nd:YAG*, dobrado e pulsado com técnica *Q-Switched*. Esse laser tem um controle cujo botão ao ser acionado dá um pulso isolado de alta intensidade ($E = 165mJ$) e curtíssimo intervalo de tempo ($10^{-9}s$).

A montagem experimental (figura 31), segue a mesma linha da montagem da pinça óptica discutida anteriormente. A única mudança se dá pelas lentes em frente ao laser do bisturi. Essas lentes têm praticamente o mesmo papel que as duas lentes exercem na pinça óptica. Ou seja, têm a simples função de conjuntamente com as outras duas lentes adequar o feixe desse laser à objetiva do microscópio possibilitando que a perfuração seja feita no plano de visão do microscópio e propiciando o acoplamento do sistema.

Os lasers percorrem todo o caminho mostrado na figura até encontrarem a amostra. Toda manipulação ocorrida na lâmina que contém a amostra pode, com o auxílio da câmera, ser visualizada no aparelho de TV e no computador. O mesmo se dá para o feixe visível do laser do bisturi. Para alinharmos esse sistema, sempre é fundamental que possamos visualizá-lo no aparelho de TV, pois só desse modo saberemos se o feixe está incidindo perpendicularmente na amostra, se está bem focado e onde está incidindo. No acoplamento do sistema, o laser do bisturi desempenha o mesmo papel do laser visível no alinhamento da pinça, a única diferença é que para terminarmos o alinhamento do bisturi temos que repetir todo processo para mais duas lentes.

O espelho BS, próximo a lâmina, é um espelho Beam Splitter que divide o feixe do laser

em duas componentes, uma que incidirá na amostra e outra que chegará a câmera. A parcela do laser que irá para a câmera dependerá do filme refletor (“coating”) que recobre o espelho. Primeiramente usamos um Beam Splitter com filme refletor para $\lambda = 1064nm$ pois esse é o espelho usado no sistema experimental da pinça óptica. Isso resultava em múltiplas reflexões, pois a maioria do feixe do laser não era refletido e sim transmitido em direção à câmera, de modo que visualizávamos vários feixes na TV e não sabíamos qual era o incidente na lâmina e quais eram os refletidos. Trocamos o mesmo BS por um com “coating” refletor para $\lambda = 1064nm$ e $\lambda = 532nm$, conseguindo assim fazer a manipulação celular, porém tínhamos uma imagem muito ruim na TV, pois o comprimento de onda verde ($\lambda = 532nm$) era totalmente refletido pelo BS e não chegava à câmera.

Resolvemos o problema retornando ao BS para $\lambda = 1064nm$ e colocando um BS para $\lambda = 532nm$ adicional localizado próximo à câmera que poderia ser retirado no final do alinhamento.

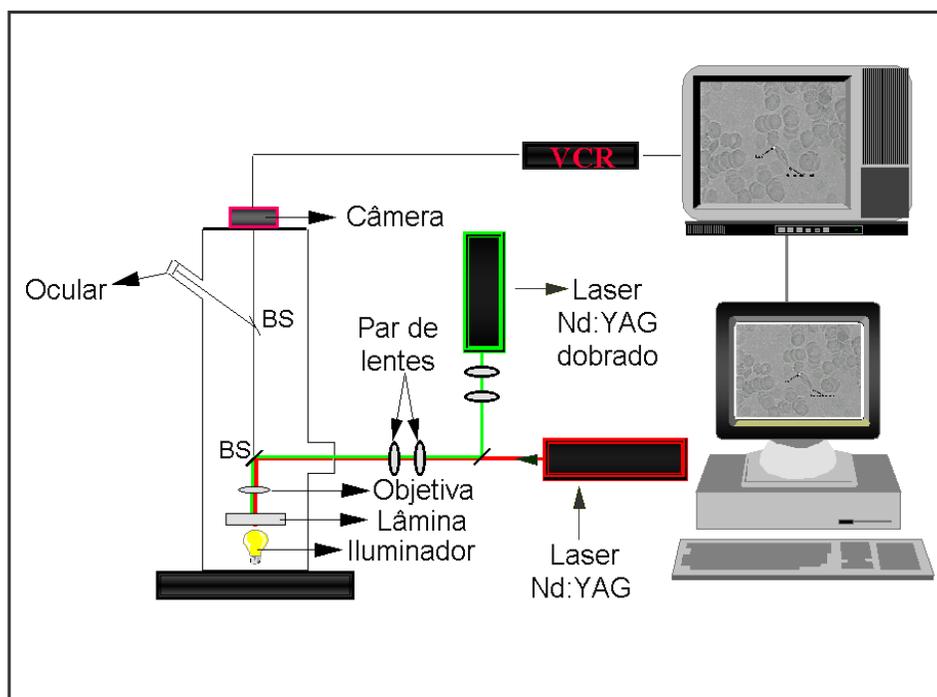


Figura 31: Sistema experimental do acoplamento pinça óptica + bisturi óptico.

4.2.3 Resultados e Conclusões

Como podemos ver nas figuras abaixo, o bisturi é capaz de fazer furos micrométricos provando que é uma microferramenta absolutamente eficiente (figuras 32, 33, 34 e 35) e o sistema acoplado é capaz de fazer manipulações intracelulares (seqüência de 1 a 6 na figura 36).

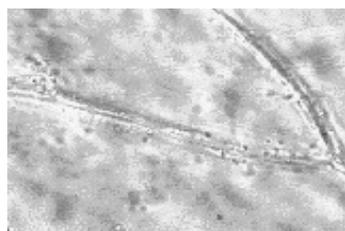


Figura 32: Antes da ação do Bisturi. Figura 33: Depois da ação do Bisturi

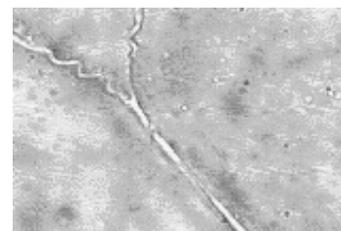


Figura 34: Antes da ação do Bisturi. Figura 35: Depois da ação do Bisturi.

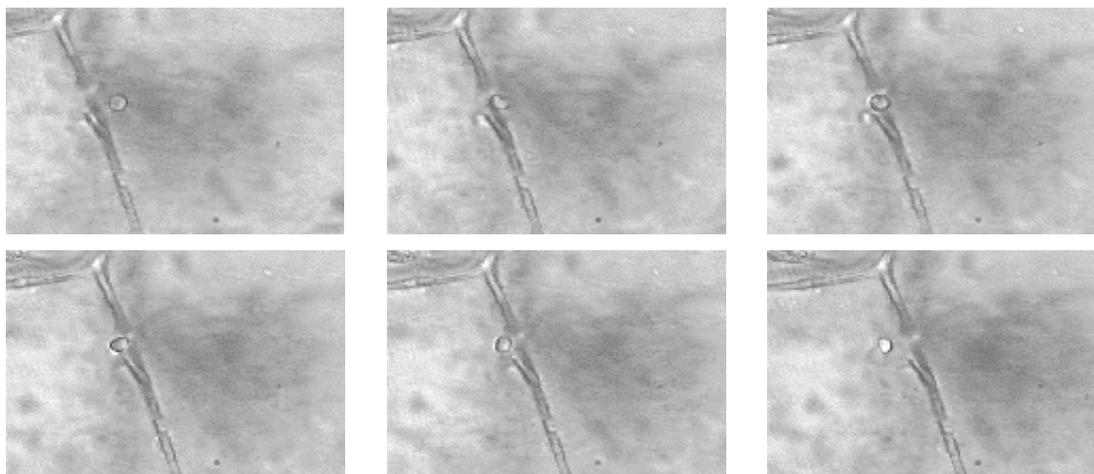


Figura 36: Partícula capturada e movimentada entre duas células.

Essa seqüência na Figura 36, mostra uma organela que foi capturada e forçada a passar pelo furo na parede celular, aberto pelo laser bisturi. O movimento se deu da esquerda para a direita nessa seqüência de fotos, embora na seqüência inteira, gravada em vídeo, ele tenha ocorrido de ambos os lados mais de uma vez. Isso demonstra a possibilidade, existente em nosso sistema atual, de realização de manipulações genéticas.

Para fazer essas imagens usamos a folha de uma planta com o nome de Transdescân-
cia pois essa tem muitas organelas e podemos colher facilmente uma camada unicelular. Todos os furos foram feitos com um ou mais pulsos de laser emitidos um a um isoladamente.

