

Julho 2023

António da Cruz Castelo Carneiro da Rocha

**Determinação das propriedades viscoelásticas de biomateriais por espectroscopia de Brillouin**



António da Cruz Castelo Carneiro da Rocha

**Determinação das propriedades viscoelásticas de biomateriais por espectroscopia de Brillouin**



Julho 2023





**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

António da Cruz Castelo Carneiro da Rocha

**Determinação das propriedades viscoelásticas  
de biomateriais por espectroscopia de  
Brillouin**

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

Eletrónica Médica

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Doutor José Artur Oliveira Rodrigues

Julho 2023

# Direitos de Autor e Condições de Utilização do Trabalho por Terceiros

**Nome:** António da Cruz Castelo Carneiro da Rocha

**Título da Dissertação:** Determinação das propriedades viscoelásticas de biomateriais por espectroscopia de Brillouin

**Mentor:** José Artur Oliveira Rodrigues

**Ano de Conclusão:** 2023

**Designação do Mestrado:** Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

**Ramo do Mestrado:** Eletrónica Médica

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



**Atribuição-NãoComercial-SemDerivações**  
**CC BY-NC-ND**

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Universidade do Minho, 26/07/2023

# Agradecimentos

Em reconhecimento às pessoas que tornaram possível a realização da presente dissertação deixo a seguinte menção.

Primeiramente, quero agradecer ao meu orientador, Doutor José Artur Rodrigues, pela orientação prestada, por todo o apoio, pela paciência, por todos os bons conselhos e recomendações e pela total disponibilidade. Sob a tua orientação fui capaz de seguir em frente, com certeza no caminho escolhido.

Agradeço também a todos os membros do laboratório CMEMS-UMinho, em especial ao professor José Higinio Correia por todo o apoio, pela disponibilidade e por todos os conselhos e recomendações.

Aproveito também para agradecer à Pastoral Universitária de Braga, a minha segunda casa, e em especial à Susana e ao Pe. Eduardo Duque pela amizade, competências desenvolvidas e pelo facto de me terem proporcionado vivências únicas onde aprendi muito. Agradecer as comunidades de Txada Loura em Cabo Verde e Cumura na Guiné-Bissau por me proporcionarem uma nova forma de viver e olhar para a vida.

A todos os meus amigos, obrigado pelos momentos de boa disposição e camaradagem ao longo destes anos, que foram fundamentais no meu percurso.

À minha namorada, Maria, pela compreensão, pelo incentivo, pela paciência nos momentos mais complicados e por todas as palavras amigas. O teu apoio incondicional foi determinante neste processo.

A toda a minha família, obrigado pela presença e por todo o apoio. Aos meus avós por todas as palavras sábias e momentos de aprendizagem. À minha irmã Leonor agradeço toda a cumplicidade, amizade e por me motivar todos os dias a ser melhor. Em especial, aos meus queridos pais agradeço pelo amor incondicional, por todas as oportunidades proporcionadas e por serem verdadeiros pilares na minha vida. Esta menção não chega perto de fazer justiça à vossa influência neste percurso.

# Declaração de Integridade

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração. Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Universidade do Minho, 26/07/2023

Assinatura: 

# Resumo

O conhecimento das propriedades viscoelásticas dos biomateriais tem sido, nas últimas décadas, um dos grandes focos do estudo científico. Como se sabe, o desenvolvimento tecnológico tem vindo a fornecer ferramentas inovadoras para o estudo destas propriedades. Com a evolução do conhecimento de todas as questões relacionadas com a ótica, a tecnologia e a ciência, foram criadas as condições necessárias para o aparecimento da espectroscopia de Brillouin. Este tipo de espectroscopia consiste, de forma resumida, no estudo da difusão inelástica da luz numa amostra, utilizando normalmente luz emitida por um laser a 532 nm. É possível usar os dados recebidos pela tecnologia em questão para a obtenção das propriedades viscoelásticas da amostra pretendida. Durante a presente dissertação, a geometria utilizada será sempre a de *backscattering*, que permite a obtenção de resultados mais fidedignos e precisos.

A espectroscopia de Brillouin é uma técnica não invasiva, *label-free* e não destrutiva, oferecendo um conjunto de características distintas do restante leque de opções da área da ótica. Os picos de Rayleigh, de Stokes e de Anti-Stokes obtidos aquando da realização de cada medição serão analisados através de *software*, e a partir daqui serão obtidos os valores de *storage* e *loss modulus*.

O objetivo da presente dissertação consiste no estudo das propriedades viscoelásticas de biomateriais, mais especificamente do agar, através da espectroscopia de Brillouin, pretendendo-se criar um banco de dados conciso e viável com as propriedades estudadas e adquiridas. Para ser possível obter conclusões sobre o tópico em questão, é necessário conhecer os valores da densidade e do índice de refração das amostras estudadas. Desta forma, serão desenvolvidos métodos e modelos para obtermos estes valores.

O trabalho desenvolvido na dissertação estabelece alicerces pertinentes no estudo das propriedades viscoelásticas das amostras de agar, mas também no desenvolvimento do estudo da espectroscopia de Brillouin no seu geral. Assim sendo, é possível comprovar que para o estudo de bactérias e de vírus, devem-se usar aditivos distintos, sendo eles a triptona para o primeiro e o extrato de levedura ou malte para o segundo. Se o objetivo fosse então o crescimento celular das culturas dever-se-ia usar o extrato de malte. Caso contrário os aditivos ideais seriam a triptona ou o extrato de levedura.

**Palavras-chave:** Espectroscopia de Brillouin, propriedades viscoelásticas, biomateriais, *backscattering*.

# Abstract

In recent decades, knowledge of biomaterials' viscoelastic properties has been one of the major focuses of scientific study. As known, technological development has been providing innovative tools for the study of these properties. With the evolution of knowledge of all issues related to optics, technology, and science, the necessary conditions were created for the emergence of Brillouin spectroscopy. This type of spectroscopy consists, in summary, in the study of the inelastic dispersion of light in a sample, normally using light emitted by a laser at 532 nm. It is possible to use the data received by the technology in question to obtain the viscoelastic properties of the intended sample. During the present dissertation, the geometry used will always be backscattering, which allows the obtaining of more reliable and precise results.

Brillouin spectroscopy is a non-invasive, label-free, and non-destructive technique, offering a set of characteristics that are different from the rest of the range of options in the field of optics. The Rayleigh, Stokes, and Anti-Stokes peaks obtained during each measurement will be analyzed using software, and from here the storage and loss modulus values will be obtained.

This dissertation aims to study the determination of the viscoelastic properties of biomaterials, more specifically agar, through Brillouin spectroscopy, intending to create a concise and viable database with the studied and acquired properties. To be able to reach conclusions about the topic in question, it is necessary to know the density and refractive index values of the studied samples. In this way, methods and models will be developed to obtain these values.

The work developed in the dissertation establishes relevant foundations in the study of the viscoelastic properties of agar, but also in the development of the study of Brillouin spectroscopy in general. Therefore, it is possible to prove that for the study of bacteria and viruses, different additives must be used, namely tryptone for the first and yeast extract or malt for the second. If the objective was cell growth in cultures, malt extract should be used. Otherwise, the ideal additives would be tryptone or yeast extract.

**Keywords:** Brillouin spectroscopy, viscoelastic properties, biomaterials, backscattering.

---

# Índice

---

<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 Biomateriais e a sua importância na área biomédica .....	1
1.2 Estudo das propriedades viscoelásticas .....	3
1.3 Métodos de determinação da viscoelasticidade .....	8
1.4 Motivação e objetivos .....	9
1.5 Organização da dissertação.....	10
<b>2. Estado da arte.....</b>	<b>11</b>
2.1 Conceitos básicos da espectroscopia.....	11
2.2 Espectroscopia de Brillouin .....	15
2.3 Difusão em diferentes materiais e modelo viscoelástico .....	21
2.3.1 Difusão de Brillouin em materiais viscoelásticos .....	21
2.3.2 Difusão de Brillouin em materiais heterogêneos .....	27
2.4 Tipos de espectrômetros de Brillouin .....	29
2.4.1 Espectroscopia de Brillouin usando interferômetros Fabry-Pérot.....	29
2.4.2 Espectroscopia de Brillouin usando <i>Virtually Imaged Phased Array</i> .....	34
2.5 Evolução da espectroscopia: sistema multimodal Brillouin-Raman.....	37
<b>3. Materiais e Métodos .....</b>	<b>40</b>
3.1 Preparação das amostras.....	40
3.2 <i>Setup</i> experimental .....	42
3.2.1 Espectrômetro de Brillouin .....	43
3.1.2 Refratômetro .....	46
3.1.3 Medições da densidade .....	49
<b>4. Resultados obtidos .....</b>	<b>51</b>
4.1 Composição das amostras .....	51
4.2 Difusão de Brillouin .....	52

4.3 Índice de refração .....	55
4.4 Densidade .....	57
4.5 Modelo viscoelástico .....	59
<b>5. Discussão dos resultados .....</b>	<b>61</b>
5.1 Discussão dos resultados .....	61
<b>6. Conclusão e Trabalho futuro .....</b>	<b>67</b>
6.1 Conclusão.....	67
6.2 Trabalho futuro .....	68
<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>69</b>

---

# Lista de siglas e acrónimos

---

## B

BS Espectroscopia de Brillouin

## C

CCD Dispositivo de Acoplamento de Carga

CMEMS-UMinho Centro de Sistemas Micro-Eletromecânicos – Universidade do Minho

## D

DHO Oscilador Harmónico Amortecido

## F

FSR Gama Espectral Livre

## H

HWHM Metade da Largura a Metade do Máximo

## M

MCA Analisador Multicanal

## N

NA Abertura Numérica

## O

OCT Tomografia de Coerência Ótica

## R

RGB Vermelho-Verde-Azul

## T

TFPI Interferómetro *Tandem* Fabry-Pérot

## V

VIPA Matriz de Fase Virtualmente Gerada

---

# Lista de grandezas

---

<b>Símbolo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Unidade</b>
<b>T</b>	Temperatura	°C
<b>t</b>	Espessura	m
<b>v</b>	Viscosidade cinemática	m <sup>2</sup> /s
<b>P</b>	Pressão	Pa
<b>F</b>	Força	N
<b>E</b>	Campo elétrico	V
<b>R</b>	Resistência	Ω
<b>P</b>	Potência	W
<b>f</b>	Frequência	Hz
<b>ρ</b>	Densidade	Kg/m <sup>3</sup>

---

# Lista de figuras

---

<b>Figura 1.1:</b> Diagrama das características ideais de um biomaterial (adaptado de [3]).....	2
<b>Figura 1.2:</b> Exemplos de aplicações médicas dos biomateriais (adaptado de [6]). .....	3
<b>Figura 1.3:</b> Principais deformações ocorridas nos materiais (adaptado de [13]). .....	7
<b>Figura 2.1:</b> Esquemático experimental utilizado por Isaac Newton para a observação do fenómeno da difusão da luz usando um prisma de vidro [27]. .....	11
<b>Figura 2.2:</b> Propagação da radiação eletromagnética (adaptado de [29]). .....	12
<b>Figura 2.3:</b> Fenómenos óticos que ocorrem aquando da incidência de radiação eletromagnética (adaptado de [31]). .....	13
<b>Figura 2.4:</b> Interação da radiação eletromagnética com o sistema físico e posterior deteção pelo olho humano (adaptado de [31]). .....	14
<b>Figura 2.5:</b> Linha temporal do desenvolvimento instrumental e aplicação do Brillouin (adaptado de [36]). .....	16
<b>Figura 2.6:</b> Diagrama de energia simplificado para os picos de Stokes, Anti-Stokes e Rayleigh (adaptado de [39]). .....	18
<b>Figura 2.7:</b> Exemplo de uma difusão de Brillouin para uma amostra biológica (adaptado de [13])... ..	18
<b>Figura 2.8:</b> Exemplo de alteração do vetor de onda $q$ [46]. .....	19
<b>Figura 2.9:</b> Curvas de difusão para amostras com diferentes taxas de relaxamento estrutural. A amarelo está a zona de difusão de Brillouin. O gráfico a) é uma amostra semelhante a um líquido, b) semelhante a um sólido e c) um gel (adaptado de [9,38]). .....	23
<b>Figura 2.10:</b> Forma como o tempo de relaxamento e período da onda acústica influenciam as características dos picos de Brillouin. O gráfico a) é uma amostra semelhante a um líquido, b) semelhante a um sólido e c) um gel (adaptado de [13]). .....	26
<b>Figura 2.11:</b> Esquemático da difusão de Brillouin em materiais heterogéneos (adaptado de [55])... ..	27
<b>Figura 2.12:</b> Espectro de Brillouin dependendo das escalas espaciais. Podem ser: (a) média; (b) único; (c) soma dos espectros obtidos (adaptado de [13]). .....	28
<b>Figura 2.13:</b> Esboço inicial do setup experimental utilizando o TFPI para uma geometria backscattering (adaptado de [57]). .....	30
<b>Figura 2.14:</b> Esquemático de um Interferómetro Tandem Fabry-Pérot de três passagens (adaptado de [43]). .....	32

<b>Figura 2.15:</b> Esquema simples, vantagens e desvantagens de um Tandem Fabry-Pérot (adaptado de [13]).	33
<b>Figura 2.16:</b> Interferómetro Tandem Fabry-Pérot utilizando no laboratório do CMEMS-UMinho.	33
<b>Figura 2.17:</b> Esquemático de um espectrómetro single-stage VIPA (adaptado de [64]).	35
<b>Figura 2.18:</b> Esquemático de um espectrómetro multi-stage VIPA (adaptado de [9]).	35
<b>Figura 2.19:</b> Geometria do etalon do VIPA com respetivas distâncias transversais e longitudinais (adaptado de [40]).	36
<b>Figura 2.20:</b> Esquema simplificado, vantagens e desvantagens de VIPA (adaptado de [13]).	37
<b>Figura 2.21:</b> Comparação entre os deslocamentos de frequência dos picos da espectroscopia Brillouin e Raman (adaptado de [47]).	38
<b>Figura 2.22:</b> Exemplo de micro-espectroscopia multimodal Brillouin-Raman (adaptado de [9]).	39
<b>Figura 3.1:</b> Procedimento realizado para a obtenção das amostras de agar: a) adição de 60 ml de água destilada; b) adição de soluto; c) aguardar 15 minutos; d) encher a cuvete com a quantidade desejada.	41
<b>Figura 3.2:</b> Amostras de agar com extrato de levedura a diferentes concentrações: a) cuvetes transparentes; b) placa de Petri.	42
<b>Figura 3.3:</b> Representação do setup ótico usado na aquisição de um espectro de Brillouin. Os componentes usados foram os seguintes: 1) fonte de luz laser a 532 nm; 2) lente convexa; 3) beam splitter; 4) entrada de referência do TFPI; 5) filtro retangular de densidade ótica variável; 6) espelho; 7) prisma espelhado; 8) amostra; 9) plataforma móvel; 10) lente de colimação de curta distância focal; 11) lente coletora convexa.	44
<b>Figura 3.4:</b> Setup ótico usado na aquisição de um espectro de Brillouin.	46
<b>Figura 3.5:</b> Configuração usada para a medição da deslocação do feixe (adaptado de [81]).	47
<b>Figura 3.6:</b> Deslocação do feixe de luz ao longo do eixo devido à refração na amostra e nas paredes da cuvete (adaptado de [81]).	47
<b>Figura 3.7:</b> Design do refratómetro utilizado para a obtenção do índice de refração das amostras de agar.	48
<b>Figura 4.1:</b> Exemplo de um espectro de uma amostra realizada (amostra 13).	52
<b>Figura 4.2:</b> Exemplo de um espectro que possui multiple scattering.	53
<b>Figura 4.3:</b> Exemplo de um ajuste a um espectro de uma amostra realizada (amostra 13).	53
<b>Figura 4.4:</b> Deslocamento de frequência e largura do pico dos espectros de Brillouin de todas as amostras em função da concentração em massa de cada componente estudado.	54

<b>Figura 4.5:</b> Deslocamento de frequência e largura do pico dos espectros de Brillouin de todas as amostras em função da concentração em massa da água.....	55
<b>Figura 4.6:</b> Exemplo de uma medição obtida através da refratometria (amostra 21).....	55
<b>Figura 4.7:</b> Representação do sinal adquirido com o refratômetro utilizado. O sinal a) refere-se a uma cuvette cheia de água; b) a uma cuvette com gel de agar; c) a uma cuvette com a maior concentração estudada de gel de agar com levedura. ....	56
<b>Figura 4.8:</b> Índice de refração de todas as amostras em função da concentração em massa da água. ....	57
<b>Figura 4.9:</b> Densidade aproximada de todas as amostras em função da concentração em massa de cada componente estudado. ....	58
<b>Figura 4.10:</b> Densidade aproximada de todas as amostras em função da concentração em massa da água.....	59
<b>Figura 4.11:</b> Storage e loss modulus de todas as amostras em função da concentração em massa de cada componente estudado. ....	60
<b>Figura 4.12:</b> Storage e loss modulus de todas as amostras em função da concentração em massa da água.....	600

---

## Lista de tabelas

---

<b>Tabela 4.1:</b> Concentrações de cada componente nas amostras realizadas. ....	51
<b>Tabela 4.2:</b> Densidade das soluções saturadas e dos solutos em pó.....	57

---

# Lista de equações

---

Equação (1.1) – Tensão de cisalhamento .....	4
Equação (1.2) – Tensão de cisalhamento tendo em conta a viscosidade .....	4
Equação (1.3) – Viscosidade dinâmica.....	4
Equação (1.4) – Viscosidade cinemática .....	4
Equação (1.5) – Viscosidade longitudinal .....	5
Equação (1.6) – Módulo de Young .....	6
Equação (1.7) – Relação entre o módulo longitudinal, o módulo de Young e o coeficiente de Poisson ..	6
Equação (1.8) – Módulo de cisalhamento .....	6
Equação (1.9) – Relação entre o módulo de Young, cisalhamento e volumétrico.....	6
Equação (1.10) -Módulo longitudinal usando módulo de Young e volumétrico .....	6
Equação (2.1) – Energia do fóton .....	12
Equação (2.2) – Relação entre o comprimento de onda e a velocidade.....	12
Equação (2.3) – Lei de Senll-Descartes.....	14
Equação (2.4) – Frequência final do fóton que sofre <i>scattering</i> .....	17
Equação (2.5) -Deslocamento de frequência dos picos de Brillouin usando a velocidade e o momento da onda .....	19
Equação (2.6) – Momento trocado durante a difusão da luz.....	19
Equação (2.7) – Vetor de onda da luz incidente .....	19
Equação (2.8) – Deslocamento de frequência para picos de Brillouin usando velocidade, comprimento de onda e índice de refração.....	20
Equação (2.9) – Módulo elástico longitudinal .....	20
Equação (2.10) – <i>Complex longitudinal modulus</i> .....	21
Equação (2.11) – Função <i>Damped Harmonic Oscillator</i> .....	22
Equação (2.12) – <i>Storage modulus</i> .....	22
Equação (2.13) – <i>Loss modulus</i> .....	22
Equação (2.14) – <i>Storage modulus</i> em condições de relaxamento .....	24
Equação (2.15) – Velocidade adiabática do som .....	24
Equação (2.16) – <i>Loss modulus</i> dado em termos da viscosidade cinemática longitudinal .....	24
Equação (2.17) – Viscosidade cinemática longitudinal.....	24

Equação (2.18) – <i>Longitudinal modulus</i> até ao valor tipo sólido.....	24
Equação (2.19) – Tempo de relaxamento e período da onda acústica .....	25
Equação (2.20) – Menor escala espacial da difusão num material heterogéneo.....	288
Equação (2.21) – <i>Free Spectral Range</i> .....	30
Equação (3.1) – Função <i>Damped Harmonic Oscillator</i> utilizada no <i>Ghos</i> .....	45
Equação (3.2) – Cálculo do índice de refração da amostra de interesse.....	49
Equação (3.3) – Cálculo da constante necessária para obtenção do índice de refração.....	49
Equação (3.4) – Modelo de mistura ideal bifásico .....	49
Equação (3.5) – Densidade individual de cada componente .....	50
Equação (4.1) – Cálculo do peso total de gel de agar produzido.....	52
Equação (4.2) – Equação rearranjada do <i>storage modulus</i> .....	59
Equação (4.3) – Equação rearranjada do <i>loss modulus</i> . .....	59

# Capítulo 1

---

## 1. Introdução

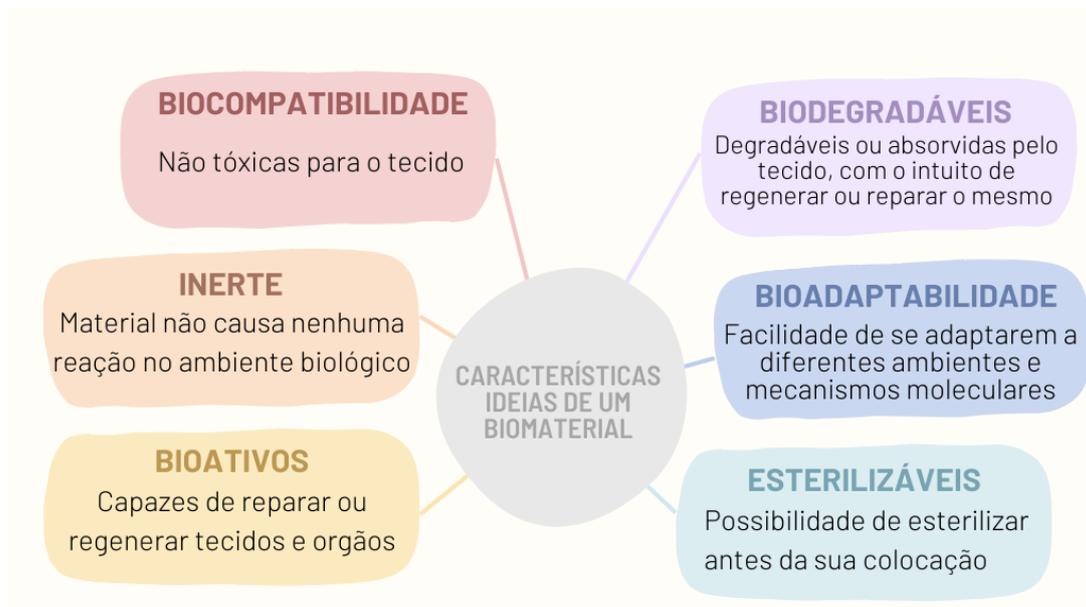
---

No presente capítulo serão abordados conceitos básicos sobre os biomateriais, fundamentais para o desenvolvimento do trabalho, assim como os diferentes tipos existentes. É ainda realizada uma revisão sobre as propriedades viscoelásticas (viscosidade e elasticidade). De seguida, serão abordados alguns métodos de determinação da viscoelasticidade. Finalmente, serão apresentadas a motivação e os objetivos bem como a organização da dissertação.

### 1.1 Biomateriais e a sua importância na área biomédica

Ao longo dos últimos anos os biomateriais têm conquistado muito interesse como uma categoria importante de materiais devido à sua alargada aplicação na medicina, e às suas inúmeras qualidades, como por exemplo, o aumento significativo da longevidade e a melhoria da qualidade de vida. O estudo dos biomateriais tem contribuído significativamente para o rápido crescimento das áreas cirúrgicas e da tecnologia médica. O termo biomaterial foi primeiramente definido em 1987 como “um material não viável usado num dispositivo médico, destinado a interagir com sistemas biológicos” [1]. Atualmente, biomaterial é sinónimo de material biomédico, e tem como definição ser “um material projetado para assumir uma função que pode direcionar, através de diversas interações com sistemas vivos, o curso de qualquer diagnóstico ou procedimento terapêutico” [2].

Idealmente, os biomateriais devem possuir algumas características (Figura 1.1). Por consequência, o grau de qualidade das características significará a capacidade que o biomaterial teria para a aplicação biomédica. É de mencionar que as características ideais influenciarão na mimetização do ambiente a que o biomaterial estará sujeito.