Capítulo 5

Aplicações à Medida das Elasticidade e Viscosidade de Membranas de Hemácias

5.1 Motivação

A hemácia (figura 37) na sua função de capturar o oxigênio dos pulmões e levá-los para todas as células através da hemoglobina, percorre os vasos sanguíneos do organismo por aproximadamente 500.000 vezes. Durante a sua vida média de 120 dias, ela atravessa uma distância de 250km. Além disso, transpõe capilares (figura 38) e sinusóides do baço, com diâmetro de 3 a 4 μm , sendo que o seu diâmetro em repouso é de 7 a 9 μm . Tais fenômenos só são possíveis se a hemácia mantiver a integridade de sua principal propriedade: deformabilidade celular. Essa propriedade é mantida pela elasticidade e pela viscosidade de sua membrana.

O glóbulo vermelho normal é uma célula altamente deformável que, no estado de

repouso, assume a forma de um disco bicôncavo ou discócito. A forma bicôncava e a deformabilidade da célula são determinadas pela natureza e composição da bicamada lipídica, pelo citoesqueleto submucoso, pela geometria celular, pela concentração de hemoglobina intracelular e pela manutenção da relação superfície/volume celular.

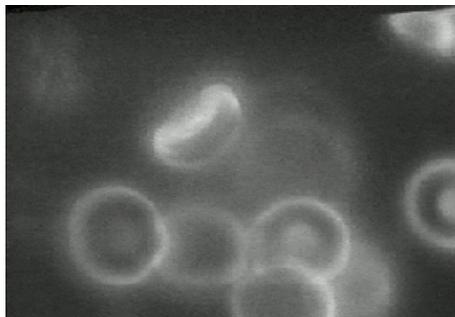


Figura 37: Hemácias

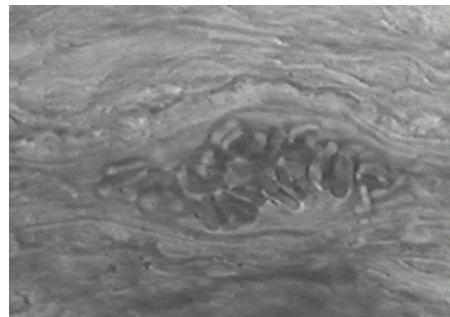


Figura 38: Hemácias na circulação.

Em conseqüência de sua deformabilidade, a hemácia se comporta mais como uma “gota líquida” do que propriamente como uma partícula sólida, na ocasião em que o sangue flui através de pequenos vasos sangüíneos. Isso explica a notável baixa viscosidade do fluxo, a despeito da elevada proporção de hemácias presentes (valores normais em torno de 5.1 milhões em homens e 4.5 em milhões em mulheres) na corrente sangüínea. Dessa forma, a capacidade de deformação é uma condição necessária para uma função ótima celular.

A perda ou diminuição dessa capacidade, leva a uma retirada prematura das hemácias da circulação e, conseqüentemente, à diminuição da oferta de oxigênio aos tecidos. Essa situação patológica é encontrada, por exemplo, na esferocitose hereditária, anemia falciforme e na eliptocitose hereditária. Portanto, uma melhor caracterização da deformabilidade da membrana da hemácia pode auxiliar o estudo dessas patologias e de outras situações que possam vir a alterar a membrana da hemácia, tais como a administração de certos fármacos e a estocagem de bolsas em bancos de transfusão de sangue . As bolsas normalmente são estocadas por 35 dias.

5.2 Materiais e Métodos

O nosso modelo para hemácias preve um comportamento linear da deformação de sua membrana L com a velocidade v , um comportamento não linear com a distância Z_{eq} (e Z_1) e um comportamento exponencial em relação ao tempo de retorno t . Assim, neste capítulo vamos testá-lo e usá-lo para calcular a elasticidade e viscosidade da membrana de hemácias.

Utilizamos hemácias que foram obtidas no Hemocentro de doadores normais, coletadas de bolsas de concentrado de hemácias usadas em transfusões (hematócrito entre 68–70%). Diluímos uma pequena parte da bolsa em plasma AB, $1\mu L$ de concentrado para $500\mu L$ de plasma. A solução preservativa e anticoagulante na bolsa foi o CPDA1 (citrato, fósforo, dextrose e adenina). Acondicionamos $6\mu L$ da amostra preparada numa câmara de Neubauer com $100\mu m$ de profundidade a $(23 \pm 1)^\circ C$. Fizemos as medidas no mesmo dia da doação para que pudessemos trabalhar com hemácias “frescas”. A doação era realizada no período da manhã, aguardávamos os resultados das sorologias até o início da tarde e trabalhávamos com as amostras logo a seguir.

Como dissemos anteriormente, os glóbulos vermelhos são deformáveis e um modo de ver e quantificar essa propriedade é prendê-los e submetê-los a velocidades constantes. Assim usamos em nossas medidas a montagem da figura 28 do capítulo Sistema Experimental. Lembre que o motor de passo é utilizado para submeter as hemácias e outras partículas a velocidades constantes.

Capturada a hemácia, estabelecemos no computador ligado ao controlador de passos os valores das velocidades v que transladaríamos a lâmina e as respectivas distâncias que a lâmina percorreria. Fixar a hemácia e mover a lâmina é o mesmo que fixar a lâmina e transladar a hemácia. Cada glóbulo vermelho foi submetido as velocidades de 100, 110, 120, ...280 $\mu m/s$. O movimento de translação cessava após a lâmina percorrer a distância indicada para a última velocidade especificada e a hemácia retornava a sua morfologia

inicial. Toda seqüência acima foi gravada em vídeo.

Quando a hemácia é submetida a uma velocidade, sua membrana se distende até que atinge uma elongação máxima, que ocorre quando a força hidrodinâmica está em equilíbrio com a força elástica (ver figura 39). Depois, quando a lâmina termina de percorrer a distância estabelecida, a membrana da hemácia aos poucos retorna a elongação original.

Como toda essa seqüência foi gravada em vídeo, congelamos no vídeo e capturamos no computador (através de uma placa de vídeo Wave-Watcher) as imagens da hemácia em repouso, da hemácia em sua máxima deformação e dos vários diâmetros que o glóbulo vermelho assume quando ele está retornando para o repouso. Quando capturamos os quadros do retorno, assumimos $t = 0$ para o quadro da elongação máxima. Usando um controle de um vídeo 8 cabeças adiantamos a fita quadro a quadro (a câmera grava em 30quadros/segundo, logo adiantamos o vídeo em $1/30 = 33ms$) e capturamos outra e outra imagem até o retorno total. Como as hemácias foram submetidas a uma seqüência de velocidades, a medida do retorno foi feita apenas para a última velocidade.

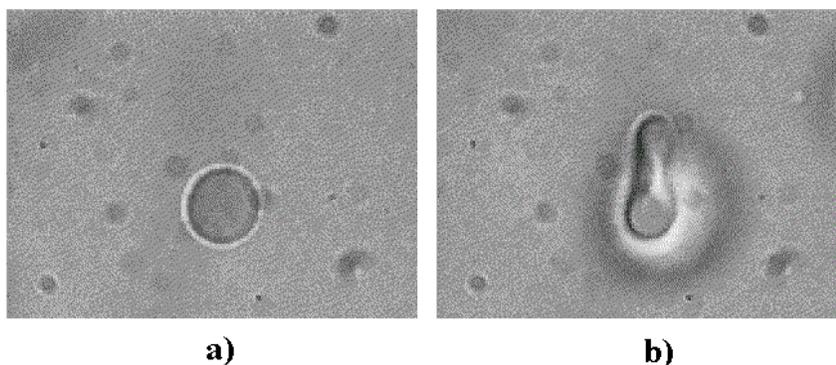


Figura 39: a) Hemácia em repouso sem a ação da pinça óptica.
b) Hemácia alongada com a ação da pinça óptica.

Após a captura das imagens no computador, usamos o software Image Pro-Plus para determinar os valores do diâmetro de repouso L_o e dos diâmetros de elongação máxima

e de retorno L (ver figuras abaixo).



Figura 40: Captura.

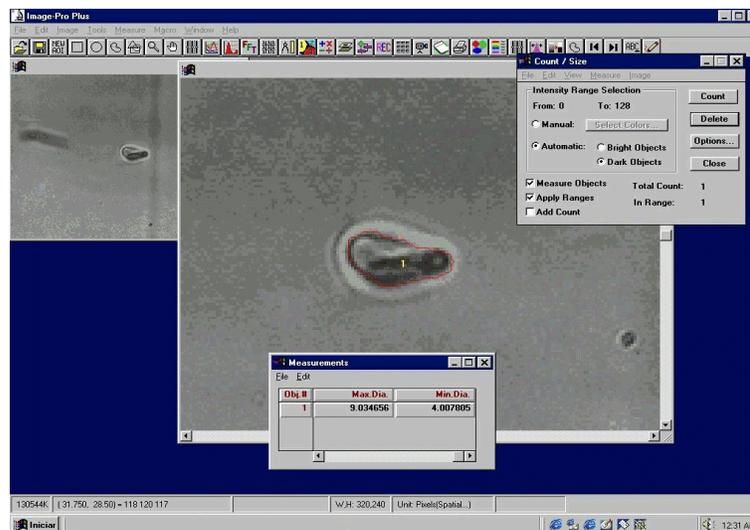


Figura 41: Análise no software.