**Figura 1.1:** Diagrama das características ideais de um biomaterial (adaptado de [3]).

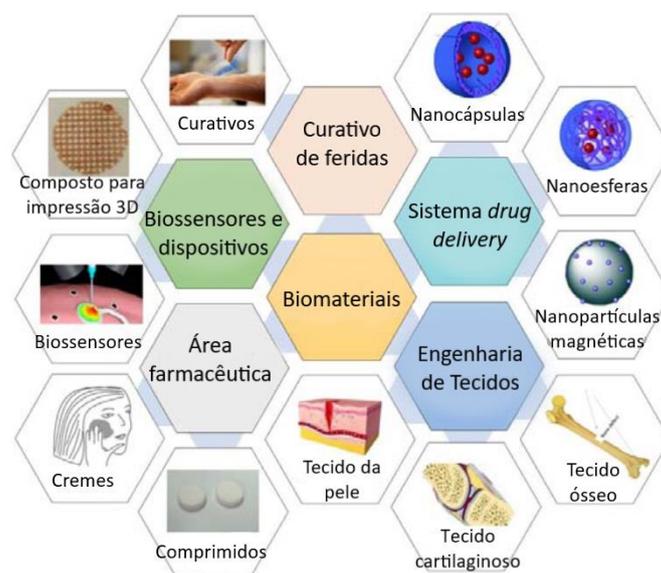
Além destas características, existem ainda outras que podem ser tidas em conta, como por exemplo, a força, a rigidez e o custo. Os conhecimentos de todas estas propriedades são importantes para a determinação da possível utilização para as diferentes aplicações médicas.

Para melhor perceber as aplicações dos biomateriais pelas suas características, estes são classificados em 4 grandes categorias: poliméricos, cerâmicos, metálicos e compósitos [1]. Os primeiros são constituídos por polímeros, que são macromoléculas resultantes da repetição de muitas unidades de moléculas pequenas, conhecidas como monómeros. As propriedades que tornam este biomaterial único são a sua flexibilidade, resistência a ataques bioquímicos, excelente biocompatibilidade, leves, amplamente disponíveis, variedade nas propriedades físicas e mecânicas e facilidade de serem fabricadas com uma forma desejada. Os cerâmicos têm como principais características a dureza, a força, a rigidez e a resistência à corrosão. O facto de serem isoladores térmicos constitui também uma grande vantagem. Os biomateriais metálicos, frequentemente usados como ligas metálicas têm como grande vantagem a sua força e resistência à corrosão (durabilidade), além das excelentes propriedades elétricas, condutividade térmica, biocompatibilidade e preço. Em contrapartida estes materiais podem em alguns casos causar reações alérgicas a alguns indivíduos e são suscetíveis à corrosão em certos ambientes. Por fim, os biomateriais compósitos são uma combinação de dois ou mais materiais, de forma a combinar as melhores propriedades dos mesmos. São amplamente usados em engenharia de tecidos, pois têm a capacidade de imitarem estruturas de tecidos vivos e possuem uma excelente biocompatibilidade [4].

No que diz respeito às origens dos biomateriais estes podem ser naturais, obtidos através de plantas, animais ou mesmo de forma geológica, ou sintéticos quando são produzidos laboratorialmente [3,5].

Desta forma, os biomateriais são um grupo diversificado de materiais concebidos para interagir com sistemas biológicos. O facto de possuírem propriedades únicas possibilita a facilidade de adaptação a outros sistemas e ambientes.

A interferência do biomaterial na saúde humana tornou-se necessária para uma melhor qualidade de vida. Como podemos observar na Figura 1.2, existem diversas aplicações dos biomateriais que são uma ajuda imprescindível na área da biomédica e da saúde.



**Figura 1.2:** Exemplos de aplicações médicas dos biomateriais (adaptado de [6]).

## 1.2 Estudo das propriedades viscoelásticas

A viscoelasticidade é a propriedade dos materiais que exibe tanto características viscosas como elásticas, aquando da sua deformação [7]. O comportamento viscoelástico de um material é caracterizado pela habilidade de se deformar, quando é aplicada uma pressão, e voltar à sua forma original [8]. Este comportamento surge da combinação de duas propriedades distintas, a viscosidade e a elasticidade.

Os materiais viscoelásticos têm como característica o facto de serem frequência-dependentes, ou seja, as suas propriedades e comportamento podem alterar com a frequência das forças aplicadas [9]. Além disso, a viscoelasticidade é importante em muitas outras questões de engenharia, como por

exemplo, no comportamento do movimento dos fluidos em máquinas, podendo afetar a eficiência e o desempenho das mesmas.

A viscosidade foi inicialmente definida por Isaac Newton como uma relação proporcional entre o escoamento do fluido e a força dirigida no próprio [10], ou seja, é uma medida de resistência deste ao fluxo. É uma propriedade importante dos fluidos porque determina como os mesmos interagem com superfícies sólidas. Por consequência, fluidos com uma maior viscosidade são mais espessos e movem-se mais devagar, ao contrário daqueles com menor viscosidade.

Existem diversos tipos de viscosidade, utilizadas para os mais diferentes aspectos desta propriedade, que serão abordados mais à frente. Inicialmente é necessário conhecer a fórmula da tensão de cisalhamento, dada por:

$$\tau = \frac{F}{A} \quad (1.1)$$

, onde  $F$  é a força aplicada em Newton e  $A$  a área em metros quadrados. De notar que a tensão de cisalhamento tem como unidade o Pascal (Pa). Para se obter a viscosidade, e sabendo que a equação anterior é igual a:

$$\tau = \eta \frac{du}{dy} \quad (1.2)$$

, onde  $du$  é a derivada da velocidade e  $dy$  a derivada da distância percorrida, e que o seu quociente fornece a taxa de deformação de cisalhamento, podemos então concluir que a viscosidade dinâmica, em Pa·s é dada por:

$$\eta = \frac{Fy}{Au} \quad (1.3)$$

A viscosidade cinemática descreve o comportamento do fluxo da substância sobre a influência da gravidade da Terra, e é dada pelo quociente entre a viscosidade dinâmica e a densidade ( $\rho$ ) [11].

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \quad (1.4)$$

Existe ainda outro tipo de viscosidade que será muito importante, a viscosidade longitudinal, que mais tarde será relacionada com o *loss modulus* ( $M''$ ) [9]. A viscosidade longitudinal é uma medida da resistência de um fluido para fluir na direção da força de cisalhamento aplicada, estando relacionada com a viscosidade em volume ( $\eta_v$ ) e a viscosidade de cisalhamento ( $\eta_s$ ). A viscosidade em volume é uma propriedade do fluido que descreve uma resistência à taxa de mudança de volume [12]. Por sua vez, a viscosidade de cisalhamento é a propriedade que descreve a resistência a uma tensão de cisalhamento. Em suma, a viscosidade longitudinal é dada pela equação 1.5 [13].

$$\eta_L = \eta_b + \frac{4}{3}\eta_s \quad (1.5)$$

A elasticidade, por sua vez, é uma propriedade do material que gera força de recuperação na aplicação de uma força externa para deformação do material [8], ou seja, refere-se à habilidade dos materiais voltarem à sua forma original após deformação ou, por outras palavras, resistirem a uma força externa [14]. Na teoria, quanto mais elásticos os materiais forem, maior e menos permanente será a sua deformação.

Para melhor entender esta propriedade, definem-se três conceitos principais: módulo de Young ( $E$ ), módulo de cisalhamento ( $G$ ) e coeficiente de Poisson ( $\nu$ ). Este último é uma medida da contração de um material na direção perpendicular à tensão aplicada, ou seja, é o quociente entre a deformação lateral e a deformação longitudinal, sendo dependente da frequência [15].

O módulo de Young é uma medida de rigidez de um material, sendo definida como a razão entre a tensão aplicada (força de tração,  $\sigma$ ) a um material e a sua deformação resultante ( $\epsilon$ ), sendo dada pela seguinte equação:

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon} \quad (1.6)$$

O módulo de Young pode ser relacionado com o módulo longitudinal ( $M$ ) através do coeficiente de Poisson, da seguinte forma [13]:

$$M = \frac{E(1 - \nu)}{(1 + \nu)(1 - 2\nu)} \quad (1.7)$$

A partir desta fórmula, pode-se ficar com a impressão, de forma errada, que  $M$  e  $E$  possuem a mesma ordem de grandeza. Sabendo que o valor do coeficiente de Poisson para os biomateriais se encontra próximo dos 0.5 [13,16], é possível perceber o porquê destes valores não possuírem a mesma ordem de grandeza.

Finalmente, o módulo de cisalhamento ( $G$ ) é uma medida da resistência de um material à deformação por cisalhamento [8]. É definida como a razão entre a tensão de cisalhamento aplicada ( $\gamma$ ) e a deformação de cisalhamento resultante.

$$G = \frac{\gamma}{\varepsilon} \quad (1.8)$$

Além disso, é possível relacionar ambos os módulos através da equação seguinte:

$$E = \frac{9KG}{3K + G} \quad (1.9)$$

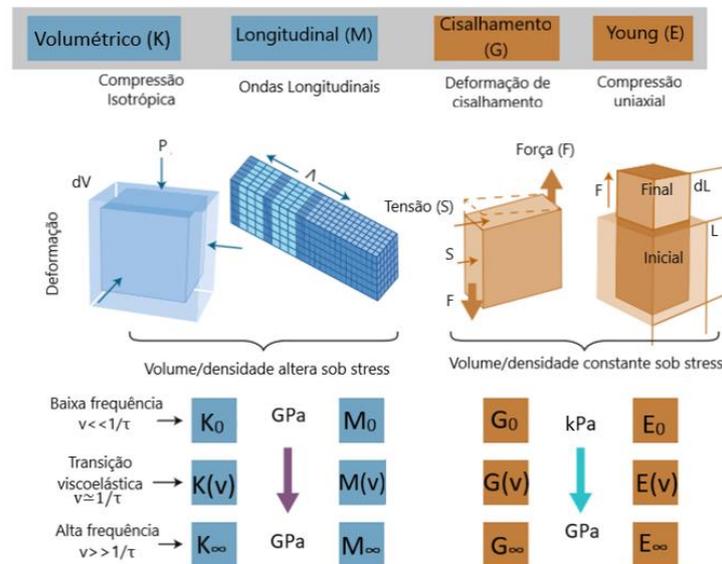
, onde  $K$  é o módulo volumétrico. Os valores do módulo de cisalhamento,  $G$ , e, por consequência do módulo de Young serão zero para baixas frequências, ou seja, na fase líquida. Este valor chega à ordem dos kPa-MPa quando se aproximam de uma transição sol-gel.

Em contrapartida, o módulo longitudinal detetado pela espectroscopia de Brillouin (BS) está também relacionado com a elasticidade através da seguinte equação:

$$M = K + \frac{4}{3}G \quad (1.10)$$

O módulo volumétrico é uma medida de compressibilidade de um material e é definida como a razão da tensão aplicada radialmente pela mudança relativa do volume. Para materiais altamente incompressíveis, como líquidos e sólidos, o valor de  $K$ ,  $G$ , e, por consequência, de  $M$  serão relativamente elevados e muito semelhantes. Por sua vez, o módulo de cisalhamento, já definido anteriormente, por norma, possui um valor muito menor, a não ser que a tensão seja aplicada rápido o suficiente para evitar que o sistema relaxe [13]. Nesse caso, ambos os valores de  $G$  e  $K$  estarão na ordem dos GPa. Pelo facto de incluir o valor do módulo volumétrico, o valor de  $M$  estará sempre na ordem dos GPa, mesmo para materiais líquidos [9].

Tanto as deformações volumétricas como deformações por módulo longitudinal são associadas a deformações que alteram o volume da amostra. Por outro lado, os outros dois tipos de deformação presentes na seguinte figura referem-se a deformações que conservam o volume da amostra. Na Figura 1.3 serão apresentados os principais tipos de deformações que podem ocorrer nos materiais.



**Figura 1.3:** Principais deformações ocorridas nos materiais (adaptado de [13]).

Além disso, é também possível concluir a partir da figura anterior que as deformações, que alteram o volume da amostra, assumem valores na ordem dos GPa para qualquer frequência. No que diz respeito às deformações a volume constante verifica-se que a baixas frequências estas possuem valores na ordem dos kPa, como visto anteriormente. Para frequências maiores do que aquelas que envolvem transições viscoelásticas, a matéria começa a ter um comportamento muito semelhante a um sólido, levando a que os valores destas deformações atinjam a ordem dos GPa.

Como iremos ver mais à frente, a partir de um conceito chamado módulo longitudinal complexo, a parte real fornece informações sobre as propriedades elásticas dos materiais, enquanto a parte imaginária do número complexo fornece informações sobre a viscosidade longitudinal [13]. No que toca a toda a questão da BS, estes valores serão facilmente obtidos visto que o primeiro é observado através da posição do pico de Brillouin e o segundo será observado através da largura do mesmo.

### **1.3 Métodos de determinação da viscoelasticidade**

O estudo da viscoelasticidade é crucial nos mais diversos campos, incluindo as áreas da física, biologia, engenharia de materiais, medicina, entre outros. Determinar as propriedades viscoelásticas de um material é essencial para prever o seu comportamento sob diferentes condições de carga e conceber produtos que suportem o nível de tensão desejado. De seguida, serão apresentados alguns métodos para a determinação das propriedades viscoelásticas.

A primeira técnica abordada é a citometria de torção magnética, que consiste na conexão de uma esfera magnética a uma superfície celular e na consequente torção utilizando um campo magnético rotativo. Isto permite medir o torque resultante e o ângulo de torção, fornecendo informações sobre as propriedades mecânicas da superfície com que está em contato, nomeadamente das propriedades viscoelásticas [17]. Esta técnica tem sido usada para estudar o DNA e RNA, entre outros, fornecendo também informações sobre os processos biológicos.

A técnica de microscopia de deformação consiste na obtenção de imagens da superfície de uma amostra antes e depois da aplicação de uma carga e, em seguida, utilizar técnicas de processamento de imagens para determinar a deslocação e a deformação da amostra [18]. Isto permite o cálculo das propriedades mecânicas, como por exemplo, o módulo de Young ou o coeficiente de Poisson, necessários para a obtenção das propriedades viscoelásticas.

A micro-reologia, técnica usada amplamente na obtenção das propriedades viscoelásticas, envolve o acompanhamento do movimento Browniano, ou seja, o movimento aleatório das partículas suspensas num fluido resultante da sua colisão com átomos da própria amostra, e a análise do seu movimento para extrair informações sobre as propriedades em questão [19]. Esta técnica permite a conceção e otimização de novos materiais e dispositivos para as mais diversas aplicações.

Outra técnica que possui uma elevada importância no estudo destas propriedades é a microscopia de força atômica (AFM), sendo utilizada para obter imagens e manipular superfícies à nanoescala. A técnica envolve a passagem de uma ponta afiada sobre a superfície de uma amostra, enquanto se mede a força entre a ponta e a amostra [20]. Ao mover a ponta de forma controlada é possível gerar imagens de alta resolução da superfície e obter informações sobre as suas propriedades mecânicas.

Por fim, temos a BS, sendo esta a técnica que será utilizada e estudada ao detalhe ao longo da presente dissertação. De uma forma muito sumarizada, a BS baseia-se na interação entre a luz e amostra, levando à difusão dos fótons com uma mudança de frequência proporcional à frequência da onda acústica. Com as mudanças de frequência da luz dispersa, é possível obter as propriedades viscoelásticas da amostra. Ao contrário de todas as técnicas abordadas anteriormente, a BS é a única

que é considerada não invasiva, e a par da micro-reologia as únicas que são consideradas quer *label-free*, quer não destrutivas [21,22], advindo daqui uma das grandes vantagens da utilização desta técnica.

## 1.4 Motivação e objetivos

O estudo das propriedades mecânicas e viscoelásticas dos materiais têm desencadeado ao longo dos anos o desenvolvimento de tecnologias que têm como função a obtenção destas mesmas propriedades com um elevado grau de precisão e qualidade. A BS surge como uma das técnicas revolucionárias e de grande destaque, permitindo obter através de todo um conjunto de questões óticas as propriedades em questão.

Serão estudadas as propriedades viscoelásticas do biomaterial agar. O agar é usado maioritariamente como meio de cultura celular. A cultura celular é o processo de crescimento de células num meio adequado e num ambiente controlado, tendo uma vasta gama de aplicações, como descoberta de novos medicamentos, engenharia de tecidos, investigação biomédica e controlo da qualidade [23,24]. O conhecimento das propriedades viscoelásticas permite uma melhor gestão e escolha dos componentes a utilizar em cada tipo de cultura, que por sua vez oferecerão resultados mais fidedignos [25].

Nesta tecnologia são utilizados além de um laser e de uma grande quantidade de espelhos óticos, um interferómetro. O laser de luz verde irá seguir um caminho ótico até chegar à amostra. O feixe irá incidir na amostra e parte da luz dispersa entra no espectrómetro, através do *pinhole*. Já dentro do espectrómetro, a luz encontrará dois pares de espelhos, conhecidos como interferómetro *Tandem Fabry-Pérot*. No final das seis passagens pelos espelhos, a luz finalizará o seu percurso entrando no fotodetector, permitindo assim a obtenção dos dados.

A presente dissertação visa desenvolver um estudo sobre as propriedades viscoelásticas das diferentes amostras de agar com diferentes concentrações utilizando a BS, tendo como objetivos:

1. Estudo do estado da arte sobre o funcionamento de dinâmicas de todo o conjunto do equipamento que é utilizado na BS;
2. Aprendizagem das questões óticas, e estudo da difusão da luz para os diferentes tipos de biomateriais, concentrações, temperaturas, entre outros;
3. Escrita de um breve manual de calibração e utilização do sistema;
4. Preparação e realização de diferentes amostras;
5. Obtenção dos dados relativos à BS, refratometria e medição da densidade;
6. Análise dos resultados obtidos pela BS utilizando o *software Ghost*;
7. Obtenção dos valores da *storage* e *loss modulus*;

8. Conclusão sobre qual dos biomateriais, tendo em conta todas as características obtidas, usar em diferentes aplicações.

## **1.5 Organização da dissertação**

A presente dissertação encontra-se dividida em seis capítulos.

O primeiro capítulo diz respeito aos conceitos introdutórios da dissertação. Este inicia-se com uma breve apresentação sobre os biomateriais e a sua importância, passando desde as características de um biomaterial ideal até as diferentes categorias de classificação. É ainda realizada uma análise das propriedades viscoelásticas dos materiais, que será importante para obter e discutir os resultados posteriores. São apresentados também alguns métodos de determinação destas características. Por último, é apresentada a motivação para a realização deste trabalho.

O segundo capítulo começa por introduzir os conceitos básicos da espectroscopia, que serve de ponto de partida para a realização da dissertação. São exploradas as funções da mesma e todos os conceitos e terminologias que fazem parte do seu *background*. De seguida, é realizada a análise bibliográfica do estado da arte relativo à BS. É ainda abordado o estado da arte dos diferentes tipos de interferómetros, VIPA e *Tandem Fabry-Pérot*, e a fusão de dois tipos distintos de espectroscopia, Raman e Brillouin. O capítulo aborda também como é que a presente tecnologia pode ser utilizada na área da saúde.

No terceiro capítulo é explicada detalhadamente toda a metodologia e materiais utilizados para se atingirem os resultados pretendidos, desde a preparação das amostras estudadas até à demonstração e utilização do *setup* experimental. Este capítulo apresenta a parte prática elaborada ao longo do último ano para obter os dados necessários para a dissertação.

No quarto capítulo são apresentados os resultados obtidos das medições da BS, do refratómetro e da densidade.

De seguida, o quinto capítulo é dedicado à discussão dos resultados e é discutida a finalidade que cada biomaterial produzido poderá ter.

Por fim, o sexto capítulo aborda as principais conclusões da dissertação. São também discutidas as perspectivas de trabalho futuro.

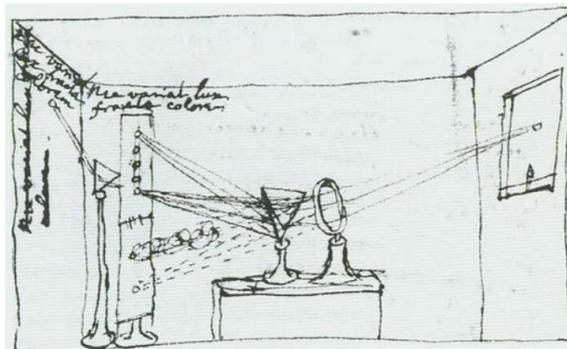
# Capítulo 2

## 2. Estado da arte

No presente capítulo são abordados os conceitos básicos da espectroscopia, fundamentais para o desenvolvimento do trabalho, assim como a complexidade envolvida no processo. É ainda apresentada a evolução da BS, a sua crescente importância em direção a uma possível implementação a uma escala global e como é realizado o fenómeno da difusão. São também explorados diferentes tipos de interferómetros, e uma possível junção de diferentes espectrómetros.

### 2.1 Conceitos básicos da espectroscopia

A espectroscopia é o estudo de sistemas físicos através da sua interação com a radiação eletromagnética, servindo como meio de obter informações sobre os sistemas e os seus componentes [26]. Em 1666, Isaac Newton ao incidir luz branca num prisma de vidro verificou (Figura 2.1) que esta se dividia num conjunto de componentes coloridos, à qual chamou de “espectro”, sendo esta a primeira aparição da palavra [27].



**Figura 2.1:** Esquemático experimental utilizado por Isaac Newton para a observação do fenómeno da difusão da luz usando um prisma de vidro [27].

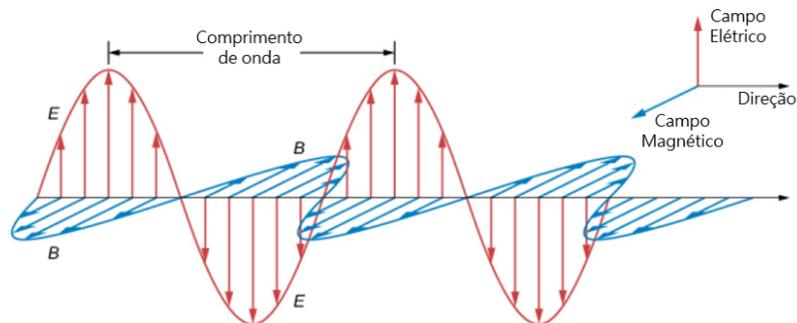
Para realizar a espectroscopia são necessários três constituintes básicos: a fonte de radiação eletromagnética, um sistema físico (capaz de ser um elemento dispersor) e um detetor. A radiação eletromagnética é o conjunto de um campo magnético com um elétrico, sendo que ambos vibram com a mesma frequência e perpendicularmente, na forma de fótons (Figura 2.2). Cada fóton tem uma energia definida ( $E$ ) que apenas depende da frequência da radiação ( $\nu$ ):

$$E = h \cdot \nu \quad (2.1)$$

A constante de Planck ( $h$ ), possui o valor de  $6.626 \times 10^{-34}$  J·s. A intensidade da radiação depende do número de fótons. Além disso, podemos relacionar a frequência e o comprimento de onda através da relação:

$$\nu = c/\lambda \quad (2.2)$$

Apesar dos fótons não necessitarem de um meio para se propagarem, ou seja, de terem a aptidão de se propagarem no vácuo, têm a capacidade de se propagarem em meios materiais e de induzir transições entre diferentes níveis de energia [28]. Quando se propagam no vácuo atingem a velocidade da luz, ou seja, uma velocidade de aproximadamente 300 milhões de metros por segundo ( $c$ ).

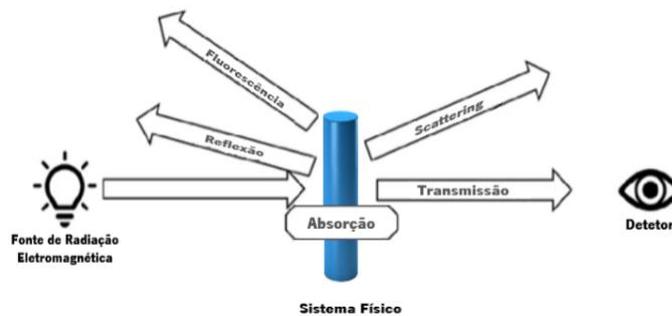


**Figura 2.2:** Propagação da radiação eletromagnética (adaptado de [29]).

No que concerne ao sistema físico, este pode ser uma infinidade de coisas, e.g. soluções, gases, objetos, entre outros, espalhando a luz emitida em vários comprimentos de onda. Por fim, o detector tem a finalidade de medir a intensidade da luz nos vários comprimentos de onda.

Após a radiação eletromagnética ser emitida pela fonte e encontrar o sistema físico, existe a possibilidade de ocorrerem diferentes fenômenos óticos, dependendo das características do próprio sistema. Os possíveis fenômenos são apresentados na Figura 2.3. A absorção consiste na captura e transformação da energia, sendo que um objeto perfeitamente preto absorve toda a radiação recebida. A reflexão, fenômeno antagônico da absorção, consiste em reenviar a radiação eletromagnética de volta para o meio, e como se sabe um material perfeitamente branco reflete toda a radiação. A fluorescência

é um processo que ocorre através da emissão de luz quando elétrons excitados a absorvem. Por fim, temos a transmissão, passagem da radiação eletromagnética pelo sistema, que pode ser acompanhada de *scattering*. Este último será muito relevante para a presente dissertação. *Scattering*, em português, difusão, é o fenómeno no qual os raios de luz se desviam do seu caminho reto aquando da colisão com um obstáculo [30].



**Figura 2.3:** Fenómenos óticos que ocorrem aquando da incidência de radiação eletromagnética (adaptado de [31]).

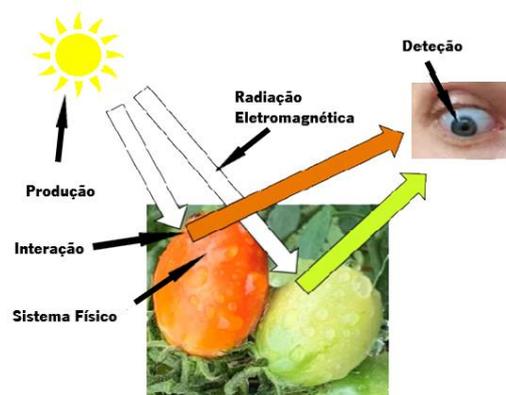
O ser humano pode ser considerado um espectrómetro natural. Criando um caso fictício no qual uma pessoa está a avaliar o grau de maturação de uma fruta ao ar livre, podemos concluir que a radiação eletromagnética seria a luz solar, o sistema físico a fruta e o detetor o olho humano. Ao interagir com o sistema físico, a luz vai sofrer alguns dos processos referidos anteriormente. Verifica-se uma alteração da cor, pois parte da luz é absorvida pela fruta. A quantidade e a região espectral em que são absorvidos depende dos átomos e moléculas da mesma. A luz não absorvida é detetada pelos nossos olhos, transportando com ela a informação das estruturas moleculares. Nos nossos olhos a cor é analisada por três diferentes tipos de fotorreceptores que absorvem luz em diferentes regiões espectrais.

Usar o olho como detetor possui algumas desvantagens, visto que apenas possui três fotorreceptores para a deteção de cores (RGB), onde cada um tem uma resposta com máxima sensibilidade no comprimento de onda correspondente a cada uma das cores. Em contrapartida, não possui esta excelente sensibilidade para os restantes comprimentos de onda, “obrigando” o cérebro a um processamento da cor recebida.

Para obter um espectrómetro é, por fim, necessário um sistema de leitura dos dados recebidos pelo recetor, que irá providenciar uma indicação visual da quantidade de luz no comprimento de onda recebido. Como visto anteriormente, o cérebro tem essa capacidade.

Observando a Figura 2.4, após receber as informações através dos olhos, o nosso cérebro seria capaz de identificar qual seria a fruta pronta a comer, e qual aquela que estava verde, apenas pela cor

observada. No caso de querer padronizar a recolha da fruta para possível venda ou estudo, seria benéfico utilizar um espectrómetro capaz de detetar o grau de maturação da fruta, mais detalhadamente, através do comprimento de onda analisado para uma recolha de dados em grande escala.



**Figura 2.4:** Interação da radiação eletromagnética com o sistema físico e posterior detecção pelo olho humano (adaptado de [31]).

Existem dois tipos de espectroscopia: atômica, onde a radiação eletromagnética é absorvida e emitida pelos átomos, e molecular onde a interação é com a molécula. A partir do primeiro tipo de espectroscopia é possível identificar os elementos e as transições dos elétrons do estado de menor energia para estados excitados. Da espectroscopia molecular podemos obter informações como a estrutura molecular e o tipo de molécula. Aqui as transições dos elétrons, vibrações e rotações ocorrem também do estado de menor energia para estados excitados [32].

A ótica é um ramo da física que estuda o comportamento e as propriedades da luz, considerando também as interações entre a luz, a matéria e os instrumentos utilizados. Portanto tudo que se relacione com espectroscopia, está de forma inerente relacionado com este ramo da física.

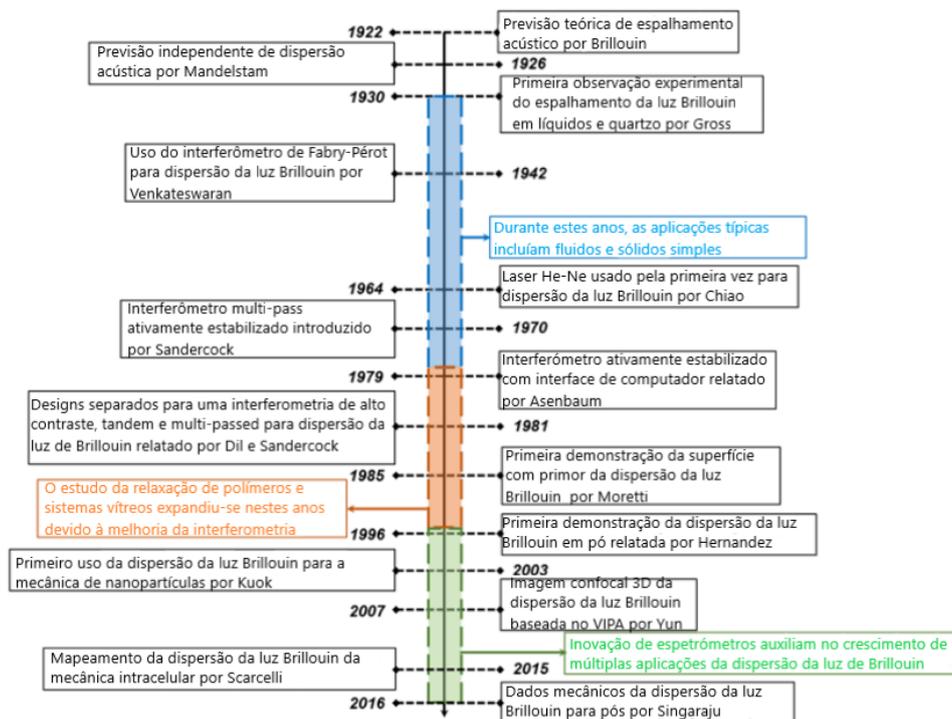
A lei de Snell-Descartes, é uma das leis mais importantes da física, mas em específico da ótica. Quando um feixe de luz passa de um meio para outro, ou de uma densidade para outra, ao encontrar uma interface ocorre uma refração, alterando a velocidade e a direção do feixe [33]. A partir desta lei é possível calcular o índice de refração de um material utilizando a equação 2.3. De notar que  $n_1$  e  $n_2$  são os índices de refração dos diferentes materiais, e  $\theta_1$  e  $\theta_2$  os ângulos que o feixe faz com a normal na superfície em que há a alteração dos índices [34].

$$n_1 \cdot \sin(\theta_1) = n_2 \cdot \sin(\theta_2) \quad (2.3)$$

As lentes são essencialmente elementos de controlo de luz, feitas de um material dielétrico transparente possuindo faces com uma curvatura esférica e que podem ser utilizadas das mais diversas formas possíveis. Uma das vantagens das lentes em relação aos espelhos é que estas são transparentes, o que permite que a luz seja transmitida diretamente ao longo do eixo até ao detetor [35]. Como as superfícies são curvas, os raios de luz paralelos ao eixo ótico irão refratar-se de acordo com a lei de Snell-Descartes. Lentes convexas ou positivas têm a capacidade de fazer os feixes de luz convergir para o designado ponto focal. Por sua vez, as lentes côncavas ou negativas irão divergir do ponto focal. Todas as questões até aqui abordadas serão de enorme relevo para a realização da dissertação.

## **2.2 Espectroscopia de Brillouin**

A primeira previsão teórica do efeito pelo qual um feixe de luz coerente difundia ondas acústicas termicamente induzidas, sofrendo um *shift* de frequência igual ao da frequência acústica da onda, ocorreu em 1922, e foi relatado por um físico francês de nome Léon Brillouin. Passados quatro anos, Mandelstam deparou-se com uma descoberta semelhante, e, foi só em 1930 que a primeira experiência foi realizada por Gross [9]. Na Figura 2.5 podemos observar um pouco do que foi a história da BS, no último século. Na última década a BS tem tido uma crescente importância, particularmente nas aplicações biomédicas, devido a dois fatores. Primeiramente, a tecnologia necessária para realizar a espectroscopia tem evoluído de forma exponencial, e, em segundo lugar, devido ao crescimento da área da mecanobiologia [7].



**Figura 2.5:** Linha temporal do desenvolvimento instrumental e aplicação do Brillouin (adaptado de [36]).

As propriedades mecânicas dos tecidos vivos são relevantes para o estudo das funções e desenvolvimento celular, e para a saúde em geral. Ao ser uma tecnologia não invasiva, *label-free* e não destrutiva, a BS oferece muitas vantagens em relação a outros métodos existentes de caracterização das propriedades dos materiais [37].

A uma escala celular, a elasticidade e a viscosidade regulam a diferenciação celular e a migração, além de determinarem como as células irão responder a fatores físicos e ao ambiente. Ao nível dos tecidos, estas propriedades são importantes na morfogênese e na organização celular [13]. O conceito do Brillouin pode ser usado em diferentes técnicas para além da espectroscopia, como por exemplo, imagem Brillouin, microespectroscopia, microscopia, endoscopia, entre outras [7]. A BS proporciona a obtenção de propriedades mecânicas únicas tanto a nível celular como dos tecidos, que não seria possível de obter utilizando outras técnicas como a espectroscopia Raman ou a OCT. Além disso, estudos mais recentes apontam para uma conjugação desta tecnologia com as mencionadas anteriormente que permitirão obter um maior conjunto de propriedades numa só aquisição.

Os dois principais fenómenos óticos que ocorrem quando um feixe de luz passa pela matéria são a absorção e a difusão. Os átomos e as moléculas absorvem a energia proveniente da luz, onde parte é dissipada na forma de calor, e a restante reemitida. À medida que aumenta a distância de propagação,

a intensidade da luz vai decaindo exponencialmente. Assim, pode-se concluir que o fenômeno da difusão depende principalmente do tamanho da partícula em relação ao comprimento de onda do feixe incidente [7].

A BS refere-se à detecção e análise de um ponto único da difusão da luz de Brillouin recolhido de uma amostra de interesse, permitindo o estudo das propriedades mecânicas de um material usando uma difusão inelástica da luz incidente [9]. Baseia-se na interação entre um fóton e um fonão acústico [38]. A difusão pode ser de dois tipos, elástico e inelástico. O elástico (Rayleigh) ocorre quando não há alteração da energia do fóton incidente, o que leva a que o comprimento de onda da luz dispersa se mantenha, como podemos observar na Figura 2.6. No espectro da frequência o pico de Rayleigh é o pico central (frequência igual à da luz incidente) e aquele que possui maior intensidade. Uma pequena fração da luz incidente, na ordem dos pico ( $10^{-12}$ ), pode interagir com as ondas acústicas e trocar energia e momento no processo.

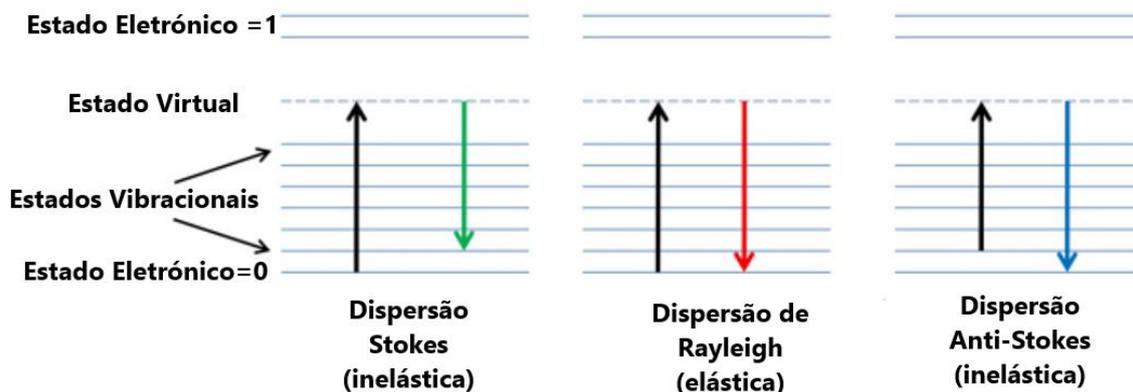
As ondas acústicas atuam de forma semelhante a uma grade que difrata a luz (*grating diffraction*) e viajam de forma paralela, igualmente espaçada e a velocidade constante, resultantes das flutuações de densidade tempo-dependentes [9]. Desta forma, é mais fácil decompor a luz em muitos comprimentos de onda de uma só vez. Porém, esta *grating diffraction* possui algumas desvantagens, como por exemplo, a eficiência da difração ser dependente do estado de polarização ou poder ocorrer uma difusão angular insuficiente [40].

Os fonões movem-se à velocidade do som, e tal interação resulta numa mudança de frequência da luz que sofreu difusão, devido ao efeito de Doppler, precisamente pela frequência do fóton ( $\Omega$ ) [41]. Consequentemente, se o fóton incidente possuir uma frequência de  $\omega_i$ , a frequência do fóton que sofre difusão é dada pela equação:

$$\omega_s = \omega_i \pm \Omega \quad (2.4)$$

A energia pode ser transferida do fonão para o fóton (+), ou vice-versa (-) [7].

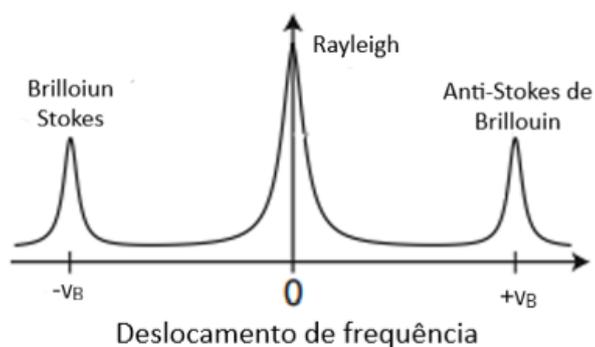
De toda esta sequência de acontecimentos irão surgir dois picos adicionais no espectro, denominados de picos de *Stokes* e *Anti-Stokes* de Brillouin [9]. Quando a difusão é do tipo inelástico, existe alteração de energia das partículas incidentes durante a interação, ou seja, o comprimento de onda irá alterar-se [13,42].



**Figura 2.6:** Diagrama de energia simplificado para os picos de *Stokes*, *Anti-Stokes* e *Rayleigh* (adaptado de [39]).

No que diz respeito às interações inelásticas, existem dois tipos importantes, Brillouin e Raman. O primeiro ocorre a partir da interação da luz com os fonões acústicos, resultando em *shifts* de frequência, i.e. deslocamentos de frequência dos picos de Brillouin, na ordem dos 0.1 a 100 GHz, que estão relacionados com propriedades viscoelásticas dos materiais [43,44]. Por outro lado, a difusão de Raman acontece a partir da interação da luz com os movimentos vibracionais ou rotacionais das moléculas, resultando em deslocamentos de frequências muito elevadas, normalmente maiores que 1THz. Utilizando este último podemos obter as propriedades químicas do material. De notar, que os picos de Raman se encontram para além dos picos de Brillouin.

Num caso ideal, iremos obter um espectro semelhante ao da Figura 2.7, com um pico central mais intenso, devido à difusão elástica, e dois picos igualmente espaçados e com aproximadamente a mesma intensidade, sem existência de ruído.



**Figura 2.7:** Exemplo de uma difusão de Brillouin para uma amostra biológica (adaptado de [13]).

Possuindo um deslocamento de frequência em relação ao pico elástico de:

$$\omega_{B=} = \pm V \cdot q \quad (2.5)$$

, onde  $V$  é a velocidade da onda acústica no material e  $q$  o momento trocado durante a difusão [45].  
O valor de  $q$  é dado por:

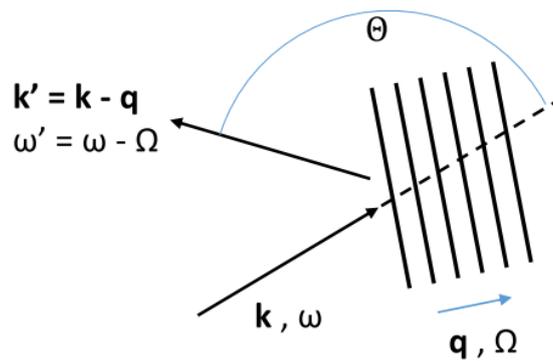
$$q = 2 \cdot n \cdot k_i \cdot \sin \frac{\theta}{2} \quad (2.6)$$

, sendo  $n$  o índice de refração do material,  $\theta$  o ângulo da difusão, e  $k$ , o vetor de onda da luz incidente.  
É ainda possível, definir matematicamente este valor pela equação:

$$k_i = \frac{2\pi}{\lambda_i} \quad (2.7)$$

, onde  $\lambda_i$  é o comprimento de onda da luz incidente.

Como podemos observar na Figura 2.8 a radiação recebida tem um vetor de onda  $k$  e frequência  $\omega$ . A onda gerada a partir das flutuações termodinâmicas, é mostrada pelas linhas paralelas e tem um vetor de onda  $q$  e uma frequência  $\Omega$ . A radiação recebida é dispersa pela onda e passa a ter um novo vetor de onda  $k'$  e uma nova frequência  $\omega'$  [46,47].



**Figura 2.8:** Exemplo de alteração do vetor de onda  $q$  [46].

Tal como é recorrente durante a BS teremos uma geometria em *backscattering*, ou seja, um  $\theta$  de  $180^\circ$ . As geometrias de *backscattering* são frequentemente usadas para evitar a ampliação dos espectros complexos, e permitem a utilização de uma elevada abertura numérica (NA) [48]. Para a utilização deste tipo de geometria deve-se ter sempre em atenção o facto do momento trocado ( $q$ ) ser dependente do

ângulo [9]. Desta forma, para a geometria em questão o momento irá perder a última parcela da multiplicação uma vez que o seno de 90° é 1.

Ao combinar o conjunto de equações estudadas até aqui, obtemos, a equação final que dará o deslocamento de frequência para os picos de Brillouin:

$$\omega_{B=} \pm \frac{4 \cdot \pi \cdot n}{\lambda_i} \cdot V \quad (2.8)$$

O módulo elástico longitudinal (M), uma das propriedades elásticas dos materiais pode ser obtida através deste deslocamento  $\omega_B$  [9]:

$$M = \rho \cdot V^2 = \frac{\rho}{n^2} \cdot \frac{\omega_B^2}{4 \cdot k_i^2} \quad (2.9)$$

Posteriormente, serão abordados outros conceitos relacionados com o módulo elástico longitudinal, que terão uma enorme importância para a presente dissertação.

O *setup* típico do sistema de BS é constituído por uma mesa ótica, um laser, um conjunto de componentes óticos (lentes e espelhos) que formam o caminho ótico até a amostra e um espectrómetro. Os parâmetros obtidos mais importantes são a frequência dos picos de Brillouin e o HWHM (Metade da Largura a Metade do Máximo), utilizando como modelo de ajuste o DHO (Oscilador Harmónico Amortecido). Mais à frente, todos estes conceitos e a forma como são obtidos e utilizados serão explicados com maior detalhe.

No que respeita ao laser, há um especial cuidado para o facto da largura espectral de emissão dever ser inferior à largura do pico de Brillouin para evitar o alargamento espectral dos mesmos e maximizar a difusão inelástica. O ruído provocado pelo laser e a estabilidade da sua frequência são fatores importantes para obter dados mais precisos [46,49]. É também importante referir que variações ínfimas de temperatura podem reduzir o grau de fiabilidade do laser. Para a generalidade dos biomateriais o laser costuma ter um comprimento de onda de 532 nm. O facto deste comprimento de onda ser relativamente pequeno permite atingir melhores resoluções espaciais.

As lentes têm a capacidade de transportar o feixe emitido pelo laser com a menor perda possível. As lentes em questão são convexas com o intuito de fazerem convergir todo o caminho ótico para um ponto focal. Toda a calibração e posicionamento das lentes é de enorme relevo pois, quanto maior a quantidade

de luz que chega ao ponto focal, maior o número de contagens que se irá obter, e por consequência melhores e mais rápidos os resultados serão obtidos.

Por fim, o espectrómetro é a peça central do sistema, tendo no interferómetro a quase totalidade do seu funcionamento. O espectrómetro possui dois *pinholes* sendo que um é referente à calibração, e outro que dá acesso direto ao interferómetro. Existem dois tipos de interferómetros mais utilizados, que serão abordados mais à frente.

## 2.3 Difusão em diferentes materiais e modelo viscoelástico

De seguida são apresentadas as diferentes formas de difusão da luz em diferentes materiais. A difusão da luz é o alicerce fundamental para a ocorrência da BS. Serão ainda apresentadas as equações para a formulação do modelo viscoelástico.

### 2.3.1 Difusão de Brillouin em materiais viscoelásticos

A viscoelasticidade é a propriedade dos materiais que exibem características elásticas e viscosas aquando da sua deformação. Essa dupla natureza pode ser descrita pela definição dos módulos elásticos como complexos e dependentes da frequência [7,9]. A análise do espectro de Brillouin pode fornecer, para uma densidade e índice de refração conhecidos, uma caracterização única das propriedades mecânicas do material, porque as propriedades das ondas sonoras (como a sua velocidade ou atenuação) exibem uma dependência intrínseca das propriedades viscoelásticas do material [13].

A equação geral que rege a propagação de ondas acústicas longitudinais num meio viscoelástico, o módulo longitudinal complexo,  $M^*$ , é dada por:

$$M^*(\omega) = M'(\omega) + iM''(\omega) \quad (2.10)$$

, onde  $M'$  é o *storage modulus*, e  $M''$  o *loss modulus*. O primeiro descreve a resposta elástica do material à deformação, e o segundo refere-se à dissipação de energia devido aos efeitos viscosos [7]. A parte real do módulo longitudinal,  $M'$ , fornece informação sobre as propriedades elásticas do material (posição do pico), enquanto a parte imaginária,  $iM''$ , está relacionada com a viscosidade longitudinal  $\eta$  do meio [13]. O módulo longitudinal complexo avaliado pela difusão de Brillouin mostra uma difusão em  $M'$  associada a um máximo de  $M''$  (Figura 2.9), nas frequências em que os fonões acústicos longitudinais estão acoplados com graus de liberdade internos, como por exemplo, moléculas [9].

Para flutuações de densidade que ocorrem a frequências inferiores à taxa de relaxamento estrutural, o valor de  $M'$  é inferior, porque as moléculas não respondem elasticamente, mas existe a possibilidade de se difundirem parcialmente sob compressão (regime viscoso). Em contrapartida, para as flutuações de densidade que ocorrem em frequências superiores à taxa de relaxamento, as moléculas não têm tempo para se difundirem e responderem elasticamente à perturbação, provocando um aumento do módulo elástico (regime elástico). Em materiais viscoelásticos, a análise dos espectros de Brillouin pode facilmente dar acesso a  $M^*$  à frequência única dos picos de Brillouin [9].