De posse de v , L , L_o e t (respectivos tempos de retorno das elongações), de acordo com o modelo do capítulo 2, tivemos ainda a necessidade dos valores da distância Z_1 em

relação ao fundo da lâmina e da viscosidade do plasma η . A distância Z_1 foi fixada em $50\mu m$ durante as medidas e foi setada localizando o fundo da lâmina e subindo $50\mu m$ a partir dessa com o auxílio do parafuso de ajuste focal do microscópio. A viscosidade do plasma, $\eta = (2.19 \pm 0.02)cP$, foi medida num viscosímetro tipo RN/MLV a $23^\circ C$ no laboratório de Microeletrônica do Centro de Componentes Semicondutores da Unicamp.

Por final, colocamos os parâmetros acima em uma planilha e fizemos os gráficos que dão os valores da elasticidade μ , do tempo característico τ e da viscosidade da membrana da hemácia $\eta_{membrana}$.

5.3 Resultados e Conclusões

A seqüência de fotos abaixo (figura 42) mostra a deformação de uma hemácia ao ser submetida a quatro ($120, 150, 190$ e $210\mu m/s$) de um total de 18 velocidades.

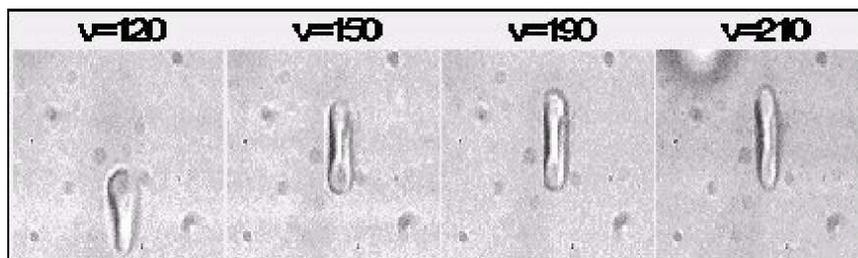


Figura 42: Hemácias a várias velocidades.

A partir das medidas do diâmetros máximo L ajustamos uma reta aos pontos experimentais (figura 43), de acordo com o modelo teórico, e obtivemos a elasticidade da hemácia μ através do coeficiente angular. Só para lembrar, a elasticidade está relacionada com o coeficiente angular α pela expressão

$$\mu = \eta (L_o)^2 / \alpha Z_{eq}, \quad (5.1)$$

onde $1/Z_{eq} = 1/Z_1 + 1/Z_2 = 1/50 + 1/(100 - 50)$. Lembre que o valor de Z_2 é sempre $100 - Z_1$ porque a lâmina tem $100\mu m$ de profundidade. Para obtenção dessas medidas analisamos um total de 30 hemácias.

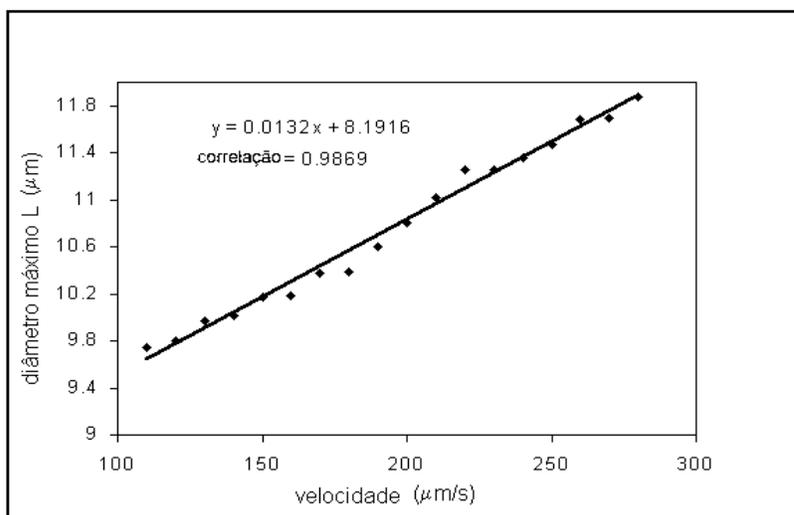


Figura 43: Gráfico dos diâmetros máximo em função da velocidade.

Assim,

$$\mu = 0.0004 \text{ dyna/cm} \pm 4\% \quad (5.2)$$

Também fizemos medidas dos diâmetros máximos L considerando Z_1 variável ao invés de fixá-lo em $50\mu m$. Queríamos observar o comportamento da célula em relação ao fundo câmara de Neubauer e à superfície da lamínula. Essas medidas foram feitas usando o mesmo procedimento da seção anterior. Submetemos uma única hemácia às velocidades $170, 200, 230, 260$ e $290\mu m/s$ para as profundidades Z_1 iguais a $10, 13, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85\mu m$. O glóbulo vermelho foi submetido a apenas 6 velocidades porque não podíamos alterar suas propriedades. Se o submetéssemos a mais velocidades ele não manteria sua integridade para todos os Z_1 usados. Também usamos uma única hémacia para evitar que diferenças individuais influenciássem na medida.

De posse das medidas acima achamos, para cada Z_1 , os valores dos coeficientes angulares α dos gráficos da elongação máxima em função da velocidade. Os erros de Z_1 e de α são de $\pm 10\%$.

Da equação 5.1, temos

$$\alpha = \frac{\eta(L_o)^2}{\mu Z_{eq}} = \left(\frac{\eta(L_o)^2}{\mu} \right) * \left(\frac{1}{Z_1} + \frac{1}{100 - Z_1} \right) \quad (5.3)$$

Assim, ajustamos a expressão de α acima aos pontos experimentais. O resultado está representado no gráfico da figura 44.

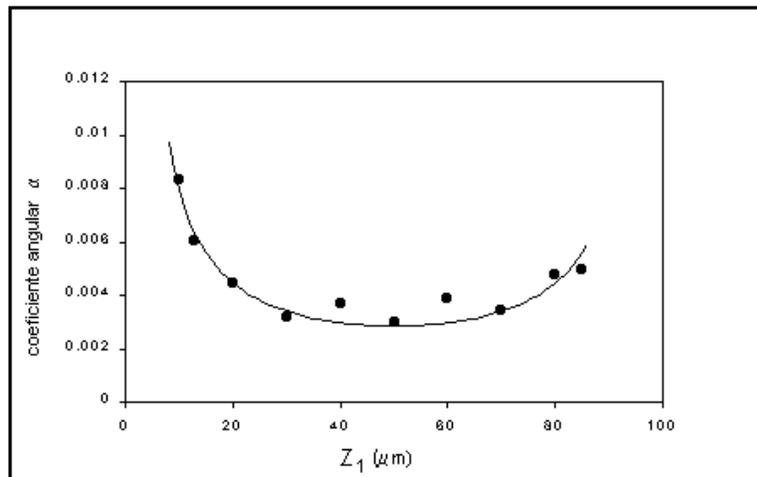


Figura 44: Gráfico dos coeficientes angulares em função de Z_1 .

Observando o gráfico acima percebe-se que não só as medidas se ajustaram bem ao modelo (correlação de 95%) como quanto mais perto a hemácia está de uma ou outra superfície (lâmina ou lamínula) maior é o coeficiente angular e maior é a elongação da membrana L .

Outra conclusão importante é que, com mais esse gráfico, estamos demonstrando duas

dependências (α vs Z_1 e L vs v) de um mesmo modelo. Isso comprova que nosso modelo está descrevendo bem a realidade do experimento.

Vamos agora apresentar o valor da viscosidade da membrana. Na seqüência de fotos da figura 45, já podemos observar macroscopicamente a deformação da membrana quando está em sua elongação máxima e em repouso (após o movimento).