De acordo com este modelo, os picos de Brillouin podem ser reproduzidos por uma função DHO, a expressão teoricamente derivada da *lineshape* de Brillouin de materiais viscoelásticos transparentes adquiridos a um único  $q$  [44,50],

$$I(\omega) = \frac{I_0}{\pi} \cdot \frac{\Gamma_B \cdot \omega_B^2}{(\omega^2 - \omega_B^2)^2 + (\Gamma_B \cdot \omega)^2} \quad (2.11)$$

convolvida com a função instrumental. O deslocamento da frequência  $\omega_B$  e a largura do pico  $\Gamma_B$  derivadas da análise de ajuste dos picos de Brillouin proporcionam a obtenção do *storage modulus* ( $M'$ ) e do *loss modulus* ( $M''$ ) [9]:

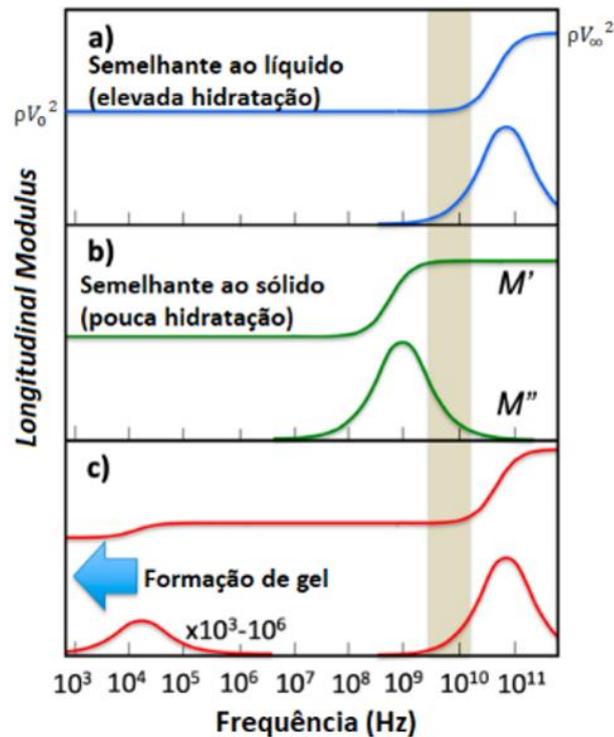
$$M'(\omega_B) = \frac{\rho}{q^2} \cdot \omega_B^2 \quad (2.12)$$

$$M''(\omega_B) = \frac{\rho}{q^2} \cdot \omega_B \cdot \Gamma_B \quad (2.13)$$

De notar que estas duas equações apenas são válidas para uma geometria de *backscattering* [38]. As medições da BS permitem descrever o módulo longitudinal complexo de um material para uma densidade ( $\rho$ ) conhecida [46]. O deslocamento da frequência de Brillouin  $\omega_B$  e a largura do pico  $\Gamma_B$  proporcionam a obtenção do *storage* e do *loss modulus* no pico de frequência  $\omega = \omega_B$ . Além disso, e igualmente importante,  $\omega_B$  e  $\Gamma_B$  não são parâmetros independentes, mas dependem do comprimento de onda do laser e da temperatura ambiente [7]. Em particular, ao realizar o ajuste do pico de Brillouin pela função DHO (equação 2.11), derivada da teoria hidrodinâmica de flutuações de densidade, obter-se-á o valor correto de  $\omega_B$  para estimar  $M'$ . Ter acesso a uma vasta gama de frequências é especialmente

útil em matéria biológica, onde há uma série de processos de relaxamento que podem afetar a dependência da frequência de  $M^*$  [9].

De seguida, serão apresentados os três casos que são tipicamente encontrados em experiências de difusão de Brillouin, que são relevantes para amostras biomédicas, sendo eles, o comportamento do tipo líquido, do tipo sólido, e gel. Na Figura 2.9 é apresentado um gráfico da dependência da frequência em relação ao módulo longitudinal para os três casos.



**Figura 2.9:** Curvas de difusão para amostras com diferentes taxas de relaxamento estrutural. A cinzento está a zona de difusão de Brillouin. O gráfico a) é uma amostra semelhante a um líquido, b) semelhante a um sólido e c) um gel (adaptado de [9,38]).

O primeiro caso representa uma amostra altamente hidratada, onde o relaxamento estrutural responsável pela transição do comportamento do tipo líquido para o tipo sólido, está localizada a frequências maiores do que a frequência do pico de Brillouin. Neste caso, o espectro de Brillouin irá conter apenas um pico estreito (com os componentes Stokes e Anti-Stokes), indicando que a amostra é homogênea à escala do comprimento de onda do fóton [38].

No limite de diluição o módulo longitudinal nas frequências de Brillouin é o de um simples líquido, com um *storage modulus* em condições de relaxamento ( $\omega\tau \ll 1$ ) de:

$$M_0' = \rho \cdot V_0^2 \quad (2.14)$$

onde,

$$V_0^2 = \frac{\omega_B}{q} \quad (2.15)$$

é a velocidade de som adiabática. O *loss modulus* é dado por:

$$M'' = \omega_B \cdot b \quad (2.16)$$

onde b descreve a viscosidade cinemática longitudinal com o valor de

$$b = \frac{\rho}{q^2} \cdot \Gamma_B \quad (2.17)$$

Enquanto o sistema está num estado líquido, o relaxamento estrutural responsável pelo aumento do módulo longitudinal até ao valor do tipo sólido de

$$M_\infty' = \rho V_\infty^2 \quad (2.18)$$

ocorre numa escala de tempo na ordem dos picossegundos, ou seja, a uma frequência muito superior à do pico de Brillouin, originando uma relação linear entre o *loss modulus* e a frequência. No caso de um polímero altamente diluído, a água pode ser considerada como tendo duas fases, “livre” (ou *bulk*) e “hidratada” (interagindo mais fortemente com as cadeias de polímeros). Neste estado, o aumento observado em  $\Gamma_B$  ou  $M''$  com o aumento da concentração do polímero pode ser atribuído ao aumento da viscosidade cinemática longitudinal devido à dupla contribuição para o processo de relaxamento [38].

Ao reduzir a hidratação, o relaxamento estrutural desloca-se para frequências mais baixas [9]. A Figura 2.9 b) representa esta condição, onde a zona de difusão de Brillouin está localizado a frequências mais elevadas do que o relaxamento estrutural. Neste caso, uma nova alteração do estado de relaxamento (por exemplo, uma redução do nível de hidratação) iria induzir um aumento em  $M'(\omega_B)$  correlacionado com uma diminuição de  $M''(\omega_B)$  ao contrário das amostras altamente hidratadas. Como deduzido a partir da equação 2.13, a condição de largura do pico máximo é alcançada quando o máximo de  $M''(\omega_B)$  corresponde à frequência do pico de Brillouin. Uma diminuição mais acentuada da hidratação

dá origem a uma redução da largura do pico e uma deslocação do pico de Brillouin para maiores frequências aproximando-se da condição do tipo-sólido (não relaxado) dada pela equação 2.18, e observável na Figura 2.9 b) [38].

A condição intermédia, quando a taxa de relaxamento é comparável com o deslocamento da frequência de Brillouin, possui um grande potencial. De facto, ao alterar um parâmetro de controlo, nomeadamente a temperatura, pode-se observar um máximo na largura do pico. Neste caso, a frequência de Brillouin possibilita a obtenção direta de um parâmetro muito importante da dinâmica molecular, i.e. o tempo de relaxamento ( $\tau$ ) [51]. Aqui entra o terceiro caso, apresentado na Figura 2.9 c), mais comuns na matéria biológica. Desta forma, refere-se à coexistência de regiões de ambos os casos anteriores (sólido e líquido) em contacto extremamente próximo umas com as outras dentro da amostra, i.e. numa transformação contínua sol-gel [52,53]. Os modelos mais simples para este estado da matéria são os hidrogéis, onde uma pequena fração de macromoléculas reticuladas possuem a capacidade de sustentar a fase líquida. A transição da fase líquida (baixo módulo elástico) para a fase sólida (elevado módulo elástico) é revelada pela difusão da frequência e está associada ao máximo da largura do pico de Brillouin [38]. As curvas apresentadas na figura em questão mostram o efeito da parte polimérica como a parte que possui uma baixa frequência de relaxamento, com um tempo de relaxamento divergente, que é responsável pela viscosidade estática divergente e pelo progresso da recuperação da tensão de cisalhamento. Em contrapartida, a fração líquida da amostra é responsável pelo relaxamento a alta frequência, perto do deslocamento de frequência de Brillouin [9].

Em amostras biológicas, as medições quasistáticas (quando o processo ocorre suficientemente devagar para que o sistema se mantenha em equilíbrio termodinâmico, mas não necessariamente químico) são mais sensíveis às propriedades reológicas do *scaffold* polimérico, enquanto a difusão de Brillouin é mais sensível à viscosidade local [54]. Através dos dados estudados no Capítulo 1.2 e apresentados na Figura 1.3, e do que foi estudado no presente capítulo podemos concluir que  $M$  é menos sensível do que  $G$  ou  $E$  a uma transição sol-gel [9].

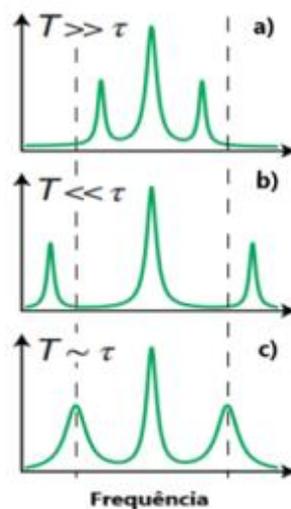
Tal como observado neste capítulo, o tempo de relaxamento ( $\tau$ ) das moléculas da amostra, em relação ao período das ondas acústicas, pode influenciar o espectro obtido, tanto em termos do deslocamento de frequência como em termos da largura do pico de Brillouin. A equação (2.19) permite obter a relação entre o tempo de relaxamento e o período da onda acústica:

$$\tau \cdot \omega_B = 1 \Leftrightarrow \tau = \frac{1}{\omega_B} \Leftrightarrow \tau = T \quad (2.19)$$

Note-se que foi utilizado o sinal igual, mas poderia ter sido utilizado o sinal maior ou menor. Na Figura 2.10 estão representados os espectros dos três casos anteriores, abordando a relação entre o tempo de relaxamento e o período da onda acústica. No primeiro espectro a), pode-se observar o espectro de uma amostra do tipo-líquido. O aumento da hidratação de uma amostra leva a que esta possua um tempo de relaxamento bastante inferior ao do período da onda acústica. Outra das características que se pode observar é o facto do espectro deste tipo de amostras possuir um menor deslocamento de frequências, mas em contrapartida, uma maior largura dos picos de Brillouin, relacionados respetivamente com os valores do *storage* e *loss modulus*.

Na Figura 2.10 b), referente a um espectro de uma amostra do tipo-sólido, pode-se verificar que o período será muito menor que o tempo de relaxamento. O espectro possui um maior deslocamento de frequência, referente ao valor de  $M'$ , e um menor valor da largura do pico, que por sua vez faz referência ao valor de  $M''$ , que tal como visto anteriormente está associado a uma diminuição da hidratação.

Por fim, a Figura 2.10 c) refere-se aos géis, que são uma mistura complexa dos dois exemplos anteriores, onde o tempo de relaxamento e o período possuem valores muito semelhantes. É neste caso que o espectro de uma amostra deste género atinge o máximo da largura do pico. Além disso, é possível reparar que os picos de Brillouin se encontram centrados com a linha a tracejado, isto porque, a amostra se encontra na designada condição intermédia.

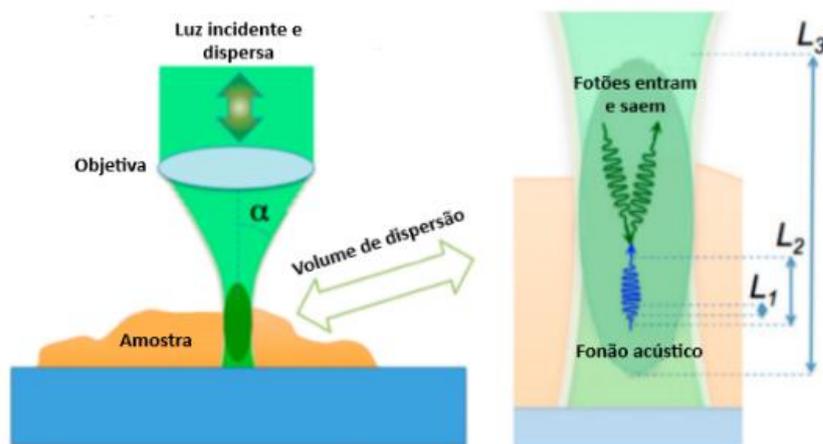


**Figura 2.10:** Forma como o tempo de relaxamento e período da onda acústica influenciam as características dos picos de Brillouin. O gráfico a) é uma amostra semelhante a um líquido, b) semelhante a um sólido e c) um gel (adaptado de [13]).

Note-se que durante toda a dissertação será realizada apenas o estudo da difusão de Brillouin em materiais viscoelásticos (géis de agar).

### 2.3.2 Difusão de Brillouin em materiais heterogéneos

A resolução espacial da difusão de luz de Brillouin é dominada pelo comprimento de onda e atenuação dos fonões acústicos. De facto, um fonão acústico fornece as propriedades viscoelásticas médias ao longo do seu percurso que é tipicamente da ordem de um micrómetro em matéria biológica. Para uma interpretação fiável dos resultados, a existência de diversas escalas de heterogeneidade da matéria biológica deve ser devidamente tida em conta, porque afeta profundamente tanto a luz como a propagação acústica na amostra, dando origem a características espectrais, tais como o aumento da largura dos picos, ou mesmo, efeitos adjacentes do fenómeno de *multiple-scattering* [9]. De um modo geral, deve-se também ter o cuidado redobrado de interpretar adequadamente os espectros de Brillouin a partir da matéria biológica heterogénea, considerando e utilizando tanto as escalas temporais como espaciais da difusão de Brillouin [13]. Portanto, existe a necessidade de consciencialização da presença de várias escalas espaciais, sendo que existem três que são mais relevantes, apresentadas na Figura 2.11 [55].



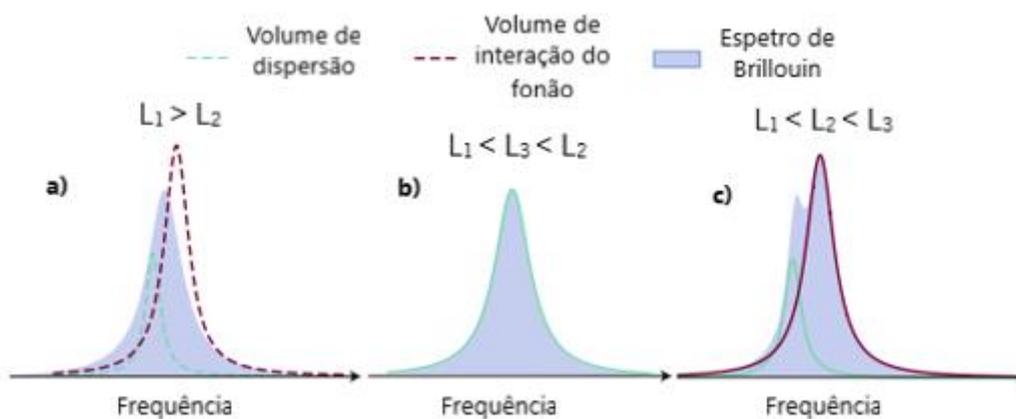
**Figura 2.11:** Esquemático da difusão de Brillouin em materiais heterogéneos (adaptado de [55]).

A escala espacial relevante mais pequena ( $L_1$ ) é do tamanho do comprimento de onda do fonão acústico, que se encontra no interior da amostra, e este valor é dado por [13]:

$$L_1 = \lambda/2n \quad (2.20)$$

, onde  $\lambda$  refere-se ao comprimento de onda da luz incidente, e  $n$  ao índice de refração da amostra. Normalmente este valor encontra-se na ordem dos 200 nm. A maior escala espacial  $L_3$ , é também conhecida como a escala de recolha de luz. Este valor é definido pela extensão espacial do foco ótico, determinando assim o volume de difusão. A escala possui o tamanho do volume que sofre a difusão e é dependente do *setup* ótico utilizado [9]. Na prática, esta escala é dependente da NA, da objetiva ou mesmo do diâmetro do *pinhole*. Esta escala espacial possui valores na ordem dos 1-5  $\mu\text{m}$ .

Finalmente, a escala  $L_2$  apresenta-se como a escala de componentes, e está relacionada com a atenuação dos fonões acústicos. Esta escala marca a dimensão típica de uma estrutura de propriedades mecânicas homogêneas, cuja escala de comprimento em relação a  $L_3$  e  $L_1$  é importante. Para amostras com estruturas menores que  $L_1$ , ou seja,  $L_1 \gg L_2$ , o campo acústico experimenta um meio homogêneo efetivo e a resposta dependerá, portanto, das propriedades elásticas médias dos constituintes dentro desta escala de comprimento, não podendo assim ser resolvida individualmente [13], como se pode observar na Figura 2.12 (a). Neste caso, o espectro de Brillouin surge como a média dos dois componentes, presentes na amostra.



**Figura 2.12:** Espectro de Brillouin dependendo das escalas espaciais. Podem ser: a) média; b) único; c) soma dos espectros obtidos (adaptado de [13]).

Inversamente, quando  $L_2 \gg L_1$  é possível ocorrer dois casos. Primeiramente, quando  $L_3 < L_2$ , está-se na presença da situação mais desejável, pois a resolução ótica é suficientemente elevada para que as propriedades mecânicas de um único componente possam ser observadas com elevada qualidade,

observando-se um espectro único de Brillouin (Figura 2.12 (b)). Por sua vez, quando  $L_3 > L_2$ , dá-se o caso da soma de diferentes espectros de Brillouin (Figura 2.12 (c)). Neste caso, vários componentes mecânicos ocupam o mesmo volume de difusão, e o espectro de Brillouin resultante é a soma dos picos individuais originados pelos diferentes componentes. Caso os deslocamentos de frequência dos componentes forem suficientemente distintos, podemos então esperar múltiplos picos de Brillouin [13].

## 2.4 Tipos de espectrômetros de Brillouin

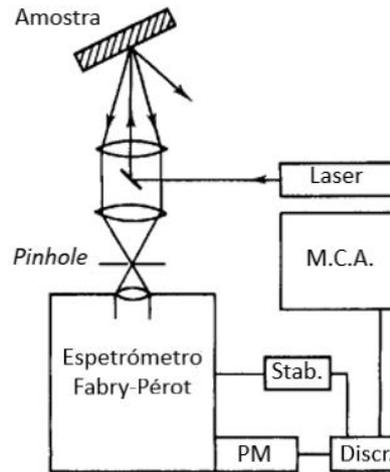
Na BS a amostra é iluminada por um feixe estreito proveniente de um laser e a luz dispersa é analisada espectralmente por um espectrômetro de alta resolução. O *shift* espectral da luz que sofreu a difusão fornece informações sobre a interação entre esta e os fonões acústicos na amostra [56].

Os dois objetivos mais importantes para os espectrômetros de Brillouin modernos são: oferecer resolução espectral na zona dos sub-GHz e alcançar uma elevada precisão, tanto no deslocamento como na largura dos picos Brillouin [49]. Para atingir uma boa precisão nas medições é necessário possuir dois componentes essenciais: uma fonte de luz monocromática e um espectrômetro dispersivo. Têm sido sugeridas as mais diferentes estratégias e projetos de espectrômetros para resolver este desafio, algumas das quais serão discutidas nos subcapítulos seguintes.

### 2.4.1 Espectroscopia de Brillouin usando interferômetros Fabry-Pérot

O interferômetro Fabry-Pérot foi desenvolvido pela primeira vez no final do século XIX numa colaboração entre os cientistas franceses Charles Fabry e Alfred Pérot. Desde então, tornou-se uma ferramenta importante numa variedade de campos, principalmente na física, engenharia e biologia.

Um dos primeiros esboços do interferômetro *Tandem Fabry-Pérot* (TFPI) para a BS foi realizado por J. R. Sandercock, utilizando uma geometria de *backscattering*. Como podemos observar na Figura 2.13, o feixe viaja por um caminho ótico até colidir com a amostra. Parte da luz que sofre difusão é direcionada para o espectrômetro, onde entra pelo *pinhole*. Após passar por uma série de componentes, chega ao MCA, onde serão analisadas as características da luz, e, conseqüentemente estudadas as propriedades da amostra.



**Figura 2.13:** Esboço inicial do *setup* experimental utilizando o TFPI para uma geometria *backscattering* (adaptado de [57]).

As medições espectroscópicas com resoluções na ordem dos MHz envolvem, normalmente, este género de interferómetros, além de envolverem uma configuração *multi-pass scanning* [58]. Avanços no conhecimento e estudo dos interferómetros *Tandem Fabry-Pérot* têm permitido a sua utilização em diversas aplicações, como por exemplo, quando uma forte componente da luz elástica é misturada com o sinal de Brillouin, ou quando é necessário realizar medições em diferentes FSR [9]. Para diferentes lasers e parâmetros de *scannings* sabe-se que a sensibilidade das medições é dependente da estabilidade do laser e da FSR [49], o que torna este processo extremamente preciso e minucioso. Em termos simples, o FSR refere-se ao espaçamento entre picos adjacentes num sistema ótico, i.e. a faixa de comprimentos de onda sobre a qual o dispositivo possui picos de transmissão distintos. Estes picos ocorrem devido à interferência construtiva das ondas de luz que percorrem múltiplas idas e voltas dentro do *etalon*. No TFPI a FSR é a diferença de comprimento de onda entre dois picos de transmissão consecutivos, e é dada matematicamente por:

$$FSR = c/2L \quad (2.21)$$

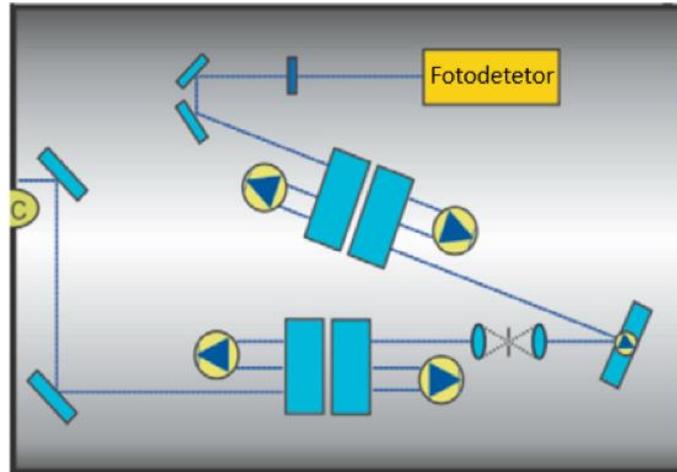
, onde  $c$  corresponde à velocidade da luz e  $L$  ao comprimento do *etalon* [59].

A resolução sub-GHz proporciona um elevado contraste espectral entre o sinal de Rayleigh, que possui difusão elástica, e o sinal de Brillouin com difusão inelástica. Por sua vez, a alta precisão das medições do deslocamento do pico de Brillouin e da sua largura proporcionam medições precisas do módulo elástico e das propriedades viscoelásticas do material [49].

O principal elemento do TFPI é um par de dois espelhos paralelos separados por um espaço livre. Esse espaço tem um comprimento específico, e é denominado por *etalon* de Fabry-Pérot. Consoante a distância entre os espelhos, a luz atravessa ou é refletida pelo instrumento [7]. O TFPI é extremamente versátil pois possui uma variedade de parâmetros ajustáveis, o que possibilita melhorar e afinar a resolução do instrumento. Portanto, o mesmo instrumento pode ser utilizado para efetuar medições das mais diversas amostras como sólidos, géis e líquidos. A existência de transdutores piezoelétricos permite a realização do *scan* dos espelhos. Estes servem para estabilizar de forma dinâmica os espelhos, realinhando continuamente os mesmos, de forma a mantê-los paralelos e igualmente espaçados. O paralelismo dos espelhos é mantido ao fazer pequenas correções do alinhamento para que as características espectrais dominantes possuam uma máxima amplitude ou *linewidth* mínima [57]. Ao realizar o *scan* da distância entre os espelhos, a seletividade espectral é alcançada dentro da FSR do instrumento que é dada pela distância espectral entre os máximos vizinhos no espectro de transmissão, tal como visto anteriormente [7].

O feixe de luz, que entra pelo *pinhole*, irá encontrar o primeiro espelho Fabry-Pérot, no qual passará três vezes, como podemos observar na Figura 2.14, e fará o mesmo no segundo par de espelhos, permitindo obter um alto contraste. O facto do feixe de luz passar um maior número de vezes pelos espelhos leva à obtenção de um contraste superior e evita a sobreposição do feixe [46]. Em contrapartida, a desvantagem de um maior número de passagens pelo espelho seria a redução do diâmetro do feixe de luz o que levaria à conseqüente diminuição do rendimento, ou seja, um menor número de contagens obtidas [57]. Assim, conclui-se que o número ideal de passagens por cada par de espelhos seria de 3, o que permite que ambas as condições se encontrem o mais perto possível do valor ideal. O contraste do instrumento é limitado apenas pela *dark current* do fotodetector.

O instrumento é estabilizado eletronicamente para que o espelho permaneça totalmente paralelo independentemente de possíveis flutuações de temperatura [60]. Também o facto dos dois pares de espelhos partilharem o mesmo ambiente, torna o sistema *Tandem* muito menos sensível a variações de temperatura, do que se fosse construído com dois interferómetros separados. O caminho ótico parte do laser, passando por uma série de componentes óticos até chegar finalmente ao fotodetector.



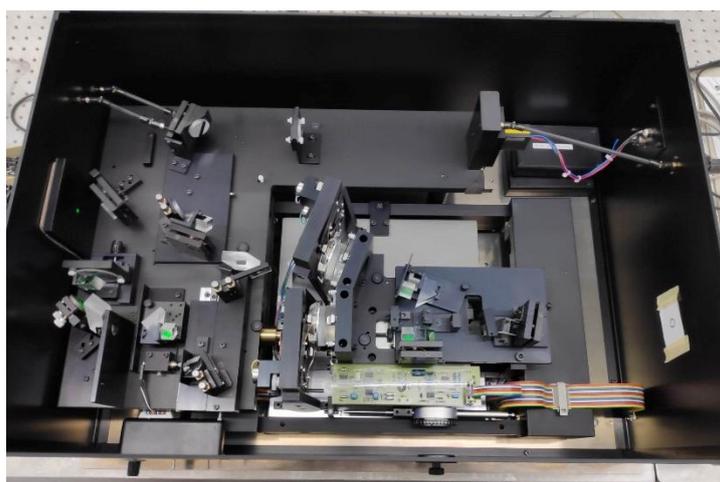
**Figura 2.14:** Esquemático de um Interferómetro *Tandem* Fabry-Pérot de três passagens (adaptado de [43]).

O *design* do TFPI possibilita o alargamento da FSR, ou seja, uma maior resolução espectral do instrumento e um elevado contraste [61]. Em contrapartida, o seu baixo rendimento (elevada perda de sinal) e os longos tempos de varrimento espectral tornam desfavorável a utilização destes espectrómetros em sistemas vivos devido ao movimento destes, ou seja, de exigirem elevadas taxas de aquisição [9,13]. Vale a pena referir que, muitas vezes, uma medição rápida realizada à custa de uma elevada intensidade da radiação do laser, ou seja, uma alta densidade de luz a incidir na amostra, pode ser prejudicial para as células vivas, tecidos e organismos. Consequentemente, deve-se trabalhar com uma menor potência do laser e estender o tempo de aquisição ou usar uma menor NA [9]. É importante também referir que o tempo mínimo de aquisição está limitado pela velocidade de *scanning* dos espelhos, e não é possível ser significativamente melhorada. Uma das últimas adições nesta tecnologia foi a adição de isoladores óticos, que permitem a obtenção de um melhor contraste [43]. As vantagens e desvantagens de utilizar este interferómetro são apresentadas na Figura 2.15.



**Figura 2.15:** Esquema simples, vantagens e desvantagens de um *Tandem* Fabry-Pérot (adaptado de [13]).

Em suma, o TFPI consiste num conjunto de dois espelhos planos semitransparentes e paralelos que, de acordo com o seu espaçamento relativo, apenas transmitem uma determinada frequência da luz. A realização do *scan* do espaçamento entre os espelhos permite a obtenção de todo o espectro contendo no centro o pico de Rayleigh com uma maior amplitude, e igualmente espaçados deste, os picos de *Stokes* e *Anti-Stokes*. Este será o tipo de espectrómetro utilizado durante a dissertação, presente no laboratório do CMEMS-UMinho (Figura 2.16).



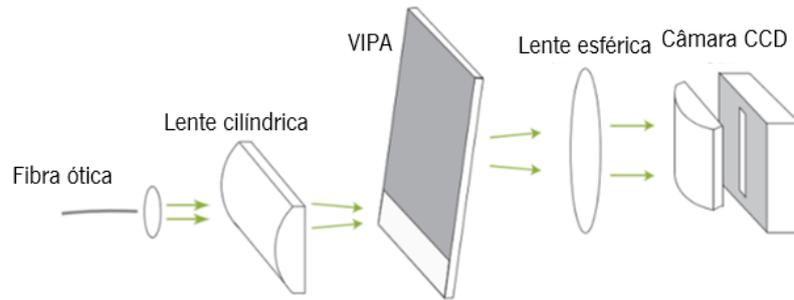
**Figura 2.16:** Interferómetro *Tandem* Fabry-Pérot utilizando no laboratório do CMEMS-UMinho.

## 2.4.2 Espectroscopia de Brillouin usando *Virtually Imaged Phased Array*

O *Virtually Imaged Phased Array* (VIPA), inicialmente introduzido na área das telecomunicações [7], é usado para espalhar no espaço as frequências do feixe que sofre a difusão. O VIPA é um espectrómetro de alta resolução, que na sua essência é uma versão modificada de um Fabry-Pérot capaz de dispersar espacialmente o espectro sem necessidade de realizar o *scan* da cavidade ótica do interferômetro, permitindo a aquisição eficiente deste de uma só vez [13]. Estes podem ser *single-stage* ou *multi-stage*, ou seja, diferem no número de *etalons* que o instrumento possui.

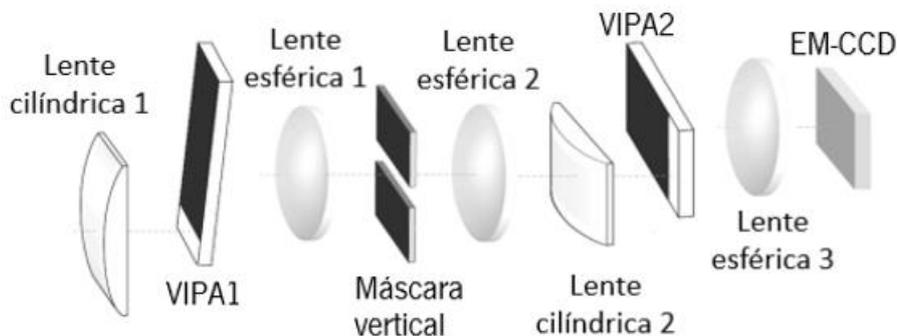
Como visto anteriormente, uma das desvantagens da *grating diffraction* é possuir uma pequena difusão angular. Uma alternativa para esse problema seria usar um dispositivo que realizasse uma *waveguide grating*, sendo capaz de fornecer maiores dispersões angulares, dependentes da frequência [62]. O VIPA segue esta linha de raciocínio, ao contrário do TFPI que utiliza a primeira. Desta forma, possui uma maior difusão angular. Além disso, possui uma baixa dependência do estado de polarização do feixe de luz, uma estrutura simples, é compacto e a magnitude do campo das imagens virtuais decaem exponencialmente com o aumento do número de reflexões [40,63]. Por não possuir estruturas móveis nem necessidade de sincronização, torna-se muito mais barato e significativamente mais fácil de instalar e operar [7]. O facto de ter um baixo custo permite a utilização em diagnósticos locais e monitorização de rotina. Até hoje, apenas são utilizados em diagnósticos de saúde ocular.

O sistema possui uma fonte de luz, que vai incidir numa lente semicilíndrica focando a luz na placa de vidro (*etalon*), com diferentes revestimentos refletivos, através de uma janela de entrada transparente. Após múltiplas reflexões na placa de vidro de espessura  $t$ , a luz colimada emerge do outro lado da placa, onde se propaga num ângulo que varia com a mudança do comprimento de onda da luz [40,63], oferecendo uma difusão angular suficientemente grande para separar os picos de *Stokes* e *Anti-Stokes* do pico de Rayleigh. Após passar por uma lente esférica, a luz incide na câmara CCD (*charge-coupled device*), obtendo-se assim os dados desejados. O *single-stage* VIPA possui um menor contraste, o que o torna inadequado para medições de amostras túrbidas. Na Figura 2.17 é apresentado um esquemático de um espectrómetro *single-stage* VIPA.



**Figura 2.17:** Esquemático de um espectrômetro *single-stage* VIPA (adaptado de [64]).

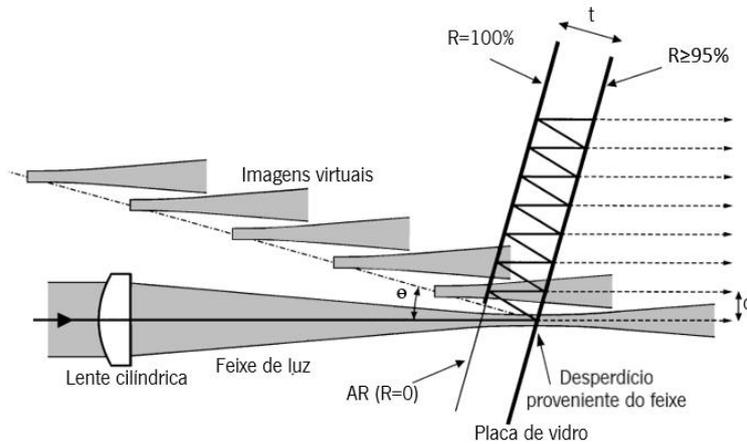
Além do esquema *single-stage*, o *multi-stage* com duas placas VIPA é também utilizado em grande escala. Alinham-se dois VIPAs sequencialmente quando se pretende estudar a difusão espectral em direções ortogonais. Este género de difusão separa espacialmente os picos de Brillouin do “ruído” indesejado, tornando possível captar apenas o sinal de Brillouin [56]. O facto de serem utilizados dois *etalons* aumenta o contraste do espectrômetro. São também utilizadas máscaras de difração, quer na vertical quer na horizontal, que têm como função aumentar o contraste espectral intrínseco do instrumento sem comprometer a sua eficiência [13]. A Figura 2.18 retrata o caso do espectrômetro *multi-stage* VIPA.



**Figura 2.18:** Esquemático de um espectrômetro *multi-stage* VIPA (adaptado de [9]).

Como pode ser observado na Figura 2.19 o *etalon* possui três áreas com diferentes revestimentos. Na superfície frontal, uma janela estreita com um revestimento anti-reflexo que permite a passagem da luz para o *etalon*; enquanto o resto dessa superfície possui um revestimento altamente refletor (100%). Na superfície posterior, um revestimento parcialmente refletor permite que apenas uma pequena porção da luz (5%) seja transmitida [56,62]. Para que este processo ocorra a placa de vidro deve-se encontrar ligeiramente inclinada. À medida que vai ocorrendo um número elevado de reflexões da luz entre as superfícies da placa vai existindo uma perda da potência através da superfície parcialmente transmissível

no lado da saída. Assim, se a transmissividade na superfície for uniforme, o VIPA é caracterizado pela interferência de muitos feixes de luz divergentes com a mesma forma separados por um comprimento  $d$  [63]. Estes feixes interferem uns com os outros para formar feixes de propagação colimados com ângulos de saída diferentes, dependentes do comprimento de onda [62].

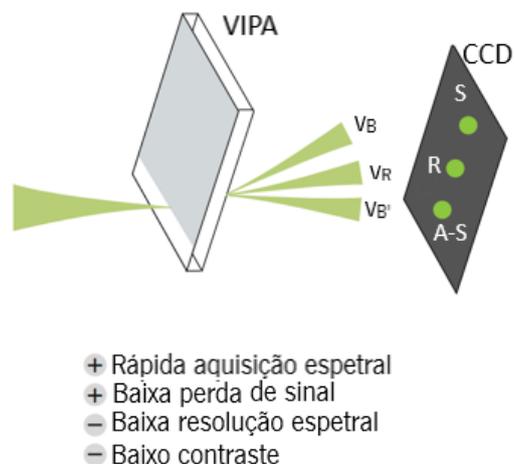


**Figura 2.19:** Geometria do *etalon* do VIPA com respectivas distâncias transversais e longitudinais (adaptado de [40]).

O feixe de luz é refletido em subcomponentes com diferença de fase fixa. A interferência entre os subcomponentes permite atingir a elevada difusão espectral aspirada. Caso o *etalon* esteja preenchido com ar chama-se *air-spaced* VIPA, caso contrário, se estiver preenchido com vidro com um índice de refração definido chama-se VIPA sólido.

Os espectrómetros VIPA são a opção mais viável para medições de Brillouin que exigem velocidades de aquisição mais rápidas, e.g. sistemas vivos. Dado que os sistemas vivos se movem e reagem a estímulos são necessários tempos de aquisição mais curtos, refletindo-se num menor contraste da imagem. Normalmente existe um *trade-off* entre a taxa de aquisição e a potência do laser, que nas aplicações biomédicas necessita de ser cuidadosamente adaptada para que sejam reduzidos quaisquer efeitos prejudiciais à amostra [9]. É de referir que o tempo de aquisição é também dependente da transparência da amostra e da potência a que o laser está a ser utilizado [7].

A redução da NA pode ser utilizada para reduzir a densidade de potência da luz laser recebida. Embora reduza a resolução espacial, reduz também o alargamento espectral. Desta forma, se a intenção for melhorar a resolução, o aumento da NA é uma solução. No entanto, uma NA elevada envolverá um alargamento perceptível da linha de Brillouin como resultado da dependência da mudança de frequência do ângulo de difusão [64]. As vantagens e desvantagens de utilizar este interferómetro são apresentadas na Figura 2.20.



**Figura 2.20:** Esquema simplificado, vantagens e desvantagens de VIPA (adaptado de [13]).

O maior foco estará agora na melhoria do contraste destes espectrómetros, tendo sido recentemente incluído um filtro de limpeza sintonizável do laser, que permite o aumento significativo do contraste.

Em suma, concluiu-se que o TFPI possui uma maior resolução espectral e contraste. Em contrapartida possui uma aquisição espectral lenta e um baixo rendimento (elevada perda de sinal). As características do VIPA são as inversas do TFPI [65]. Para a presente dissertação o TFPI será aquele que possui as características mais indicadas, por se pretender a obtenção dos resultados com a maior resolução espectral possível.

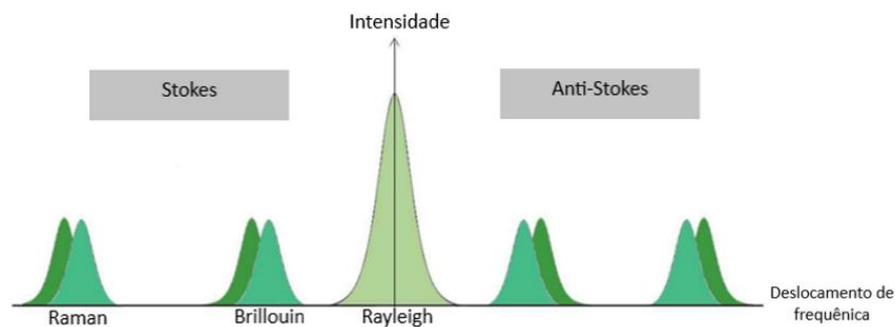
## 2.5 Evolução da espectroscopia: sistema multimodal Brillouin-Raman

Apesar da presente dissertação se focar na BS, o estudo do estado da arte engloba a aprendizagem das mais diferentes técnicas, dos mais recentes modelos e futuras melhorias dos equipamentos. Desta forma, um dos tópicos a abordar é o equipamento multimodal Brillouin-Raman. Dado que já foram abordados alguns conhecimentos sobre a espectroscopia Raman, será feito apenas um breve resumo da mesma, para que este conceito seja melhor compreendido.

Tanto a difusão de Raman como Brillouin baseiam-se no princípio da difusão inelástica da luz, sendo que o Brillouin ocorre por via de fonões acústicos e o Raman por fotões óticos. Quando a luz atinge a amostra os fotões dispersos alteram o seu comprimento de onda [66], ocorrendo sucessivamente um deslocamento da frequência dos picos que fornecem informações sobre a estrutura, simetria, ambiente eletrónico e ligações das moléculas, permitindo conhecer as propriedades químicas e as quantidades que cada substância possui numa dada amostra [67,68]. Desta forma, fornece uma “impressão digital”

que pode ser utilizada para identificação química, visto que cada molécula possui níveis de vibrações únicos [43].

Tal como a BS, a espectroscopia Raman é uma técnica não destrutiva, não invasiva e *label-free*, amplamente usada na área da química analítica e física, passando pela biofotónica até à biomédica. Além disso, os deslocamentos de frequência dos picos deste tipo de espectroscopia encontram-se numa gama bem mais alta do que a Brillouin, tipicamente superiores a 1 THz. Na Figura 2.21 pode ser observada a diferença nos deslocamentos dos picos de Brillouin e de Raman.

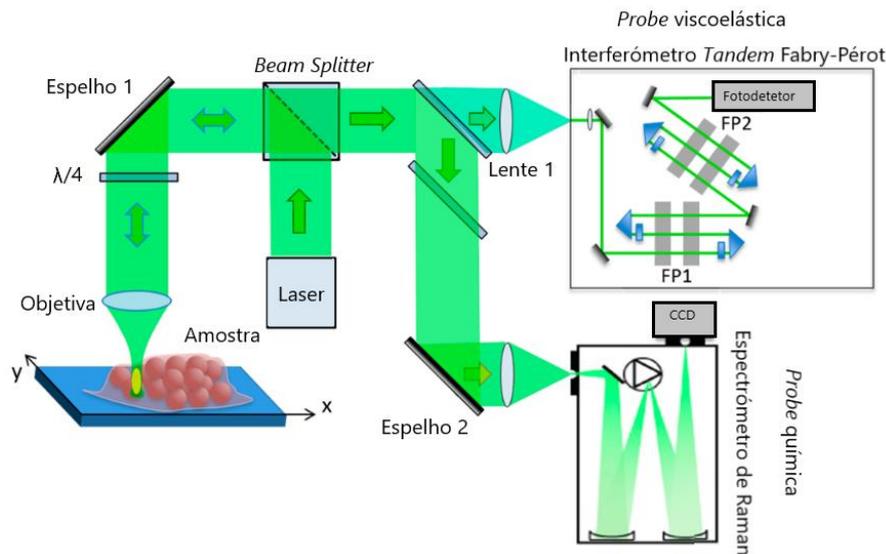


**Figura 2.21:** Comparação entre os deslocamentos de frequência dos picos da espectroscopia Brillouin e Raman (adaptado de [47]).

Os recentes avanços permitiram aliar o conhecimento das propriedades viscoelásticas com as propriedades químicas o que se tornou um grande avanço para a comunidade científica. Portanto, a criação de um novo aparelho que fornece medições simultâneas de ambos os espectros a partir de uma só aquisição torna-se extremamente útil para a caracterização e análise de amostras [69]. Depois de compreender o potencial da combinação de ambas as espectroscopias, o passo seguinte passa pela realização de um sistema único que combinasse o estudo dos dois sinais em simultâneo. O facto das duas espectroscopias se basearem na difusão inelástica, e apenas diferirem na gama dos deslocamento de frequência, facilitou a construção do sistema [9].

A disposição experimental para a combinação das espectroscopias está demonstrada na Figura 2.22. A fonte de laser é partilhada, o que facilita toda a preparação experimental e possibilita a maior precisão dos valores da intensidade do laser sobre a amostra e recolha de dados do mesmo ponto. Uma nota importante é que para além do esquema apresentado, no que toca à BS nesta disposição multimodal, pode também ser utilizado o VIPA, caso se pretenda medições mais rápidas [9,69]. No exemplo fornecido, uma micro-espectroscopia, a luz visível proveniente do laser, após seguir um caminho ótico, é focada na amostra e passa por uma objetiva duas vezes, a primeira quando atinge a amostra e a

segundo quando sofre *backscattering*. Uma placa de onda retardadora de  $\lambda/4$  pode ser inserida a montante da objetiva para alterar a configuração da difusão [43]. Um *beam splitter* polarizado transmite a luz despolarizada, proveniente do *backscattering* para os espectrómetros, após passagem por um filtro de borda sintonizável de passagem curta (*edge filter*), transmitindo a luz quer para o espectrómetro de Brillouin quer para o de Raman [9]. A partir daqui os dados recebidos serão analisados, e obter-se-ão os resultados sobre as propriedades desejadas.



**Figura 2.22:** Exemplo de micro-espectroscopia multimodal Brillouin-Raman (adaptado de [9]).

Em suma, através desta montagem é possível analisar simultaneamente e com bastante precisão as propriedades viscoelásticas e composição química de uma amostra. Este sistema possui um potencial significativo para o estudo de processos biológicos como a microbiologia, reabilitação e caracterização de tecidos, progressão de doenças ou na análise das reações celulares a mudanças físico-químicas [7,41]. Esta técnica apesar de se encontrar numa fase pós-embrionária tem uma elevada potencialidade.

# Capítulo 3

---

## 3. Materiais e Métodos

---

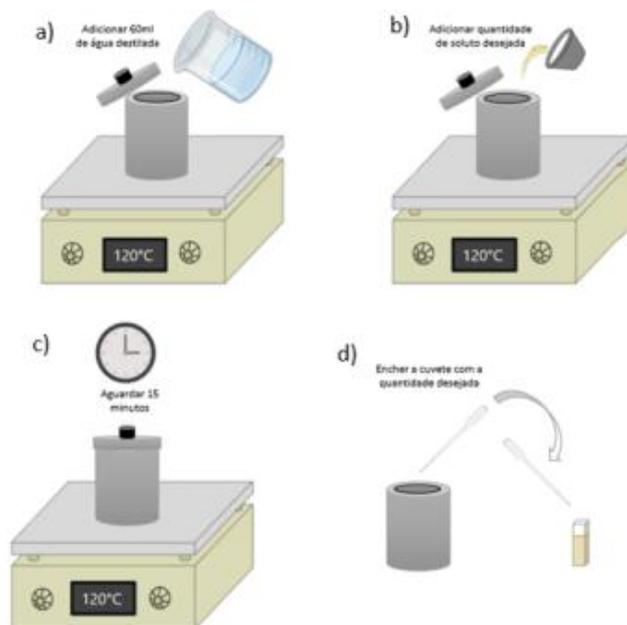
A metodologia refere-se aos passos necessários que promovem uma organização coerente do desenvolvimento do projeto, de forma a garantir rigor científico e a sua eficiência logística. Neste capítulo será demonstrado o processo da preparação das amostras e apresentado o *setup* experimental utilizado.

### 3.1 Preparação das amostras

As culturas de agar, normalmente realizadas em placas de Petri preenchidas com um meio de crescimento que foi solidificado com agar, são amplamente utilizadas como um dos principais meios de cultura e estudo celular [70]. O agar pertence a uma família de polissacarídeos complexos encontrados nas paredes celulares de algumas algas vermelhas e é amplamente utilizado como agente gelificante, de espessamento e estabilizador [71,72]. As culturas de agar são baratas e rápidas de preparar, sendo também quimicamente e fisicamente estáveis, além de fornecerem um suporte nutritivo para o crescimento celular [73,74].

No presente estudo foram preparados quatro tipos diferentes de amostras de agar: apenas agar e combinação de agar com triptona, extrato de levedura e extrato de malte.