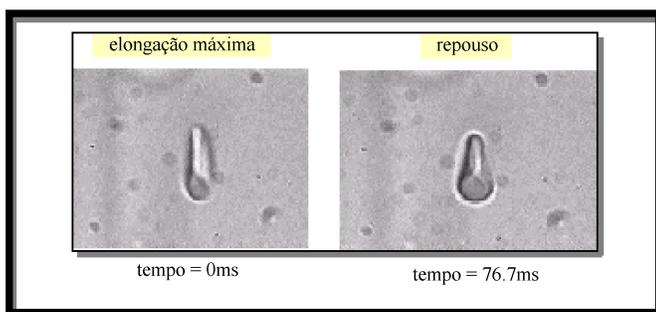


Figura 45: Hemácia alongada e hemácia em repouso capturadas pela pinça óptica.

As medidas do tempo t e dos comprimentos de retorno L estão apresentadas no gráfico da figura 46 abaixo.

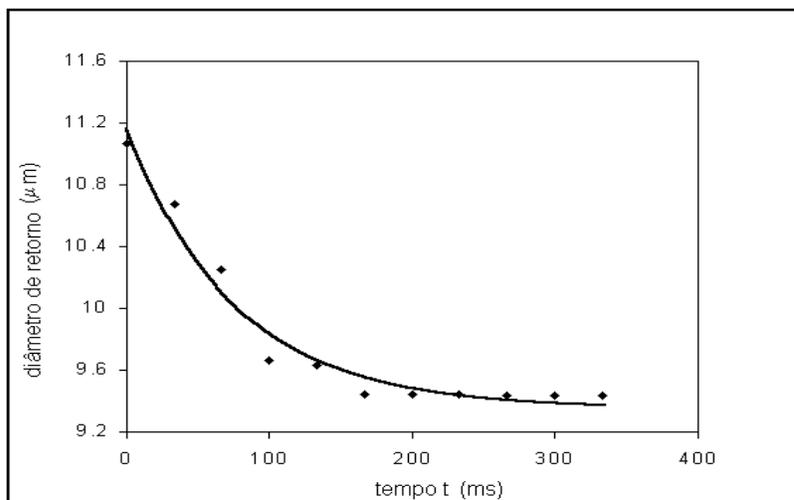


Figura 46: Gráfico dos diâmetros de retorno em função do tempo.

Através desse gráfico, obtivemos primeiramente o valor para o tempo característico da deformação da hemácia $\tau = 76.7ms \pm 2\%$.

De posse do valor de τ , obtivemos pela relação $\tau = \eta_{membrana}/\mu$, o valor da viscosidade $\eta_{membrana}$. Assim,

$$\eta_{membrana} = 3 * 10^{-5} \text{ poise} * \text{cm} \pm 6\% \quad (5.4)$$

Há vários trabalhos publicados sobre a medida da deformabilidade da membrana de hemácias. Porém nenhum desses trabalhos fornecem os parâmetros elasticidade e viscosidade da membrana utilizando apenas um único método (ver referências).

O grupo de Evans et alli [16] e Mohandas [14] utilizaram uma micropipeta com pressão negativa numa ponta e contato com a membrana na outra. O primeiro grupo apresentou dados quantitativos para μ , $\eta_{membrana}$ e τ ($\mu = 6 \times 10^{-3} \text{ dyna/cm}$, $\eta_{membrana} = 6 \times 10^{-4} \text{ poise} \cdot \text{cm}$ e $\tau \cong 100ms$). O segundo obteve resultados qualitativos em graus de deformabilidade: um sinal de mais para leve deformação e mais de um sinal para deformações maiores que aquela.

Os nossos μ ($4 \times 10^{-4} \text{ dyna/cm}$) e $\eta_{membrana}$ ($3 \times 10^{-5} \text{ poise} \cdot \text{cm}$) diferem em aproximadamente um fator de 10 dos valores de Evans, entretanto a medida de τ está bem próxima. Essa diferença pode ter duas razões: a elasticidade determinada por eles é fundamentalmente diferente da nossa ou o nosso modelo por ser bem simples (aproxima a hemácia por paralelepípedo) precisa de um fator geométrico de correção. A divergência entre os valores das viscosidades vem da medida de elasticidade pois $\tau = \eta_{membrana}/\mu$.

Evans usou uma micropipeta e por gradiente de pressão determinou a elasticidade da hemácia se baseando na porção da membrana da célula que era aspirada (ver figura 47). Como essa porção era muito pequena ($\sim 10^{-10} \text{cm}$) e o raio da hemácia é da ordem de 10^{-4}cm , ele não aspirava o citoesqueleto da célula (figura 48). Já no nosso método toda célula sofre a deformação, então a nossa medida está relacionada com a membrana e o

citoesqueleto.

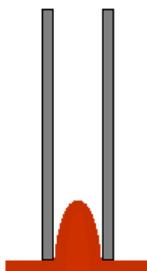


Figura 47 : Micropipeta - método de Evans.

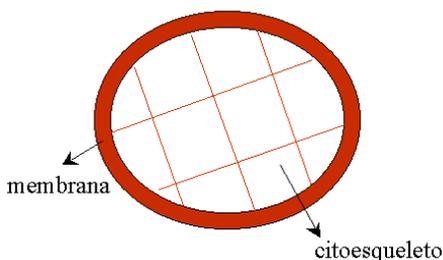


Figura 48 : Célula.

Independentemente do fator de correção, o que é importante é a sensibilidade do nosso método para conclusões comparativas, ou seja, a partir de uma caracterização de hemácias sadias podemos sempre determinar as alterações sofridas pelas hemácias que tiveram suas propriedades modificadas por algum motivo. E ainda, o nosso método é quantitativo e autosuficiente, permitindo medir ambos os parâmetros caracterizadores para uma mesma hemácia e ao mesmo tempo. Também não adicionamos corantes nas amostras, procedimento comumente utilizado para se poder visualizar a hemácia em esfregaços sangüíneos. Vale a pena salientar que o esfregaço promove o achatamento da hemácia, alterando sua forma e sua atividade celular.

5.4 Aplicação do Método de Medida às Hemácias Estocadas.

Uma vez desenvolvidos o método e a técnica para a medida das propriedades de glóbulos vermelhos, aplicamos os mesmos ao estudo de hemácias armazenadas para transfusão no Hemocentro da Unicamp.

Decidimos caracterizar bolsas de 0 dias e 35 dias de armazenamento para observarmos se as hemácias teriam suas propriedades modificadas por estarem tantos dias estocadas, 35 dias é o tempo limite de armazenamento para transfusão.

O preparo das amostras seguiu a mesma padronização da seção anterior. Tanto para 0 como para 35 dias, foram analisadas 25 hemácias, sendo que cada 5 pertenciam a mesma bolsa. Cada hemácias foi submetida a 6 velocidades: $110\mu m/s$, $130\mu m/s$, $150\mu m/s$, $170\mu m/s$, $190\mu m/s$ e $210\mu m/s$.

As diferenças na deformabilidade dessas hemácias (0 e 35 dias), já podem ser observadas macroscopicamente na figura 49 abaixo.

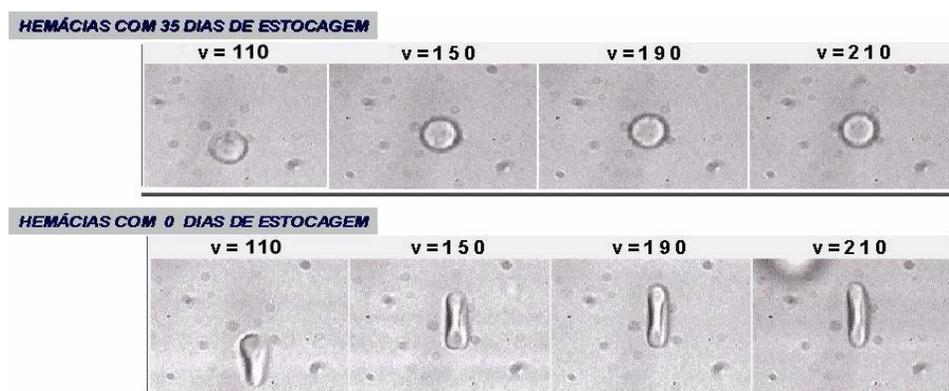


Figura 49: Hemácias de 0 e 35 dias a várias velocidades.

Da mesma forma que na seção anterior, medimos os valores de L (diâmetro de elon-

gação máxima) e L_o (diâmetro de repouso). De posse dos valores de Z_{eq} , η e das velocidades v acima, fizemos os gráficos de L em função de v obtendo os seguintes valores para as constantes elásticas μ ,

dias	elasticidade (10^{-4} dyna/cm)	desvio padrão (10^{-4} dyna/cm)
0	3.07	1.1
35	4.18	1.5

Dados os valores acima, conclui-se que as hemácias de 35 dias são 37% menos deformáveis que as de 0 dias. Vale ressaltar que assim como em um oscilador harmônico, quanto maior o valor da elasticidade μ menos deformável é a membrana dos glóbulos vermelhos.