Primeiramente, será demonstrado o processo da preparação das amostras e de seguida serão apresentadas as características do estudo em si, i.e. as concentrações utilizadas para cada conjunto de solutos. Numa placa de aquecimento a 120°C foram aquecidos 60 ml de água destilada (tendo em conta que aproximadamente 10 ml de água evaporava durante o processo) até atingir uma temperatura entre os 95°C e os 99°C. Durante este processo, o recipiente onde a água foi aquecida esteve sempre tapado, sendo aberto apenas para verificar a temperatura da água. Após atingir a temperatura desejada, foi adicionada à água a quantidade de agar previamente pesada e misturada com uma espátula até à completa dissolução. Após este passo, aqueceu-se a solução na mesma placa de aquecimento, sem variação de temperatura, durante 15 minutos. Por fim, a solução foi cuidadosamente transferida, com uma pipeta de Pasteur, para uma cuvette de vidro previamente aquecida e pesada, e o remanescente da solução foi transferido para uma placa de Petri também previamente pesada. A Figura 3.1 representa o processo relatado anteriormente.



**Figura 3.1:** Procedimento realizado para a obtenção das amostras de agar: a) adição de 60 ml de água destilada; b) adição de soluto; c) aguardar 15 minutos; d) encher a cubete com a quantidade desejada.

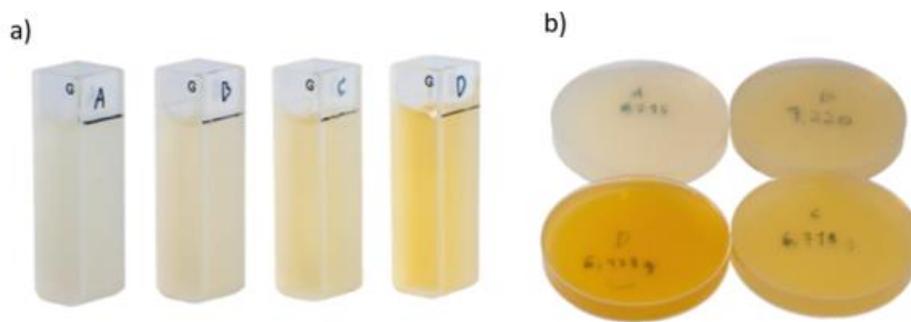
A solução foi deixada a repousar durante 15 minutos à temperatura ambiente de 22°C, isto porque se verificou que ao longo do tempo a massa do conjunto solução-cubete, e solução-placa de Petri ia flutuando em valores que alterariam significativamente a análise dos dados. Posteriormente, foram pesadas, e foi possível calcular a massa final da amostra, ao subtrair esta pela massa quer da cubete, quer da placa de Petri vazias. O mesmo procedimento foi utilizado para as amostras que combinavam o agar com a triptona, extrato de levedura, e extrato de malte, e ambas foram pesados com uma balança de precisão para atingir as concentrações pretendidas.

As amostras de agar foram preparadas usando sete diferentes concentrações: 0.5 %, 1 %, 1.5 %, 2 %, 2.5 %, 3 % e 3.5 %. No que diz respeito às concentrações dos três restantes conjuntos de amostras foram utilizadas concentrações de 0.25 %, 0.5 %, 1 %, 2 % e 4 %. A quantidade de agar utilizado para estas amostras foi sempre de 2 %, tendo sido utilizados 60 ml de água destilada para cada amostra, contabilizando com os aproximadamente 10 ml evaporados.

De forma a minimizar os efeitos da evaporação da água e de outras variações na exatidão dos valores da concentração de cada componente, o processo descrito foi otimizado, aumentando a fiabilidade dos resultados. Para cada uma das amostras, a quantidade do soluto foi calculada considerando aproximadamente os 50 ml de água, após evaporação. Terminado o processo de preparação das

amostras, a concentração real de cada componente foi recalculada considerando a massa final de gel obtido.

A temperatura de aquecimento da água foi escolhida para evitar a ebulição, que acelera a evaporação e solidificação prematura do gel nas paredes do recipiente de aquecimento. As cuvetes (Figura 3.2 a) proporcionam um recipiente transparente e maioritariamente coberto (diminuindo a evaporação) com um comprimento de percurso ótico conhecido (10 mm), ideal para as técnicas de medição óticas utilizadas. As placas de Petri (Figura 3.2 b) foram utilizadas apenas como recipiente para conter o gel restante de cada lote durante o arrefecimento.



**Figura 3.2:** Amostras de agar com extrato de levedura a diferentes concentrações: a) cuvetes transparentes; b) placa de Petri.

Todas as percentagens de soluto utilizadas foram baseadas em valores habitualmente usados na literatura. Foi utilizada uma base de dados de meios de cultura, MediaDive, que permite pesquisar meios de crescimento por componentes e concentrações máximas e mínimas para determinar os valores adequados [75].

### 3.2 *Setup experimental*

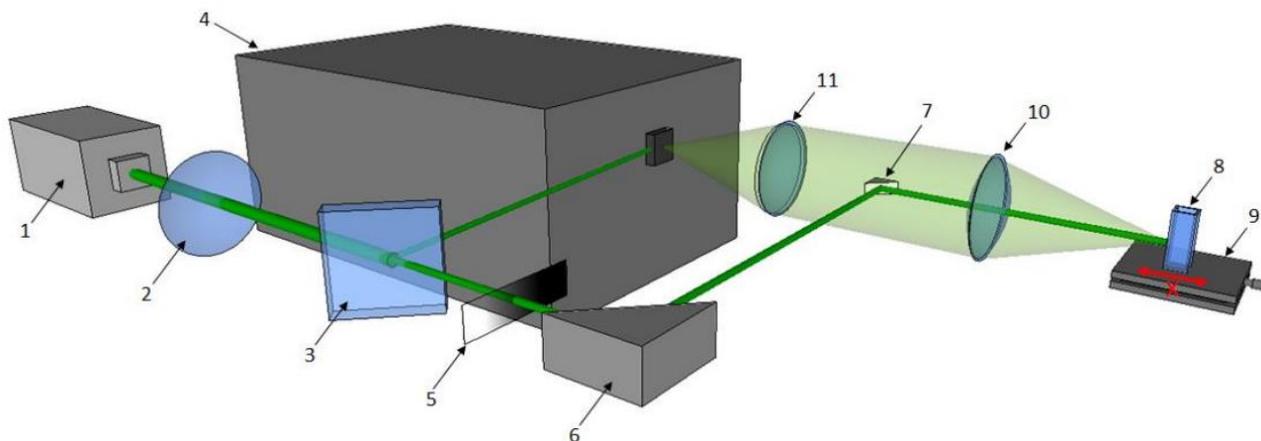
Nesta subsecção serão abordadas os diferentes *setups* experimentais utilizados: espectrómetro de Brillouin, refratómetro e *setup* para determinação da densidade das amostras. A obtenção dos valores do *storage modulus* e do *loss modulus* estão dependentes dos dados adquiridos destas ferramentas e técnicas.

### 3.2.1 Espectrómetro de Brillouin

A análise das propriedades mecânicas do meio de cultura celular pode também ter um impacto direto na forma como as células se comportam e se envolvem com esse meio. Quanto maior for a rigidez, mais difícil será a migração celular, afetando o seu crescimento e funcionamento. Por outro lado, se o meio de cultura celular for mais suave, não fornecerá suporte suficiente para o crescimento celular [76]. Sendo uma técnica de medição sem contato, a BS pode proporcionar uma forma única de determinar as propriedades viscoelásticas do agar em qualquer altura, sem perturbar o crescimento celular, não só na superfície, mas também abaixo da camada superficial, dependendo do meio de crescimento utilizado, uma vez que o gel de agar é maioritariamente transparente [77,78].

Tendo já sido realizada uma análise aprofundada de tudo o que diz respeito à teoria da BS, será realizada agora uma análise focada no espectrómetro de Brillouin em si e dos seus componentes. Como referido anteriormente, a geometria de *backscattering*, utilizada ao longo da dissertação, possui diversas vantagens, o que torna o espectrómetro ideal para a aquisição dos dados. Por sua vez, a aquisição, armazenamento e processamento dos dados obtidos pela BS são normalmente efetuados por *software* personalizado [79]. Este processo é extremamente sensível e meticuloso e será explicado de seguida de forma clara e concisa.

O *setup* experimental, ou seja, a configuração ótica utilizada para a aquisição dos espectros de Brillouin é constituída por um laser de onda contínua de 532 nm (Oxxius L1C-532S), um interferómetro Fabry-Pérot de elevado contraste numa configuração *Tandem*, e uma montagem ótica personalizada para enviar luz para a amostra e recolher o sinal de *backscattering*, tudo suportado numa mesa ótica ThorLabs' Nexus [7]. A configuração completa está representada na Figura 3.3.



**Figura 3.3:** Representação do *setup* óptico usado na aquisição de um espectro de Brillouin. Os componentes usados foram os seguintes: 1) fonte de luz laser a 532 nm; 2) lente convexa; 3) *beam splitter*; 4) fotodetector; 5) filtro retangular de densidade óptica variável; 6) espelho; 7) prisma espelhado; 8) amostra; 9) plataforma móvel; 10) lente de colimação de curta distância focal; 11) lente coletora convexa.

A gama espectral da difusão da luz de Brillouin (com *linewidth* tipicamente na ordem dos sub-GHz) determinam a escolha do laser adequado para as experiências pretendidas. A largura espectral do laser deve ser muito inferior à largura do pico de Brillouin (aproximadamente 1MHz ou menos) para evitar o alargamento espectral dos picos de Brillouin e maximizar a difusão inelástica [63,80].

A fonte de luz laser de 532 nm (1) gera um feixe estreito e colimado que passa por uma lente convexa (2), para evitar a difusão do feixe, e atinge um *beam splitter* (3) que envia uma pequena porção do feixe pela entrada de referência do *Tandem Fabry-Pérot* até ao fotodetector (4). O feixe de luz laser, de seguida, atravessa um filtro retangular de densidade óptica variável (5), atinge o espelho (6) que o direciona para o prisma espelhado (7) e deste para a amostra (8). O espelho (7) possui pequenas dimensões e é extremamente importante na qualidade e quantidade dos dados obtidos, i.e. da intensidade do feixe que chega até ao espectrómetro. Qualquer variação de temperatura ou humidade altera a disposição do mesmo, pelo que a sua calibração deve ser sempre feita antes de se iniciar uma aquisição espectral. O ponto focal na amostra pode ser ajustado numa plataforma móvel no eixo x (9). A amostra deve ser colocada numa posição inclinada com a parte transparente da cuvete virada para cima, para que o laser consiga atingir a amostra com a menor quantidade de ruído possível.

A luz retro-espelhada pela amostra é então recolhida pela lente de colimação de curta distância focal (10) e é focada no *pinhole* de entrada do *Tandem Fabry-Pérot* por uma lente coletora convexa (11). Estas lentes devem ser coaxiais e possuírem o mesmo diâmetro. A lente (11) tem como características

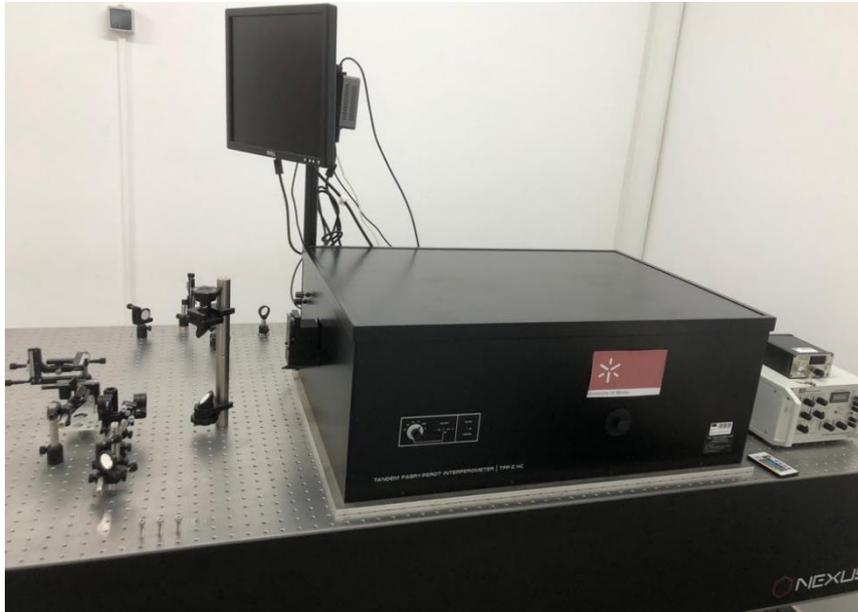
específicas um diâmetro entre os 20 e os 30 mm, e uma distância focal entre os 360 e os 400 mm, e deve ser escolhida de forma que o feixe de luz preencha apenas  $f/18$  da abertura de entrada do *Tandem Fabry-Pérot*. Este *pinhole* deve estar aberto a 300, e o *pinhole* que diz respeito à referência a 450. Como já foi referido no capítulo anterior, dentro do espectrómetro o feixe de luz irá passar 3 vezes por cada *etalon*, chegando por fim ao fotodetector.

O espectrómetro está conectado a um computador e ecrã que permitem a análise e a visualização dos dados. Além de uma calibração física, é também necessário realizar uma calibração do *software Ghost* (específico do espectrómetro). Para realizar a calibração deve-se ter especial atenção à abertura e fecho dos *shutters* para que não se danifique nenhum componente do espectrómetro. Inicialmente, com o *shutter* da frente fechado, no *software Ghost* seleciona-se a ferramenta, *Observe*, e de seguida abre-se o *shutter* que diz respeito à referência. Para se realizar uma calibração com qualidade, primeiramente deve-se calibrar os picos do primeiro Fabry-Pérot e consequentemente descalibrar os do segundo. De forma que o eixo x, eixo da frequência, seja o mais preciso possível, utiliza-se a ferramenta *Calibrate* do *Ghost*, colocando os marcadores nos picos do primeiro par de espelhos com o pico descalibrado do segundo par centrado no meio destes. Desta forma, o eixo do x irá auto regular-se para os valores referentes ao espectro da amostra a estudar. Sucessivamente, após esta calibração deve-se maximizar o número de contagens em cada *etalon* e juntar os picos fornecidos por cada um. O passo seguinte é ativar o modo *Tandem* e otimizar o sinal para as 1000 contagens, e, de seguida, ativar o *shutter* e o *stabiliser*. Finalmente, abrir o *shutter* por onde entra o feixe de luz disperso pela amostra.

Para cada amostra foram realizadas três medições com o feixe de luz laser a ser focado em três pontos distintos, de forma que os resultados sejam o mais precisos possível, tentando evitar erros como bolhas de ar ou problemas na face da cuvete. A análise dos espectros Brillouin obtidos passa pela obtenção das três características principais: o deslocamento de frequência dos picos Brillouin, a HWHM e o *reduced chi-squared*. O primeiro indica a distância a que o pico Brillouin se encontra do pico de Rayleigh, o segundo indica a metade da largura do pico Brillouin e o último indica o erro (qualidade do ajuste). Estas características são obtidas através da realização de um ajuste utilizando a função DHO, a expressão teoricamente derivada da forma da linha de Brillouin para materiais viscoelásticos adquirida a um único  $q$  [44,50]:

$$f(\omega) = B + \frac{I_0}{2\pi} \times \frac{\Gamma_B \times \omega_B^2}{(\omega^2 - \omega_B^2)^2 + (\Gamma_B \times \omega)^2} \quad (3.1)$$

, onde  $B$  é a *baseline*,  $I_0$  o fator de intensidade arbitrário,  $\Gamma_B$  a largura do pico de Brillouin e  $\omega_B$  o deslocamento de frequência do pico Brillouin. É apresentado na Figura 3.4 todo o *setup* necessário para a realização de uma BS.



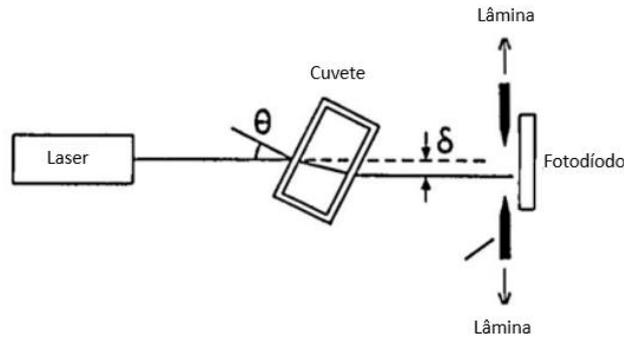
**Figura 3.4:** *Setup* óptico usado na aquisição de um espectro de Brillouin.

### 3.1.2 Refratômetro

Devido à natureza do agar, que desenvolve uma película dura através da evaporação, existe um desafio potencial na obtenção de dados experimentais exatos para determinar as percentagens de cada componente utilizando as propriedades viscoelásticas dos meios de cultura do agar.

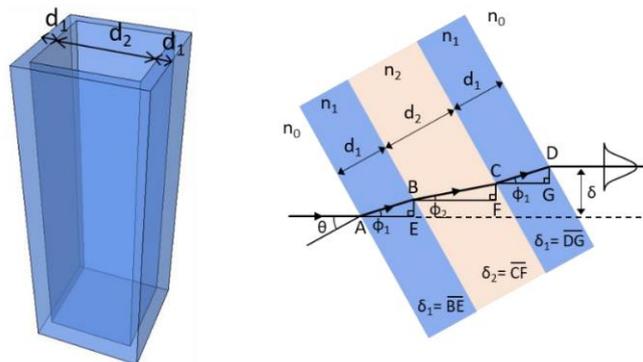
Até aqui já se podia realizar uma análise dos dados que dizem respeito às propriedades viscoelásticas da amostra. No que toca à obtenção das propriedades como *storage* ou *loss modulus*, e, por consequência o módulo longitudinal complexo, são ainda necessárias duas propriedades da amostra: o índice de refração e a densidade. De seguida, será apresentado o método para a obtenção do índice de refração das amostras de agar.

O método descrito por Shojiro Nemoto [81] serviu de base para a obtenção do índice de refração. No entanto foi realizada uma pequena alteração a este método: em vez de usar uma lâmina foram usadas duas (Figura 3.5). A presença de duas lâminas serve para determinar a posição exata do feixe de luz transmitido, obtendo-se uma maior qualidade de aquisição dos dados.



**Figura 3.5:** Configuração usada para a medição da deslocação do feixe (adaptado de [81]).

Este método utiliza uma cuvette transparente com paredes perfeitamente paralelas a uma distância conhecida entre elas, que é preenchida com o material transparente a ser estudado. Um feixe laser é então incidido obliquamente sobre uma das paredes transparentes da cuvette, atravessando-a. A Figura 3.6 representa o deslocamento do feixe de luz devido à refração que ocorre nas paredes da cuvette e do próprio material no seu interior. As variáveis  $n_0$ ,  $n_1$  e  $n_2$  representam o índice de refração do ar, das paredes da cuvette e da amostra, respetivamente. As outras variáveis  $\delta$  e  $\theta$  dizem respeito à deslocação e ao ângulo de incidência. Em suma, o deslocamento depende do ângulo de incidência, da espessura das paredes das cuvetes, da distância entre as paredes e do índice de refração da cuvette e da amostra.

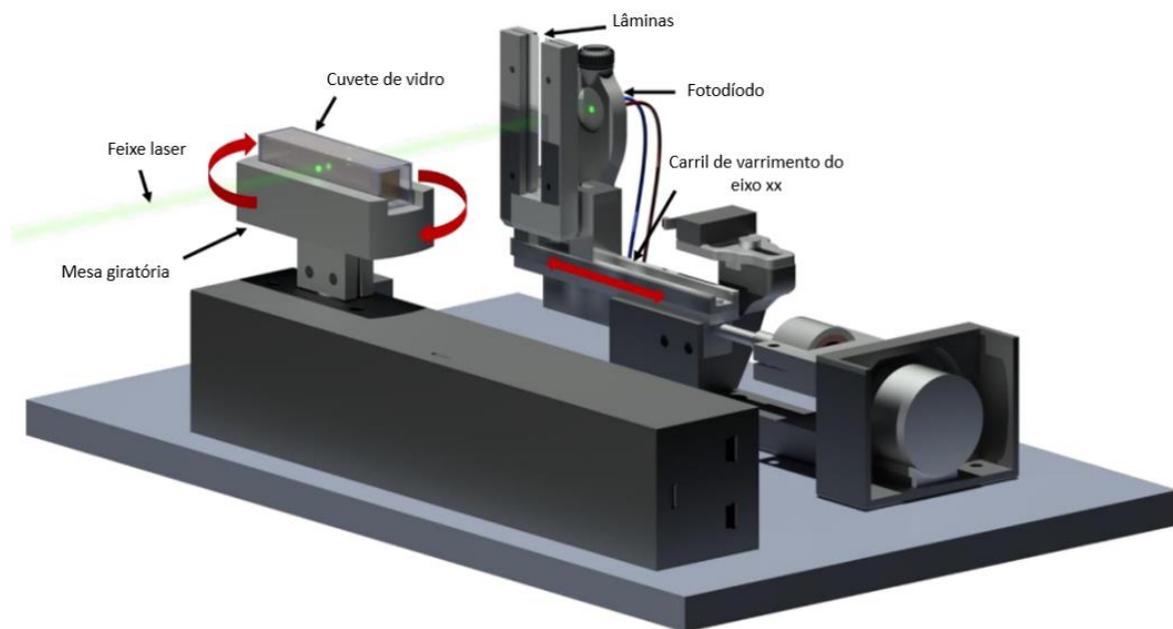


**Figura 3.6:** Deslocação do feixe de luz ao longo do eixo devido à refração na amostra e nas paredes da cuvette (adaptado de [81]).

Este método baseia-se num ensaio de transmissão e utiliza um percurso ótico que não contém superfícies de amostra expostas à atmosfera. Ao evitar o endurecimento constante da superfície (devido ao contacto direto com o ar) e testando toda a espessura de 10 mm da amostra, reduz-se exponencialmente qualquer influência da evaporação da água que possa alterar os resultados.

Através das equações desenvolvidas por Nemoto, ao realizar medições do deslocamento de uma mesma cuvette vazia e preenchida pela amostra a estudar, a diferença entre os deslocamentos providencia o índice de refração da amostra, independentemente da espessura da parede da cuvette ou mesmo do índice de refração da mesma [81].

Foi desenvolvido um refratômetro personalizado com base no método acima descrito a fim de automatizar as experiências de determinar, com precisão, o índice de refração das amostras. A Figura 3.7 ilustra o refratômetro projetado.



**Figura 3.7:** *Design* do refratômetro utilizado para a obtenção do índice de refração das amostras de agar.

O refratômetro é composto por duas partes principais: a mesa rotativa e o carril de varrimento do eixo xx. A mesa rotativa inclui um motor de passo e um suporte onde a cuvette se encaixa perfeitamente. Esta mesa define o ângulo entre o feixe de luz laser e a cuvette, permitindo testar vários ângulos de incidência de forma rápida, sequencial e precisa. O carril de varrimento do eixo xx é constituído por uma plataforma que se desloca perpendicularmente ao feixe laser na direção deste mesmo eixo. Na plataforma, duas lâminas separadas por cerca de 3 mm bloqueiam toda a luz laser, exceto no espaço entre elas. No final do percurso ótico, centrado entre as duas lâminas, foi colocado um fotodetector para detetar a luz transmitida. Para cada ângulo, o carril de varrimento do eixo xx desloca-se nos dois sentidos.