Por outro lado, se em lugar de fazermos uma média dos valores de L_o das hemácias para obtermos os valores de μ , acharmos os respectivos valores das elasticidades de cada hemácia de comprimento L_o , podemos fazer os seguintes gráficos do diâmetro da hemácia L_o em função de sua elasticidade μ .

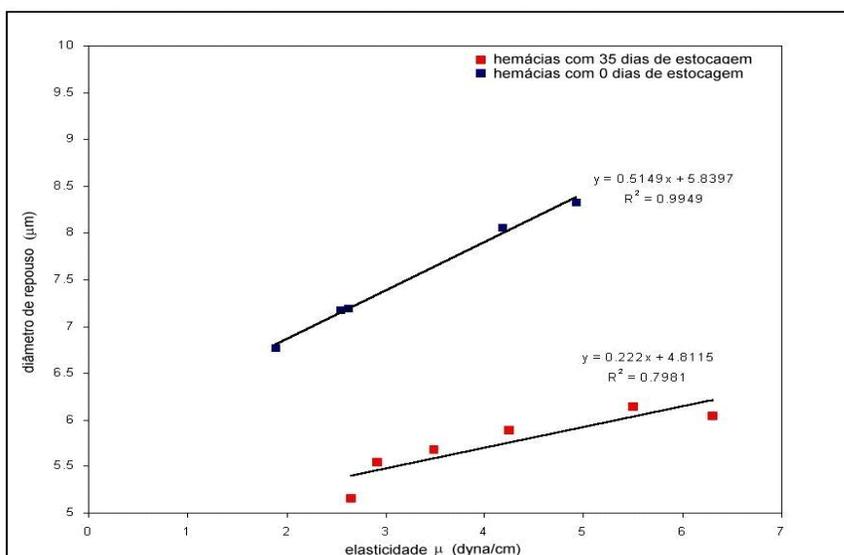


Figura 50: Gráfico dos diâmetros de repouso em função da elasticidade.

Desses gráficos podemos observar que, embora as hemácias de um mesmo dia apresentem diferentes elasticidades entre si e algumas hemácias de 0 dias cheguem a ter a mesma elasticidade de hemácias de 35 dias, temos duas regiões e conseqüentemente duas populações distintas de glóbulos vermelhos. Portanto o nosso método é viável e preciso na caracterização e medida de elasticidade de hemácias estocadas em bancos de sangue.

Há diferenças de elasticidade em uma mesma bolsa devido à existência de glóbulos vermelhos de vários dias na circulação da pessoa que está doando sangue. Então numa bolsa de 0 dias existem hemácias de 0, 10, 30... dias, já em uma bolsa de 35 dias vão existir hemácias de no mínimo 35 dias.

Esses resultados foram publicados na revista Blood [21], até então não constava na literatura nenhum trabalho que caracterizava quantitativamente glóbulos vermelhos estocados.

Capítulo 6

Aplicações à Medida de Forças em Microesferas

6.1 Motivação

Forças da ordem de *piconewtons*, tais como da pinça óptica, só são consideráveis em escala microscópica e justamente por esse motivo têm muitas aplicações importantes. A pinça óptica pode, por exemplo, ser usada para medir forças de adesão de plaquetas e também forças de flagelos de microorganismos tais como espermatozóides (figura 51). A questão da adesão de plaquetas (figura 52) é importante porque para que ocorra a coagulação sanguínea é fundamental que as plaquetas colem as hemácias umas nas outras. Já a questão dos espermatozóides é importante porque muitas vezes o indivíduo tem o número necessário de espermatozóides para fecundação, mas eles não têm motilidade suficiente para chegar ao óvulo.



Figura 51: Espermatozóide capturado pela pinça óptica.

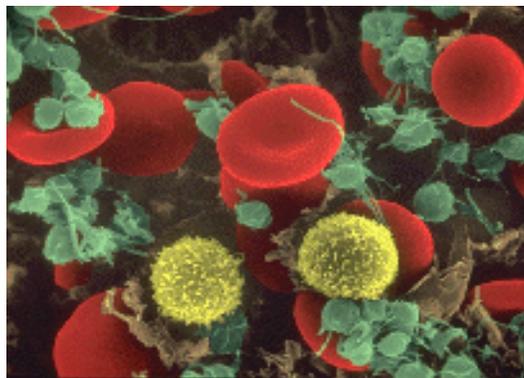


Figura 52: Hemácias (vermelho), linfócitos (amarelo) e plaquetas (verde).

Por outro lado a pinça óptica também pode ser usada para medidas de viscosidade de várias substâncias. Existem muitos métodos que medem essa propriedade dos líquidos, mas todos eles precisam de uma quantidade considerável da substância para isso, enquanto que com a pinça óptica precisamos apenas uma gota ou $1\mu L$ da substância. E qual é a vantagem de se poder medir viscosidade com uma gota do líquido? A vantagem é que podemos medir viscosidades de substâncias, tais como a da medula espinhal (figura 53), que não podem ser conseguidas em abundância.

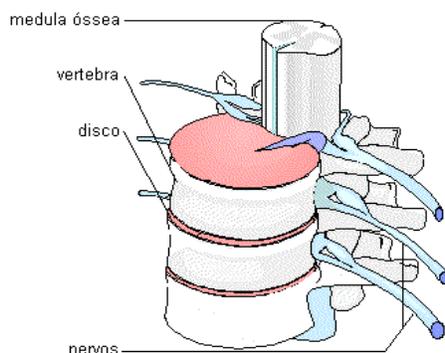


Figura 53: Esquema da medula espinhal.

6.2 Materiais, Métodos e Resultados

Nos capítulos 1 e 2 desenvolvemos a teoria e o programa para que pudéssemos calcular a força que a pinça óptica faz em um microesfera e a força hidrodinâmica que atua sobre a mesma, mas será que essa teoria está de acordo com a realidade da experiência?

Quando uma partícula de índice de refração diferente do meio em que está imersa é submetida a uma velocidade constante, depois de um curto intervalo de tempo, as forças que agem nessa partícula equilibram-se entre si. Se essa partícula é capturada pela pinça óptica, as forças que estarão em equilíbrio serão as forças óptica e hidrodinâmica.

Considere que a partícula é uma esfera, a força óptica que age nessa partícula dependerá do ângulo de convergência θ , do índice de refração da esfera n_1 , do índice de refração do meio n_2 , da velocidade da luz c , da potência do laser P , da distância foco-centro d , do ângulo γ que o segmento foco-centro faz com o eixo z , do raio da esfera a e da polarização do laser. Já a força hidrodinâmica dependerá da viscosidade η do meio em que está a esfera, da posição da partícula Z em relação ao fundo da lâmina onde está, da velocidade v a que está submetida, de seu raio a e dos valores de A e B (rever capítulos 1 e 2).

No momento em que a pinça óptica atua sobre uma esfera, os raios do laser se encontram num ponto f em seu interior e ela fica capturada e em repouso. Quando essa esfera é submetida a uma velocidade constante v na direção de x positivo, ela sofre um deslocamento na direção de x negativo (foco na direção de x positivo em relação ao centro) até que a força óptica que age nessa partícula esteja em equilíbrio com a hidrodinâmica (ver figura 54). A partir do instante em que essas forças estão em equilíbrio, o foco f fica a uma distância fixa do centro e faz um ângulo de 0 graus com o eixo x .

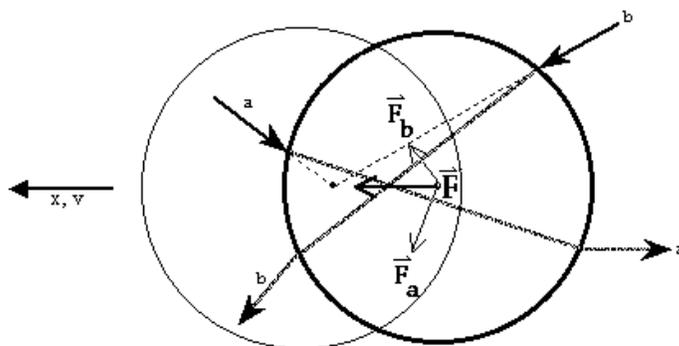


Figura 54: Esquema do deslocamento.

Como a esfera está a uma velocidade constante na direção x , a força hidrodinâmica deve ser equilibrada pela componente x da força óptica total. Devido ao laser de Nd:YAG usado em nosso experimento, essa componente x da força estará sempre polarizada verticalmente ao plano de incidência. E por causa da direção escolhida para o movimento, o valor de γ é sempre 90° .