Antes de obter os dados do refratômetro para as amostras de agar é necessário realizar a sua calibração. Para tal, são realizadas três medições com a cuvette cheia de água destilada visto que o índice

de refração da água é conhecido. De notar que, sempre que alguma amostra é estudada são realizadas três medições em pontos diferentes, e são estudados diferentes ângulos, desde os 20° até aos 60° em intervalos de 5°. São efetuadas as medições tanto das cuvetes cheias de água destilada, como das cuvetes vazias e com a amostra. Por fim, foi desenvolvido um *software* para processar automaticamente os dados obtidos das cuvetes vazias e com os géis. O valor do índice de refração da amostra em questão foi calculado pela seguinte equação:

$$n_2 = n_0 \left\{ 1 + \left[ \frac{\cos \theta}{\left( \sin \theta - \frac{\Delta}{d_2} \right)} \right]^2 \right\}^{\frac{1}{2}} \sin \theta \quad (3.2)$$

, sendo que  $\Delta$  é dado pela seguinte equação:

$$\Delta = d_2 \left[ 1 - \frac{n_0 \cos \theta}{(n_2^2 - n_0^2 \sin^2 \theta)^{\frac{1}{2}}} \right] \sin \theta \quad (3.3)$$

### 3.1.3 Medições da densidade

A abordagem inicial para a medição da densidade das amostras consistiu em encher as cuvetes com agar e utilizar o volume interno e a massa conhecidas das cuvetes para calcular a densidade do gel. Algo semelhante ao princípio de Arquimedes calculando o quociente entre a massa e o volume das amostras. No entanto, este método não se revelou adequado para amostras de agar devido à superfície irregular causada pela adesão das paredes durante a fase líquida e pela contração durante o arrefecimento, resultando em imprecisões.

Desta forma, foi utilizado uma aproximação baseada num modelo de mistura ideal bifásico [38]. Este modelo considera a composição do gel como uma mistura de fases sólidas e líquidas, assumindo uma distribuição uniforme de cada fase. O modelo de mistura considera as frações de volume das fases sólidas e líquida e as densidades correspondentes de cada fase, e pode ser descrito por:

$$\rho = \frac{m_w + m_g}{V_w + V_g} = \frac{m_w + m_g}{\frac{m_w}{\rho_w} + \frac{m_g}{\rho_g}} \quad (3.4)$$

, onde  $m_w$  e  $m_g$  correspondem à massa da água e do componente (soluto) seco, respetivamente, e,  $\rho_w$  e  $\rho_g$  correspondem às densidades. No caso da presente dissertação como existe mais que um soluto seco, na equação anterior é realizada uma soma das massas e volumes de cada um individualmente.

A densidade de cada componente em pó foi determinada utilizando a deslocação do líquido. Para garantir que os componentes não se dissolviam durante o ensaio, foram criadas soluções saturadas para cada um deles e utilizadas como líquido deslocado. Para cada solução, foi adicionada uma elevada quantidade do soluto à água destilada e misturada durante longos minutos. Deixou-se repousar a solução, e, de seguida, foi decantada e filtrada com um filtro de 30  $\mu\text{m}$  de porosidade. A densidade de cada solução saturada foi medida. Finalmente, num recipiente de volume conhecido, adicionaram-se 3g do pó e a respetiva solução saturada até encher o volume do recipiente em questão ( $V_T$ ). A densidade de cada componente foi então calculada pela seguinte equação:

$$\rho_{gx} = \frac{m_{gx}}{V_T - \frac{m_s}{\rho_s}} \quad (3.5)$$

# Capítulo 4

## 4. Resultados obtidos

Este capítulo apresenta os resultados experimentais obtidos. Inicialmente, serão apresentadas as composições das amostras de agar, os dados resultantes da BS, bem como o índice de refração e densidade das amostras realizadas. Por fim, será apresentado o modelo viscoelástico.

### 4.1 Composição das amostras

O processo de obtenção dos géis de agar tende a ser bastante desafiante devido ao facto da água evaporar durante a preparação da amostra. Como foi dito anteriormente, foi considerada uma evaporação de aproximadamente 10 ml durante o processo. As concentrações obtidas para cada amostra são apresentadas na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1:** Concentrações de cada componente nas amostras realizadas.

Meio de Cultura	Número da Amostra	% Agar	% Aditivo	% Total de solutos	% Água
Agar (sem aditivos)	1	0,527	-	0,527	99,473
	2	1,263	-	1,263	98,737
	3	1,606	-	1,606	98,394
	4	2,227	-	2,227	97,773
	5	3,006	-	3,006	96,994
	6	3,011	-	3,011	94,989
	7	3,665	-	3,665	96,335
Agar + Triptona	8	2,019	0,262	2,281	97,719
	9	1,960	0,504	2,463	97,537
	10	1,868	0,973	2,841	97,159
	11	1,858	1,917	3,775	96,225
	12	1,908	3,882	5,790	94,210
Agar + Extrato de Levedura	13	1,966	0,244	2,210	97,790
	14	2,035	0,496	2,531	97,469
	15	1,891	0,975	2,866	97,134
	16	1,948	1,982	3,930	96,070
	17	1,946	3,971	5,917	94,083
Agar + Extrato de Malte	18	1,968	0,259	2,227	97,773
	19	1,950	0,500	2,450	97,550
	20	2,000	1,001	3,001	96,999
	21	1,915	1,913	3,828	96,172
	22	1,861	3,730	5,591	94,409

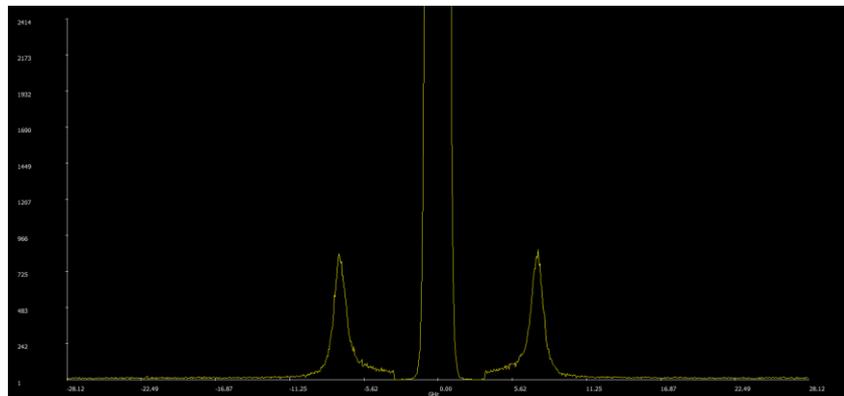
Após obter os valores reais da massa dos componentes, desde que fossem de encontro com os valores propostos para as percentagens em questão, e após a pesagem da cuvete e placa de Petri, vazias e cheias, calculou-se o peso total de gel produzido pela seguinte equação:

$$\begin{aligned} \text{Peso Total} = & (\text{Peso da Placa de Petri Cheia}) - (\text{Peso da Placa de Petri Vazia}) \\ & + (\text{Peso da Cuvete Cheia}) - (\text{Peso da Cuvete Vazia}) \end{aligned} \quad (4.1)$$

Para se obter a percentagem de agar utilizado e a percentagem do outro componente utilizado, realizou-se o quociente entre o valor da sua massa real, pelo valor do peso total. A percentagem de água é dada pela diferença entre o valor total (100 %) pela percentagem de solutos nessa mesma amostra.

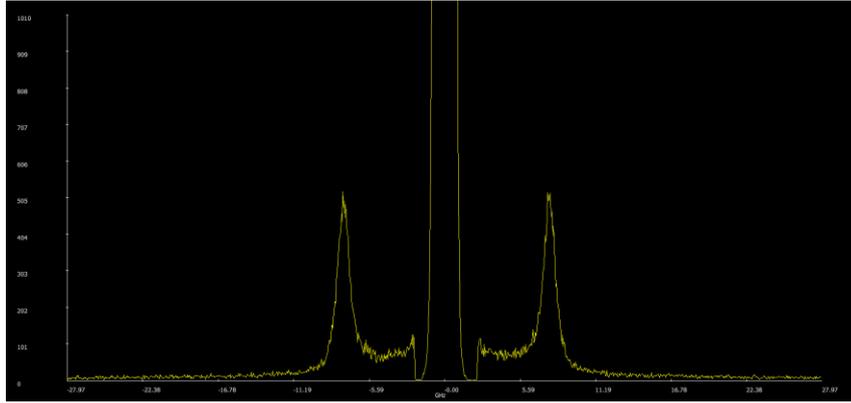
## 4.2 Difusão de Brillouin

A BS permite determinar as propriedades viscoelásticas das amostras, em concreto, os valores do deslocamento de frequência e da largura dos picos de Brillouin. Os valores obtidos pelo espectrómetro são analisados no *software Ghost*. Ao ser realizada uma espectroscopia, será obtido um espectro semelhante ao da Figura 4.1. Este apresenta um pico central, e dois picos simétricos. Será nestes picos que se obterão os valores em questão.



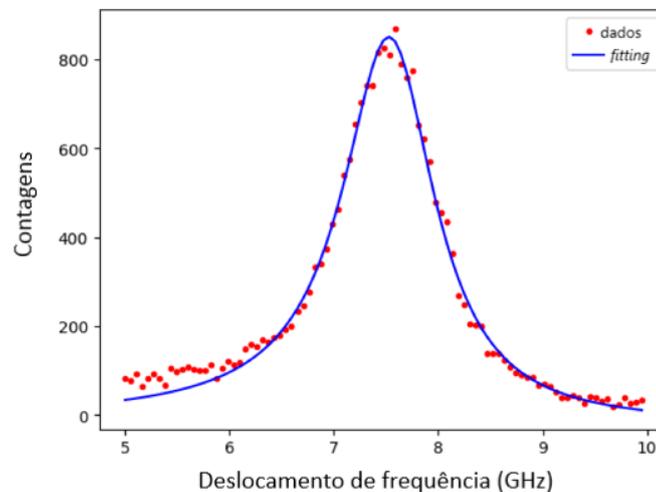
**Figura 4.1:** Exemplo de um espectro de uma amostra realizada (amostra 13).

Apesar da nitidez ótica diferir significativamente de amostra para amostra, o efeito de *multiple scattering* pode ser praticamente negligenciado em todas as amostras estudadas. Este normalmente aparece entre o pico de Rayleigh e picos de Brillouin e pode afetar significativamente os resultados (Figura 4.2).



**Figura 4.2:** Exemplo de um espectro que possui *multiple scattering*.

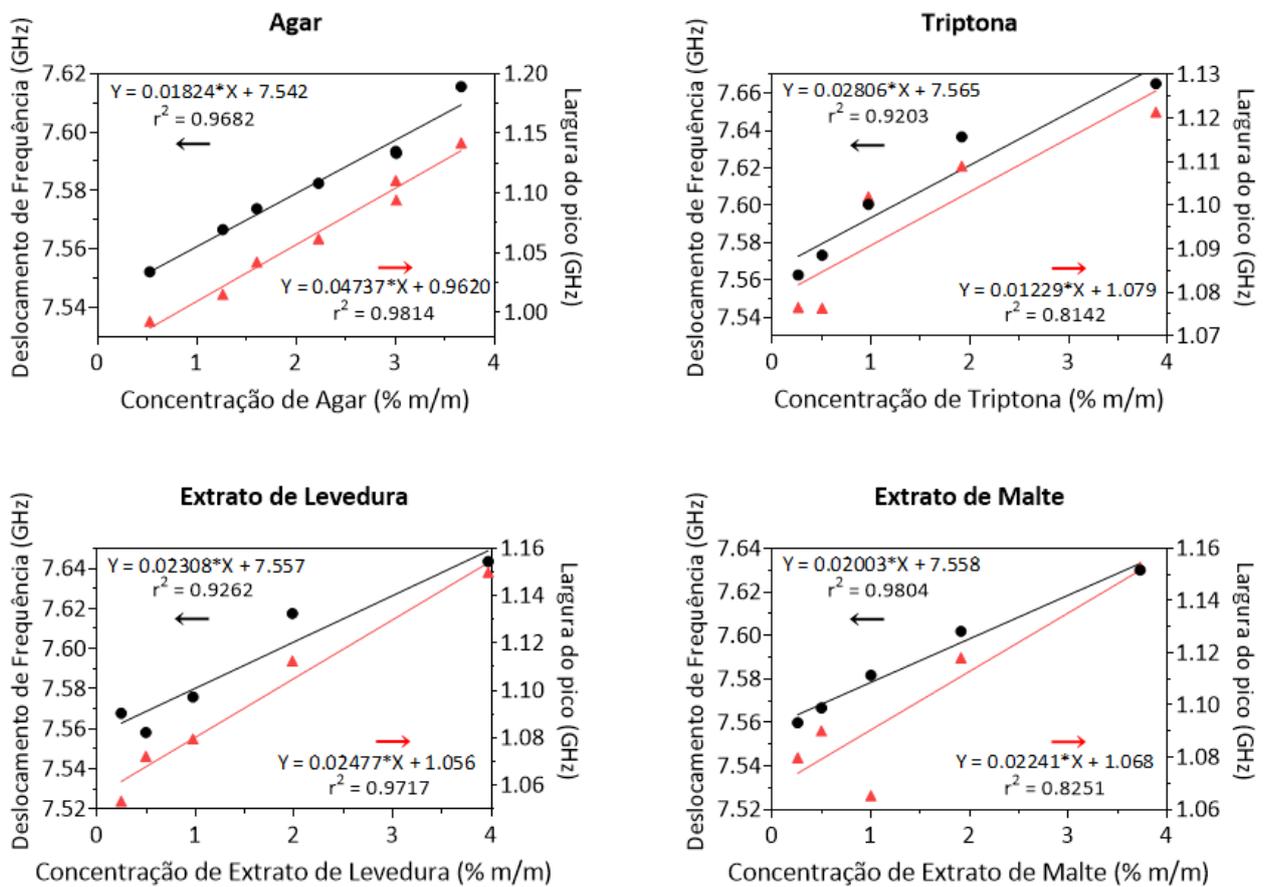
Para obter dados com a maior qualidade possível é sempre realizado um ajuste de um dos picos de Brillouin usando o modelo DHO descrito na equação 3.1., obtendo-se os valores do deslocamento de frequência e da largura do pico de Brillouin. A Figura 4.3 exemplifica a qualidade do ajuste aos dados adquiridos. Como se pode observar o ajuste segue praticamente na perfeição o espectro obtido representado pelos pontos.



**Figura 4.3:** Exemplo de um ajuste a um espectro de uma amostra realizada (amostra 13).

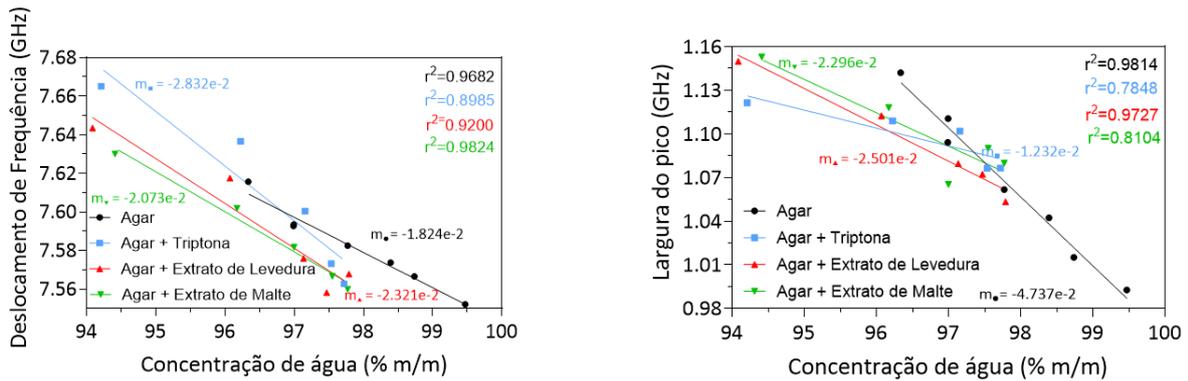
A Figura 4.4 mostra os valores do deslocamento de frequência e da largura do pico do espectro de Brillouin de todas as amostras em função da concentração da massa do componente usado. No caso das amostras que são constituídas apenas por agar, é apenas considerada a concentração em massa deste, na globalidade da amostra. Nas restantes amostras, os gráficos não representam a quantidade de agar utilizado. Embora, para estas amostras a concentração alvo de agar ser de 2 %, estas concentrações

encontram-se num intervalo de valores de  $2 \pm 0.142$  %, devido à imprevisibilidade da evaporação no processo da preparação da amostra.



**Figura 4.4:** Deslocamento de frequência e largura do pico dos espectros de Brillouin de todas as amostras em função da concentração em massa de cada componente estudado.

Foi realizado também o estudo das duas características em questão utilizando desta vez o conjunto dos solutos, ou seja, a soma do agar com cada componente individualmente (Figura 4.5). Além disso, os gráficos apresentados dizem respeito à concentração de água, e não à concentração de solutos como anteriormente apresentado.

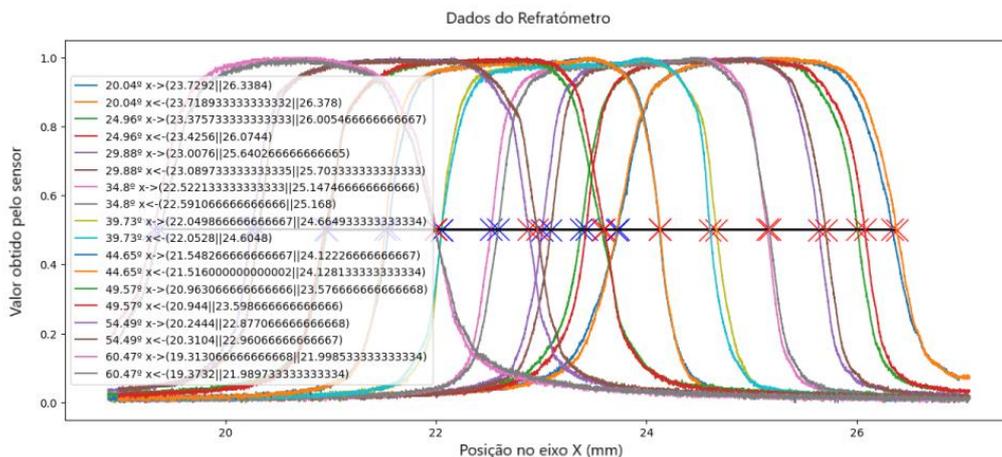


**Figura 4.5:** Deslocamento de frequência e largura do pico dos espectros de Brillouin de todas as amostras em função da concentração em massa da água.

### 4.3 Índice de refração

Embora todas as amostras tenham sido preparadas com o mesmo protocolo, algumas delas resultaram em géis mais opacos e com defeitos visíveis (efeito particularmente prevaemente nas amostras que continham extrato de levedura). Como foi utilizado um método de transmissão para o cálculo do índice de refração, a difração no interior da amostra teve um forte impacto nos resultados das amostras irregulares.

De seguida, é apresentado um exemplo de uma medição obtida através da realização de uma refratometria, na Figura 4.6.

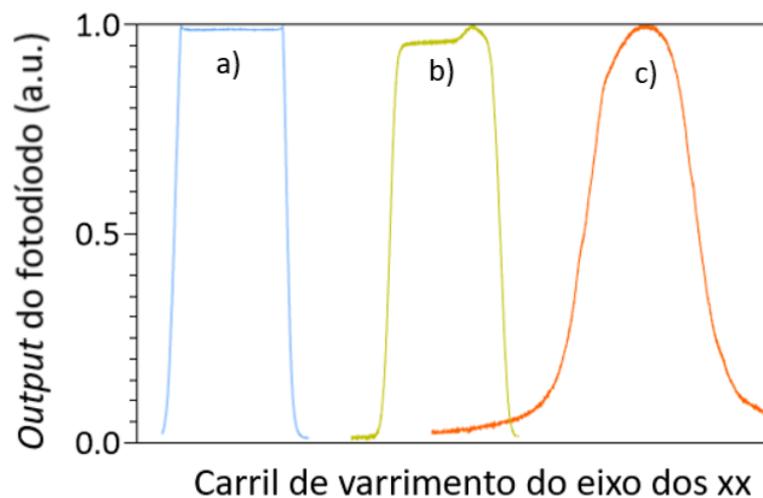


**Figura 4.6:** Exemplo de uma medição obtida através da refratometria (amostra 21).

Como é possível observar existem 9 pares de curvas sendo que estas praticamente se sobrepõem entre si. Cada par de curvas representa uma medição obtida pelo fotodíodo, sendo que cada uma representa o movimento num sentido oposto (direção xx sentido positivo e sentido negativo). Para cada

ângulo como se pode verificar estão associados dois valores sendo este o valor da movimentação do carril de movimento no eixo xx. As cruzes azuis e laranjas representam os valores mínimos e máximos de cada curva para um valor de cerca de metade da unidade. A partir destes valores é possível obter os valores do índice de refração dados pelo *software* desenvolvido.

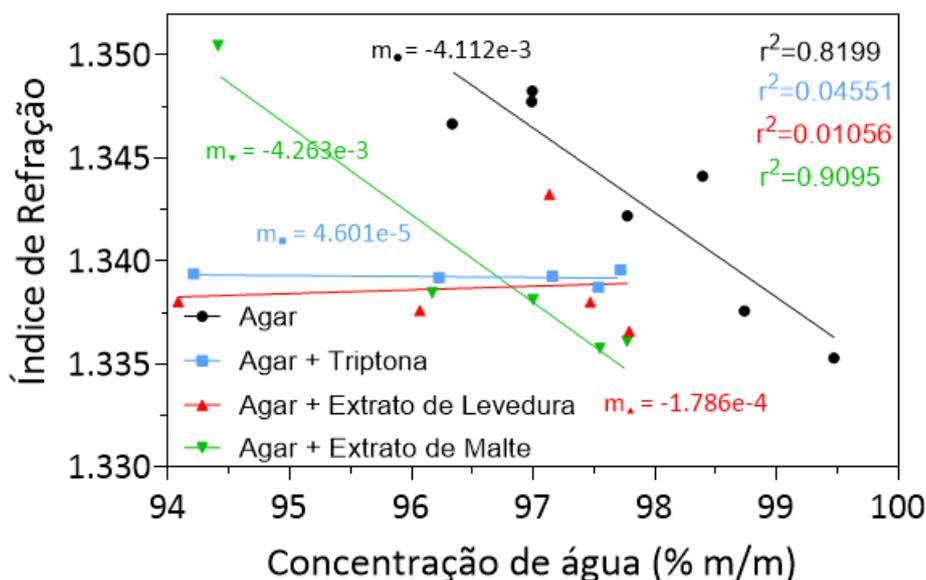
Na Figura 4.7, são apresentados os diferentes sinais obtidos nas refratometrias realizadas, devido aos diferentes níveis de transparência, e pequenos defeitos que alteram qualidade dos dados da experiência.



**Figura 4.7:** Representação do sinal adquirido com o refratômetro utilizado. O sinal a) refere-se a uma cuvette cheia de água; b) a uma cuvette com gel de agar; c) a uma cuvette com a maior concentração estudada de gel de agar com levedura.

Podemos verificar que a primeira possui uma forma mais retangular, com declives bem definidos, a segunda começa a ter extremidades mais arredondadas e, finalmente, a última que não possui qualquer declive bem definido. Isto porque, a água possui as qualidades ideais para uma medição, qualidades praticamente semelhantes às do gel de agar. Por sua vez, a amostra de gel de agar com levedura, é opaca o que piora a qualidade dos dados obtidos pelo refratômetro.

O índice de refração para todas as amostras em função da concentração de água em massa é apresentado na Figura 4.8.



**Figura 4.8:** Índice de refração de todas as amostras em função da concentração em massa da água.

Uma vez que os valores obtidos para o índice de refração foram afetados pelos defeitos óticos presentes nos géis, a fim de mitigar a incerteza associada ao cálculo do *storage* e do *loss modulus*, foram utilizados os valores obtidos a partir dos modelos de regressão linear apresentados na figura.