O sistema experimental é o mesmo da medida de hemácias (figura 28) do capítulo sistema experimental.

As medidas foram feitas com microesferas de poliestireno da Polysciences de diâmetro de $(9 \pm 0.5)\mu m$ e índice de refração $n_1 = 1.61$. Uma gota da solução dessas esferas foi diluída primeiramente em uma concentração de 20% de açúcar com índice de refração

$n_2 = 1.36$ e viscosidade $\eta = 1.94$ centipoise, tabelados no Handbook de Química e Física. A concentração foi preparada diluindo 20g de açúcar para 80g de água destilada. Dessa forma tínhamos 20g de soluto para 100g de solução ou seja uma concentração de 20%. A mistura esferas + concentração foi então levada a um agitador eletromagnético da Fisatom para que essas microesferas fossem dispersadas. A dispersão é fundamental porque as esferas, por serem de poliestireno (um tipo de plástico), têm a tendência para aderir em toda e qualquer superfície.

Depois desse procedimento, uma gota dessa mistura foi acondicionada a uma câmara de Neubauer. Capturamos uma esfera, a levamos a uma distância $Z = 15\mu m$ em relação ao fundo da lâmina e a movimentamos na direção x com velocidades v de 150, 200, 250, 300, 350 $\mu m/s$.

Todas as medidas foram gravadas em fitas de vídeo e foi analisando essas medidas que obtivemos os valores da distância foco-centro d . A análise foi feita capturando, no computador, as imagens da esfera em repouso e em movimento após as forças já estarem equilibradas. Logo após, usamos o software Image Pro-Plus e obtivemos os valores da posição do centro da esfera quando em repouso e em movimento (ver figuras 55 e 56). Obtidos esses valores, subtraímos um do outro que obtivemos o deslocamento d sofrido pela esfera.

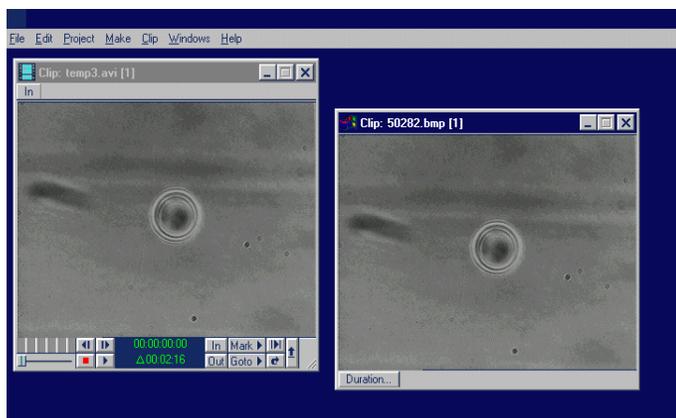


Figura 55: Captura.

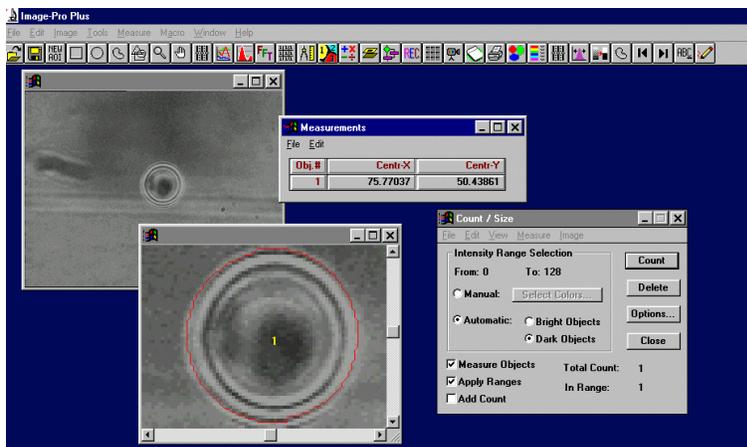


Figura 56: Análise no software.

É importante dizer que esse deslocamento não é tão pequeno e é bem visível macroscopicamente. Para confirmar isso observe a figura 57 que mostra a superposição das imagens da esfera em repouso e a uma velocidade de $350\mu\text{m}/\text{s}$.

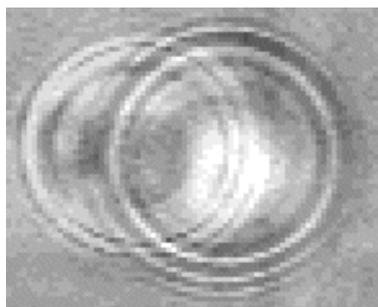


Figura 57: Imagem da superposição de uma microesfera em repouso e movimento.

O valor da potência P foi medido com um medidor da Ophir modelo Nova (figura 58) colocado após a objetiva do microscópio (figura 59). Afinal era a potência que atuava na partícula que nos interessava.

O feixe de laser, depois de passar pela objetiva, converge para um único ponto (foco)

e então diverge (observe a figura 60). Desse modo, dependendo da posição do medidor, a área do feixe do laser é maior que a do detector e o valor medido para a potência será menor que o real. Assim, como não podemos ver um laser infravermelho, precisamos tomar o seguinte procedimento: removemos a plataforma do microscópio, colocamos o medidor longe do foco da objetiva e fizemos a medida. Aproximamos sucessivamente o medidor da objetiva até que o valor não mudasse mais com a aproximação e obtivemos $P = 0.073Watts$. Quando o valor não mudava mais com a aproximação, o feixe do laser estava ocupando uma área menor ou igual a do detector e a medida da potência correspondia ao valor real.

Vale a pena ressaltar que há consideráveis perdas de potência no interior da objetiva pois os filmes das lentes em seu interior foram projetados para o visível e o laser da pinça óptica é infravermelho. Medimos também a potência sem lente e obtivemos $P = 1.3Watts$.

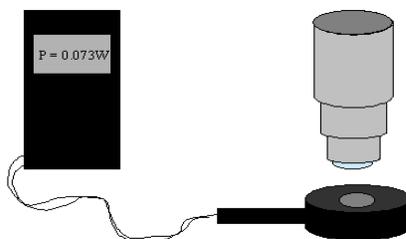


Figura 58: Esquema do medidor de potência.

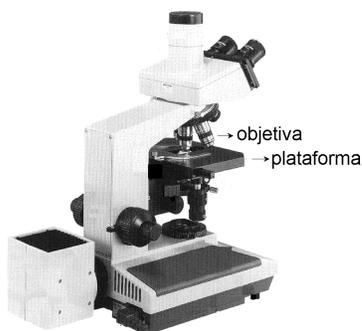


Figura 59: Microscópio.

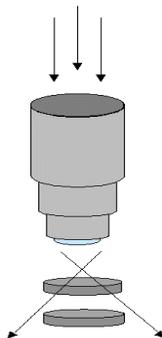


Figura 60: Esquema dos raios do laser passando em uma objetiva.

De posse de todos os parâmetros necessários, encontramos os valores abaixo para as forças óptica e hidrodinâmica que foram calculados a partir dos seus respectivos programas (apêndice).

$Z = 15\mu m$					
velocidade ($\mu m/s$)	150	200	250	300	350
deslocamento (μm)	2.0	2.3	2.8	3.0	3.5
força hidrodinâmica ($10^{-11} N$)	3	4	5	6	7
força óptica ($10^{-11} N$)	3.2	3.7	4.7	5.4	6.7
erro (%)	7.0	7.5	6.0	10	4.3

Como podemos observar através da tabela acima, os valores das forças óptica e hidrodinâmica estão muito próximos um do outro e portanto os modelos de cálculo óptico e hidrodinâmico fornecem valores corretos para a concentração usada. Mas será que esses modelos fornecem valores corretos para $Z \neq 15\mu m$ ou para concentrações diferentes de 20%?

Para encontrarmos a resposta acondicionamos uma gota da mistura de esferas + concentração de 20% a uma câmara de Neubauer. Os valores obtidos para as forças para

$Z = 25, 50, 75$ e $85\mu m$ estão apresentados na tabela abaixo.

$Z = 25\mu m$					
velocidade ($\mu m/s$)	150	200	250	300	350
deslocamento (μm)	1.7	2.2	2.5	2.7	3.0
força hidrodinâmica ($10^{-11} N$)	2.8	3.7	4.7	5.6	6.5
força óptica ($10^{-11} N$)	2.7	3.3	4.0	4.7	5.4
erro (%)	3.6	11	15	16	17

$Z = 50\mu m$					
velocidade ($\mu m/s$)	150	200	250	300	350
deslocamento (μm)	1.8	2.0	2.3	2.6	2.9
força hidrodinâmica ($10^{-11} N$)	2.7	3.6	4.5	5.4	6.3
força óptica ($10^{-11} N$)	2.8	3.2	3.7	4.4	5.0
erro (%)	3.7	11	18	18	20

$Z = 75\mu m$					
velocidade ($\mu m/s$)	150	200	250	300	350
deslocamento (μm)	1.7	2.2	2.6	2.8	3.2
força hidrodinâmica ($10^{-11} N$)	2.8	3.7	4.7	5.6	6.5
força óptica ($10^{-11} N$)	2.7	3.3	4.4	4.7	5.7
erro (%)	3.5	11	6.3	16	12

$Z = 85\mu m$					
velocidade ($\mu m/s$)	150	200	250	300	350
deslocamento (μm)	2.2	2.5	2.8	3.0	3.3
força hidrodinâmica ($10^{-11} N$)	3	4	5	6	7
força óptica ($10^{-11} N$)	3.3	4.0	4.7	5.4	6.0
erro (%)	10	0.0	6.0	10	14

Também diluímos uma gota da solução de esferas em concentrações de 14% e 28% e fizemos medidas a uma distância $Z = 50\mu m$. As concentrações foram preparadas diluindo respectivamente 14 e 28g de soluções para 86 e 72g de água. Elas têm os respectivos índices de refração e viscosidade tabelados, $n_2 = 1.35$, $\eta = 1.43$ centipoise e $n_2 = 1.38$, $\eta = 2.85$ centipoise. Obtivemos os seguintes valores:

14g					
velocidade ($\mu m/s$)	150	200	250	300	350
deslocamento (μm)	1.1	1.5	2.0	2.3	2.5
força hidrodinâmica ($10^{-11} N$)	2.1	2.8	3.6	4.3	5.0
força óptica ($10^{-11} N$)	1.7	2.4	3.2	3.6	4.3
erro (%)	19	14	11	16	14

28g					
velocidade ($\mu m/s$)	150	200	250	300	350
deslocamento (μm)	2.1	2.9	3.1	3.9	4.1
força hidrodinâmica ($10^{-11} N$)	4.0	5.3	6.6	8.0	9.3
força óptica ($10^{-11} N$)	3.3	4.7	5.4	7.7	8.4
erro (%)	17	11	18	3.7	9.6

Assim como podemos ver os valores da força óptica e hidrodinâmica estão de acordo mesmo quando diferentes Z e diferentes concentrações são usadas.

Para se ter uma boa visualização da concordância dessas forças, observe o gráfico abaixo da força óptica contra força hidrodinâmica. Nesse gráfico todos os valores obtidos

estão apresentados.

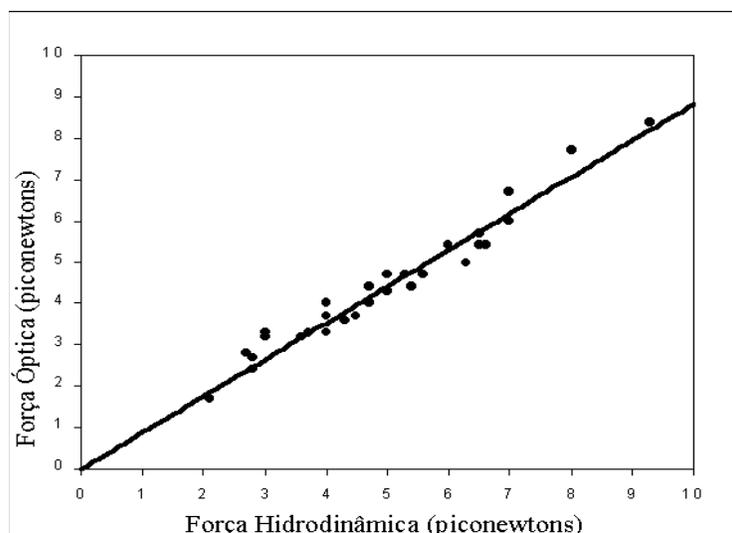


Figura 61: Gráfico da força óptica em função da hidrodinâmica.

De fato, por esse gráfico podemos observar que assim como queríamos, força óptica é praticamente igual à hidrodinâmica. Afinal o coeficiente angular do gráfico é 40° (correlação $\cong 95\%$) quando esperávamos 45° , ou seja, temos um erro médio de 12%.

Como todas as medidas feitas até então sugerem que a teoria está em pleno acordo com a experiência e como no equilíbrio a força óptica é igual e oposta a força hidrodinâmica, podemos agora calcular viscosidades de líquidos. Esse cálculo reforçará ainda mais a validade do nosso modelo.

Escolhemos calcular as viscosidades para concentrações de 20 e 32% de glicerina porque elas estão tabeladas no Handbook de Química e Física. Os valores para os índices de refração também estão tabelados e são $n_2 = 1.36$ para a concentração de 20% e $n_2 = 1.37$ para a de 32%. É importante dizer que escolhemos primeiramente um substância de viscosidade e índice de refração conhecidos por efeito de comparação e validação do método de medida.

Preparamos as concentrações diluindo respectivamente 20 e 32g de glicerina para 80 e 68g de água e levamos as microesferas à distância $Z = 15\mu m$. Obtivemos o deslocamento d e os valores da força óptica.

Lembrando que,

$$F_{\text{óptica}} = F_{\text{hidro}}$$

Obtivemos as seguintes viscosidades:

20g	1.71 centipoise \pm 2%
32g	2.58 centipoise \pm 2%

Os valores tabelados são:

20g	1.73 centipoise
32g	2.63 centipoise

Portanto as viscosidades medidas pelo nosso método estão em pleno acordo com o esperado e o modelo foi reforçado.

Vale ressaltar que esses valores são média dos valores obtidos para cada velocidade. Os valores usados na média e os respectivos deslocamentos da esfera estão na tabela abaixo.

20g					
deslocamento (μm)	1.7	2.3	2.5	3.0	3.3
viscosidade (centipoise)	1.75	1.75	1.67	1.72	1.67
erro viscosidade (%)	1.0	1.0	3.0	0.5	3.0

32g					
deslocamento (μm)	2.5	3.3	3.5	4.0	4.3
viscosidade (<i>centipoise</i>)	2.60	2.77	2.45	2.60	2.50
erro viscosidade (%)	1.0	5.0	7.0	1.0	5.0

6.3 Conclusão

Pelos resultados da seção anterior podemos concluir que o nosso modelo para a força óptica pode e deve ser utilizado para calcular forças da ordem de *piconewtons*. Agora a pinça óptica está calibrada, ou seja, podemos medir forças atuantes em uma partícula capturada independentemente de sua geometria. Para isso, basta aderirmos uma microesfera a essa partícula, submetemos esse sistema a um campo de forças e medirmos o deslocamento sofrido por essa microesfera. Com o deslocamento d e todos os outros valores citados anteriormente se tem o valor da força.

Assim para medirmos, por exemplo a força de adesão de plaquetas, basta aderirmos uma microesfera a uma plaqueta e submetê-la a várias velocidades até que ela se solte da que está colada. Determinamos então o deslocamento d para a velocidade que resultou a separação.

Já para medir a força do flagelo de um espermatozóide, basta aderi-lo a uma microesfera e quantificar o deslocamento que é sofrido por essa devido à tentativa de escape da célula. Vale ressaltar que mesmo que as esferas de poliestireno não se colem nas células, há microesferas apropriadas para esse fim e que até então eram usadas em outras técnicas.

Por outro lado, de acordo com a seção anterior, conclui-se que o nosso modelo para o cálculo da força óptica e hidrodinâmica também pode e deve ser utilizado para medidas de viscosidade, mesmo quando não se conhece o índice de refração da substância. Sempre que necessário podemos medir o índice de refração, usando também apenas uma gota,

no refratômetro do Laboratório de Óptica da Unicamp. Assim para se obter o valor da viscosidade do líquido da medula óssea, basta diluir $1\mu L$ da solução de esferas a uma ou duas gotas desse líquido, capturar uma esfera, submetê-la a várias velocidades, medir o deslocamento d , calcular o valor da força óptica e igualá-la à hidrodinâmica.

Aqui vale a pena enfatizar que se só tivéssemos o objetivo de calcular forças em sistemas biológicos, a força hidrodinâmica seria usada apenas na comprovação do modelo óptico e depois a princípio não seria mais usada na determinação das forças em questão. Já a força óptica seria usada para a comprovação do modelo hidrodinâmico e posteriormente para a determinação das forças desejadas. Por outro lado, se o objetivo fosse calcular viscosidades de fluidos, o modelo óptico seria usado na comprovação do hidrodinâmico e vice-versa e as duas forças continuariam sendo usadas para o cálculo da viscosidade do fluido.

Capítulo 7

Conclusão e Perspectivas

Do exposto anteriormente, observa-se que desenvolvemos dois métodos bem fundamentados e independentes usando-se apenas a pinça óptica. São eles: medida de propriedades mecânica de hemácias, medida de forças ópticas e calibração do sistema. O resultado do nosso trabalho com hemácias estocadas foi publicado na revista *Blood* sob o título “*Mechanical Properties of Stored Red Blood Cells Using Optical Tweezers*” [21].

Vale ressaltar que agora o nosso laboratório detém o bisturi óptico, uma outra ferramenta essencial em trabalhos biológicos.

A medida de propriedades de células pode também ser usada para identificar e quantificar alterações na deformabilidade de glóbulos vermelhos deficientes ou sujeitos à medicamentos. Bem como ainda pode ser estendida para outras células, tais como linfócitos, cujos valores das propriedades elásticas sejam importantes.

Atualmente, há uma aluna da Biologia estudando alterações de membranas de hemácias sujeitas à anestésico local, anti-psicótico e anti-parasitário. Ainda não temos resultados quantitativos, mas só pelas movimentações dos glóbulos vermelhos percebe-se que as células sujeitas à medicamentos se deformam menos que as sadias. Quanto menor a

deformação das hemácias menor a sua eficiência no organismo.

A calibração do sistema abre um novo horizonte de aplicações. Como há pessoas interessadas, pretendemos num futuro próximo, utilizar o método de medida de força óptica em cálculos de viscosidade do líquido da medula espinhal e em medidas de força de adesão de plaquetas.

E por fim, dentre outras experiências que irão surgir, queremos desenvolver uma pinça óptica de mais de um feixe para que possamos ampliar mais ainda o nosso número de trabalhos.

Bibliografia

- [1] C.S. Buer, K.T. Gahagan, A. Grover A et al. : *“Insertion of Agrobacterium rhizogenes into Ginkgo biloba using lasers as optical tweezers and scalpel ”*. Plant Physiol., vol. 114, pg. 1613, 1997.
- [2] [Anon]: *“Optical tweezer attaches single DNA molecular to silicon”*. Laser Focus World, vol. 34, pg. 9-9, 1998.
- [3] N. Thomas, R.A. Thornhill: *“The physics of biological molecular motors”*. J Phys D Appl Phys, vol. 31, pg. 253, 1998.
- [4] A. Obruca, H. Strohmer, A. Blaschitz et al. : *“Ultrastructural observations in human oocytes and preimplantation embryos after zona opening using an erbium-yttrium-aluminium-garnet (Er : YAG) laser”*. Hum Reprod, vol. 12, pg. 2242, 1997.
- [5] S. Sugiura, N. Kobayakawa, H. Fujita et al.: *“Comparison of unitary displacements and forces between 2 cardiac myosin isoforms by the optical trap technique - Molecular basis for cardiac “adaptation”*. Circ Res, vol. 82, pg. 1029, 1998.
- [6] H. Felgner, R. Frank, M. Schliwa: *“Flexural rigidity of microtubules measured with the use of optical tweezers”*. J Cell Sci vol. 109, pg. 509, 1996.
- [7] K. Sakata-Sogawa, M. Kurachi, K. Sogawa K et al.: *“Direct measurement of DNA molecular length in solution using optical tweezers: detection of looping due to binding protein interactions”*. Eur Biophys J Biophy, vol. 27, pg. 55, 1998.

- [8] K. Konig, L. Svaasand, Y.G. Liu et al.: “*Determination of motility forces of human spermatozoa using an 800 nm optical trap*”. *Cell Mol Biol*, vol. 42, pg. 501, 1996.
- [9] K. Helmerson, R. Kishore, W.D. Phillips et al.: “*Optical tweezers-based immunosensor detects femtomolar concentrations of antigens*”. *Clin Chem*, vol. 43, pg. 379, 1997.
- [10] H.C. Berg, R.M. Berry: “*Absence of a barrier to backwards rotation of the bacterial flagellar motor demonstrated with optical tweezers*”. *P Natl Acad Sci USA*, vol. 94, pg. 14433, 1997.
- [11] A. Ashkin, J. Dziedzic, J. Bjorkholm, S. Chu: “*Observation of a Single-Beam Gradient Force Optical Trap for Dielectric Particles*”. *Optic Lett.*, vol. 11, pg. 288-290, 1986.
- [12] A. Ashkin, J. Dziedzic: “*Optical Trapping and Manipulation of Viruses and Bacteria*”. *Science*, vol. 235, pg. 1517 - 1520, 1987.
- [13] A. Ashkin, J. Dziedzic: “*Internal Cell Manipulation Using Infrared Laser Traps*”. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, pg. 7914-7918, 1989.
- [14] N. Mohandas: “*Red Cell Membranes*”, pg. 271-320, 1988.
- [15] S. Suter, R. Gardner, C. Boylan, G. Carroll, K. Chang, J. Marvel, C. Kilo, B. Gonen, J. Williamson: “*Age- Related Changes in Deformability of Human Erythrocytes*”. *Blood*, vol. 65, pg. 275-282, 1985.
- [16] R.Hochmuth, P. Worthy, E. Evans: “*Red Cell Extensional Recovery and the Determination of Membrane Viscosity*”. *Biophysical J.*, vol. 26, pg.101-114, 1979.
- [17] L. Dintenfass: “*Internal Viscosity of the Red Cell and a Blood Viscosity Equation*”. *Nature*, vol. 219, pg. 956-958, 1968.

-
- [18] E. Evans, R. Hochmuth: “*Membrane viscoelasticity*”. Biophysical J., vol. 16, pg. 1, 1976.
- [19] P. Tippet: “*What is important on the red blood cell surface?*”. Immunological Investigations 24, pg. 173-186, 1995.
- [20] R. Waugh; E. Evans: “*Thermoelasticity of Red Blood Cell Membrane*”. Biophysical J., pg.115-132, 1979.
- [21] R.R. Huruta, M. L. BarjasCastro, S. T. O. Saad, F. F. Costa - Hematology - Hemotherapy Center and
A. Fontes*, L. C. Barbosa* and C. L. Cesar* - *Instituto de Fisica Gleb Wataghin:
“*Mechanical Properties of Stored Red Blood Cells Using Optical Tweezers*”. Blood, October 15, 1998, pg 92-98.
- [22] A. Ashkin (1992): “*Forces of a Single-Beam Gradient Laser Trap on a Dielectric Sphere in The Ray Optics Regime*”. Biophysics J., vol.61, pg. 569-582.
- [23] W. Wright, J. Sonek, M. Berns: “*Parametric Study of the Forces on Microspheres Held by Optical Tweezers*”. Applied Optics, vol. 33, n° 9, pg. 1735-1748.
- [24] H. Felgner, O. Müller, M. Schliwa: “*Calibration of light forces in optical tweezers*”. Applied Optics, vol. 34, n° 6, pg977-982.
- [25] R. Omori, T. Korayashi, S. Miyamoto, A. Suzuki: “*Measurements of Optical Trapping Efficiency for Micron-Sized Dielectric Particles in Various Surrounding Media*”. Optical Review, vol. 3, n° 1, 1996.
- [26] J. Walz, D. Prieve: “*Prediction and Measurement of the Optical Trapping Forces on a Microscopic Dielectric Sphere*”. Langmuir, vol. 8, pg. 3073-3082, 1992.
- [27] H. Misawa, M. Koshioka, K. Sasaki, N. Kitamura, H. Masuhara: “*Three-dimensional Optical Trapping and Laser Ablation of a Single Polymer Latex Particle in Water*”. Appl. Phys. J., n° 70, pg. 3829-3836.

- [28] J. Bateman, E. Weneck, D. Eshler: “*Determination of Particle Size and Concentration from Spectrophotometric Transmission*”. Colloid Sci. J., n° 14, pg. 308-329.
- [29] J. Happel, H. Brenner: “*Low Reynolds Number Hydrodynamics with Special Applications to Particulate Media*”, (1965).
- [30] W. M. Swanson: “*Fluid Mechanics*”, (1970).
- [31] R. von Mises, K. O. Friedrichs: “*Fluid Dynamics*”, (1971).
- [32] D. J. Tritton: “*Physical Fluid Dynamics*”, (1994).
- [33] J. D. Jackson: “*Classical Electrodynamics*”, (1925).

Apêndices

Programa para o Cálculo
da
Força Óptica

Programa para o Cálculo
da
Força Hidrodinâmica