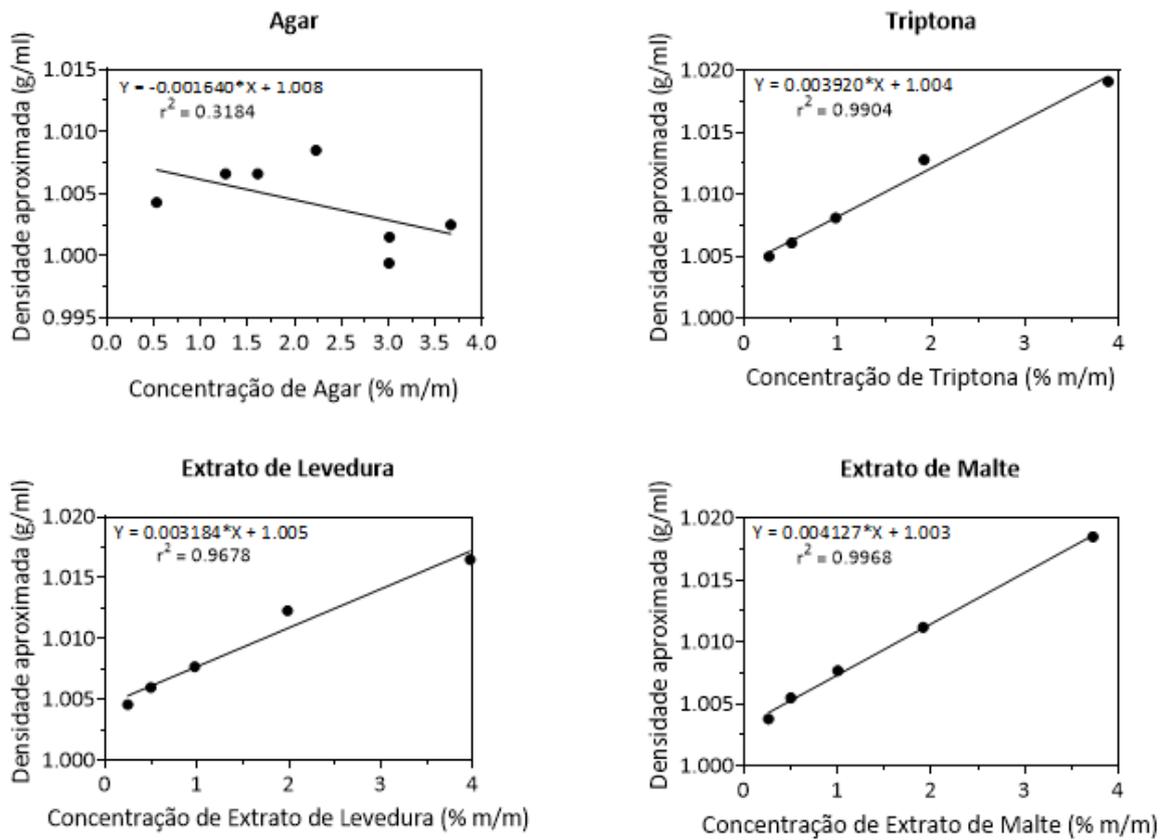
#### 4.4 Densidade

Para se obter as densidades dos compostos utilizados foram estudados dois tipos de densidade, a densidade da solução saturada e a densidade em pó. Estas são apresentadas na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2:** Densidade das soluções saturadas e dos solutos em pó.

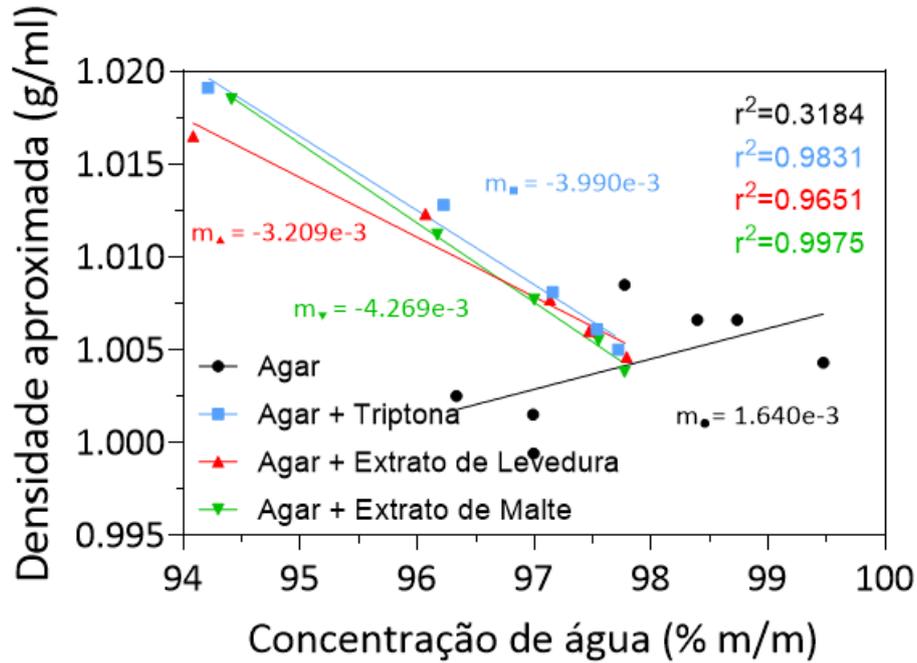
Material	Densidade da Solução Saturada (g/ml)	Densidade do Pó (g/ml)
Agar	1,0004	1,4022
Triptona	1,1325	1,9601
Extrato de Levedura	1,1705	1,7702
Extrato de Malte	1,1590	1,6573

Adicionalmente, para ser possível obter os valores de  $M'$  e  $M''$  de cada amostra em particular foram calculados os valores das densidades das amostras individualmente, através do modelo bifásico apresentado nas equações 3.4 e 3.5. Os dados são apresentados na Figura 4.9 dizem respeito às variações da densidade para o componente individualmente.



**Figura 4.9:** Densidade aproximada de todas as amostras em função da concentração em massa de cada componente estudado.

A Figura 4.10 representa a relação entre a densidade aproximada e a concentração de água das amostras estudadas.



**Figura 4.10:** Densidade aproximada de todas as amostras em função da concentração em massa da água.

#### 4.5 Modelo viscoelástico

O modelo viscoelástico descrito no capítulo anterior depende tanto do índice de refração como da densidade do material. Consequentemente, os erros resultantes de defeitos óticos das amostras e as incertezas resultantes do cálculo da densidade podem afetar a precisão do modelo viscoelástico apresentado.

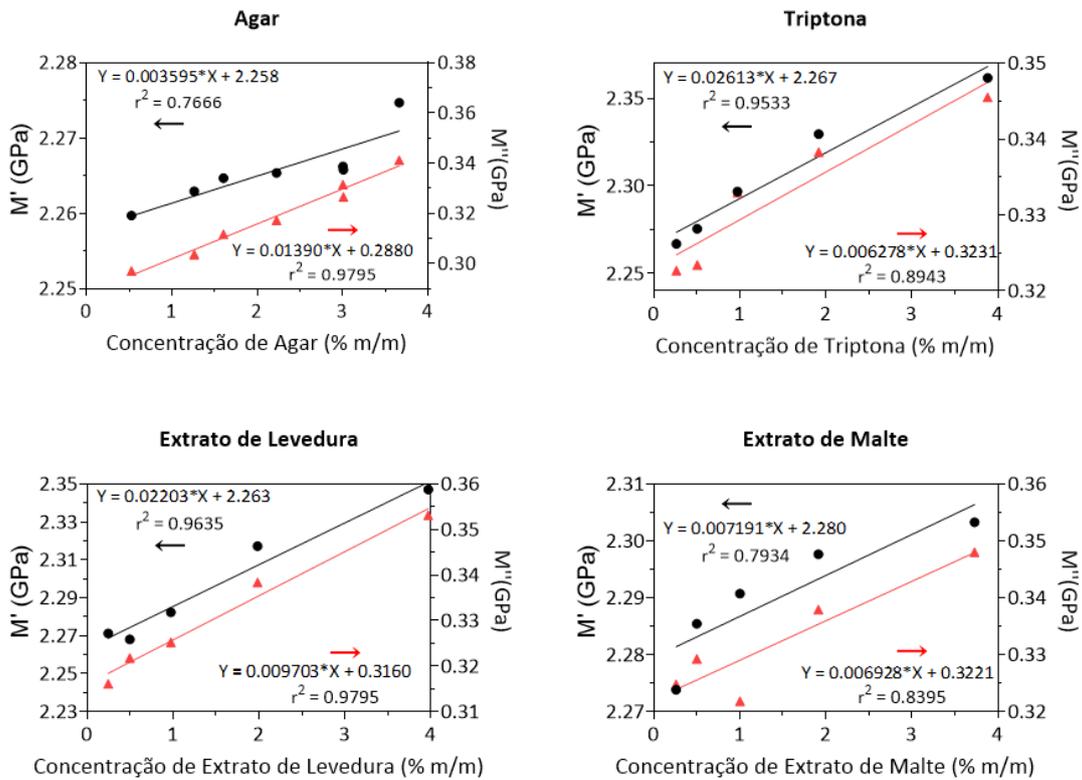
O *storage modulus* ( $M'$ ) e o *loss modulus* ( $M''$ ) foram calculados através da junção das equações 2.12 e 2.13, com as equações 2.6 e 2.7, passando a ser reescritas como:

$$M'(\omega_B) = \frac{\rho \cdot \lambda^2 \cdot \omega_B^2}{16 \cdot n^2 \cdot \pi^2} \quad (4.2)$$

$$M''(\omega_B) = \frac{\rho \cdot \lambda^2 \cdot \omega_B \cdot \Gamma_B}{16 \cdot n^2 \cdot \pi^2} \quad (4.3)$$

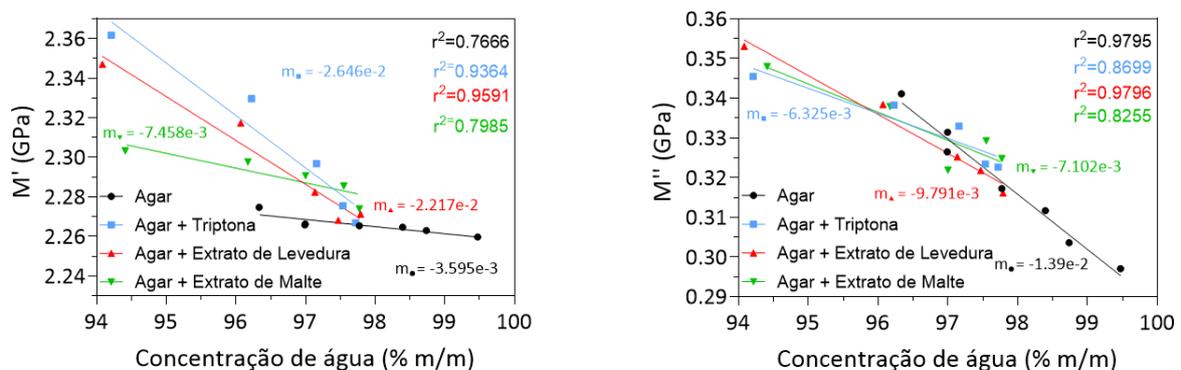
, onde  $\lambda$  possui o valor de 532 nm,  $\rho$  e  $n$  são a densidade e o índice de refração, respetivamente. Os valores de  $\omega_B$  e de  $\Gamma_B$  são expressos em unidades de frequência angular (rad/s). As equações apresentadas anteriormente só podem ser utilizadas em geometrias de *backscattering*.

A Figura 4.11 mostra os valores de  $M'$  e  $M''$  de todas as amostras em função da concentração do componente em questão.



**Figura 4.11:** *Storage* e *loss modulus* de todas as amostras em função da concentração em massa de cada componente estudado.

Os gráficos da Figura 4.12 apresentam os valores do *storage* e *loss modulus* em função da concentração em massa da água, e estudam as amostras como um todo, e não cada componente individualmente.



**Figura 4.12:** *Storage* e *loss modulus* de todas as amostras em função da concentração em massa da água.

# Capítulo 5

---

## 5. Discussão dos resultados

---

Este capítulo apresenta a discussão dos resultados obtidos com a realização desta dissertação. Como é possível verificar os resultados obtidos no capítulo anterior são de elevada importância, o que acaba por justificar a discussão dos mesmos de forma personalizada e pormenorizada. Ao longo do presente capítulo serão apresentadas as características ideais de cada meio de cultura celular de agar para cada tipo de microorganismo e aplicação.

### 5.1 Discussão dos resultados

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia da BS na determinação sem contacto e em tempo real das propriedades viscoelásticas de géis de agar. Estas propriedades podem ajudar a determinar a concentração de componentes individuais no gel, bem como avaliar a adequação do meio para o crescimento celular. A fim de estabelecer um modelo viscoelástico para a BS, foram analisados o espectro de Brillouin, o índice de refração e a densidade dos géis de agar em questão.

No que diz respeito à preparação das amostras pode-se verificar que os valores dos solutos das amostras foram de encontro com o valor alvo predefinido. Apenas a amostra 5 ficou um pouco distante do seu valor alvo, estando mesmo mais próxima do valor alvo seguinte. No que toca às concentrações do agar nas amostras com aditivo verifica-se uma excelente precisão e qualidade dos dados tendo em conta o valor alvo proposto de 2 %.

As características estudadas na BS, ou seja o deslocamento de frequência e a largura do pico de Brillouin, podem ser relacionadas com a resposta elástica e viscosa da amostra, respetivamente. Podemos então concluir que quanto maior o deslocamento de frequência, mais distantes estarão os picos de Brillouin do pico central, e por sua vez, menor será a elasticidade da amostra, i.e. será mais rígida. Por outro lado, quanto maior a largura dos picos de Brillouin maior será a viscosidade da amostra.

A análise individual de cada componente em estudo (Figura 4.4) permite concluir que o aumento da concentração do componente leva a um aumento do deslocamento de frequência e da largura do pico de Brillouin. Comparando as retas obtidas do deslocamento de frequência, verifica-se que a reta do agar é aquela que possui um menor declive, o que permite concluir que o agar será a amostra que menor influência terá na elasticidade com o aumento da concentração. Em contrapartida, a triptona será aquela que mais alterações verificará na sua elasticidade com o aumento da concentração. Os valores de  $r^2$  vão

de encontro aos valores desejados em qualquer regressão linear o que permite alegar que os dados possuem uma excelente relação entre as variáveis dependentes e independentes, indicando que as predições do modelo são precisas. Analisando agora os valores obtidos, dos componentes que serão adicionados ao agar, verifica-se que a triptona é a que possui maior deslocamento de frequência, e o extrato de malte o que possui menor. Desta forma, pode-se constatar que a triptona é o componente que possui maior rigidez, e, que por outro lado, o extrato de malte será mais elástico. As amostras de agar são ainda mais elásticas que a de extrato de malte por possuírem ainda um menor deslocamento de frequência do que as restantes.

Comparando as retas obtidas da largura do pico de Brillouin verifica-se que a reta do agar é aquela que possui um maior declive, o que permite concluir que o agar será a amostra que maior influência terá na viscosidade com o aumento da concentração. Em contrapartida, a triptona será aquela que menos alterações apresentará na sua viscosidade com o aumento da concentração. Os valores de  $r^2$  vão de encontro aos valores desejados em qualquer regressão linear, indicando que as predições do modelo são precisas, exceto nas amostras de triptona e do extrato de malte onde se pode observar a existência de dados que não se encontram enquadrados na reta obtida pela regressão. Excluindo as amostras de agar, verifica-se que a triptona é a que possui menor largura do pico, e o extrato de levedura o que possui maior, sendo infimamente superior ao extrato de malte. Desta forma, pode-se constatar que a triptona é o componente menos viscoso, e, que por outro lado, o extrato de levedura será o mais viscoso, apesar de o extrato de malte também possuir uma elevada viscosidade. As amostras de agar são ainda mais viscosas que a anterior por possuírem ainda uma maior largura do pico do que as restantes.

Analisando componente a componente, pode-se concluir que o agar é o componente mais elástico e mais viscoso. Dos restantes, verifica-se que a triptona possui uma maior rigidez, mas em contrapartida é a amostra menos viscosa. O extrato de levedura e o extrato de malte possuem comportamentos muito semelhantes sendo que as suas características se encontram algures entre as características do agar e da triptona.

De seguida, serão analisados os gráficos da Figura 4.5 que dizem respeito às amostras estudadas, ou seja, a combinação dos componentes tal como referenciado no Capítulo 3.1, mas em concentração de água da amostra. Tal como observado anteriormente, um aumento da concentração do agar, e consequentemente uma diminuição da concentração da água, leva a um aumento nas características em estudo. Os resultados indicam que as baixas concentrações de aditivos nos géis de agar podem diminuir o deslocamento de frequência em relação a um gel feito apenas com agar e água na mesma concentração de soluto. À medida que a concentração dos aditivos aumenta, o deslocamento de

frequência de Brillouin também aumenta, embora a taxas diferentes consoante o aditivo. Em termos de largura do pico de Brillouin, as baixas concentrações de aditivos não parecem ter um efeito significativo. No entanto, a concentrações mais elevadas, o aumento da largura do pico é mais lento em comparação com os géis que contêm apenas agar e água.

Apesar de estudos recentes sugerirem que a quantidade de água é o principal fator a afetar as características da BS [82], foram observadas diferenças significativas nos géis de agar com concentrações semelhantes, mas com diferentes composições, indicando que as composições dos géis de agar também possuem um papel importante nas características obtidas pela BS.

Apesar do refratómetro ter sido projetado para determinar o índice de refração com uma precisão elevada para amostras cujas superfícies expostas à água evaporam, o método de transmissão apresentou vários problemas. Embora um método que utilizasse a reflexão da superfície fosse o ideal para obter o índice de refração de uma amostra de agar sem perturbar o crescimento, é preferível utilizar o método da transmissão para criar uma correlação precisa com as concentrações dos constituintes do agar. Como observado na Figura 4.7, a transparência dos géis contendo apenas água e agar resulta em dois declives nítidos e distintos, idênticos aos obtidos na cuvette apenas com água destilada. No entanto, ao adicionar o extrato de levedura verifica-se, devido as declives assimétricos mal definidos, que houve um grande impacto na transparência da amostra. Este efeito afetou significativamente a precisão dos dados, como é possível observar na Figura 4.8. Relativamente às amostras apenas com agar verifica-se que a diminuição da concentração de água, ou seja, o aumento da concentração de agar, levou a um aumento no índice de refração das amostras. No entanto, verificaram-se comportamentos distintos no estudo de cada componente. Ao adicionar uma pequena quantidade do aditivo, verificou-se que havia uma redução ligeira do índice de refração, quando comparado com a amostra de controlo (agar a 2 %), excetuando a amostra que continha malte. O aumento da concentração do extrato de malte teve um efeito semelhante ao aumento da concentração de agar no índice de refração. Por outro lado, a adição de triptona teve pouco ou nenhum efeito sobre o índice de refração. As amostras do extrato de levedura foram as que apresentaram os defeitos mais visíveis nos géis, e os dados mostram isso, pois não apresentam nenhuma tendência evidente no índice de refração com o aumento da concentração do componente. No entanto, para todos os aditivos testados, as baixas concentrações parecem diminuir o índice de refração em comparação com o gel composto apenas por água e agar. O caso particular do extrato de malte não revela qualquer efeito adicional significativo no índice de refração, uma vez que a adição deste composto ou o aumento da concentração de agar proporcionam um aumento semelhante do índice de refração.

Para tentar solucionar os problemas levantados nas amostras com extrato de levedura surgiram duas possíveis soluções. Primeiramente, ajustar o protocolo realizado, mais precisamente a “receita” da preparação do agar, no entanto apresentaria riscos como a solidificação prematura do agar e uma maior evaporação da água na concentração da amostra. Também foi estudado o efeito da maximização da temperatura de aquecimento nas amostras de gel que possuíam extrato de levedura, e foi possível confirmar que o aumento da temperatura, apesar de proporcionar uma maior evaporação, tem a capacidade de atenuar os defeitos em questão.

Um dos principais desafios é obter medições exatas da densidade em tempo real em amostras de agar sem perturbar o crescimento celular. As técnicas disponíveis de medição direta da densidade, apesar de terem um nível de precisão superior, não eram práticas devido a questões como a rápida evaporação da água, o encolhimento desigual durante o arrefecimento e a adesão do agar às paredes enquanto se encontra no seu estado líquido. Para além da evaporação, o maior consumo de componentes do agar pelas células que se encontram na superfície criaria um gradiente de densidade que dificultaria a obtenção de medidas exatas ao utilizar técnicas como a densitometria de ultrassons ou de raio-X. No futuro, métodos como a elipsometria ou outras técnicas de medição da espessura poderiam ser exploradas, pois teriam o potencial de fornecer medições mais exatas e em tempo real. No entanto, devido à rápida capacidade das amostras de agar formarem os gradientes de densidade, as abordagens baseadas em técnicas de aproximação continuam a ser necessárias. Desta forma, o modelo bifásico foi a melhor solução encontrada para as aproximações da densidade das amostras dos géis de agar, que apesar de não ter a precisão de algumas técnicas de medição direta, permite uma aproximação razoável do valor da densidade do agar.

Analisando os valores das densidades saturadas e da densidade em pó concluiu-se que o agar é o que possui o menor valor em cada um dos tipos de densidade. Apesar da triptona possuir a menor densidade da solução saturada, de entre os três aditivos em estudo, é aquela que possui a maior densidade em pó. A maior densidade da solução saturada pertence ao extrato de levedura o que permite levantar a questão do porquê de ser esta a amostra mais turva. Relativamente às amostras obtidas, a densidade do agar não segue nenhuma tendência conclusiva ( $r^2=0.3184$ ), não se conseguindo concluir nenhuma relação entre o aumento da concentração e a sua densidade. Em relação aos aditivos em individual, verifica-se que o aumento da sua concentração leva a um aumento tendencial da densidade aproximada, possuindo valores muito próximos entre si para concentrações semelhantes. A análise anterior pode ser observada nos gráficos que estudam a relação entre a densidade e a concentração de

água (Figura 4.10), em que os dados não são analisados individualmente, mas como a amostra num todo. É possível verificar que a adição do agar não altera o comportamento do aditivo.

Uma vez analisados os valores do deslocamento de frequência, largura do pico, índice de refração e densidade das amostras, é possível então calcular e analisar os valores do *storage modulus* e *loss modulus*. Tal como referido anteriormente, o primeiro está relacionado com a resposta elástica e o segundo com a resposta viscosa da amostra. Os gráficos da Figura 4.11 permitem observar um aumento, a taxas diferentes, do  $M'$  e do  $M''$  com o aumento da concentração de cada componente. Observando os componentes a nível individual, concluiu-se que o agar possui uma taxa de evolução de  $M'$  mais constante. No que diz respeito aos aditivos, a triptona e o extrato de levedura possuem um aumento semelhante do  $M'$  associado ao aumento da concentração do componente, o que não ocorre com o extrato de malte, que possui uma evolução cerca de três vezes menor. Assim, é possível verificar que tanto a triptona como o extrato de levedura possuem um maior *storage modulus*, concluindo-se que estas amostras têm uma resposta mais rígida à deformação, ou seja, após ocorrer uma deformação possuem uma menor capacidade de voltarem à forma inicial. Em contrapartida, dentro dos aditivos, o extrato de malte é o que possui menor  $M'$ , concluindo-se que este terá uma resposta mais elástica. Tal como visto anteriormente o agar é o que possui maior elasticidade, confirmando assim a análise feita anteriormente.

Mudando o foco agora para o *loss modulus*, verifica-se que o agar, em contrapartida, é o componente que possui maior valor. Nos aditivos, por sua vez, a triptona é aquela que possui menor  $M''$ , podendo-se afirmar que possui uma menor resposta viscosa, ou seja, existe uma menor dificuldade da amostra em fluir. Por outro lado, o maior valor de  $M''$  pertence ao extrato de levedura, ainda que seja equiparado ao valor do extrato de malte, possuindo assim a maior resposta viscosa. Apesar de, como referido anteriormente, as amostras do extrato de levedura terem sido aquelas nas quais se notaram maiores problemas óticos, os dados finais das suas regressões lineares são positivos, podendo ser explicado pela elevada influência que os valores obtidos na BS têm no cálculo do  $M''$  relativamente aos valores da densidade e índice de refração.

Os resultados apresentados na Figura 4.12 mostram diferentes tendências do *storage modulus*, sendo que as amostras de agar não são tao propícias a alteração do  $M'$  com a concentração de água. As amostras de agar com triptona e de agar com extrato de levedura possuem tendências semelhantes e definidas com maior declive que as amostras de agar com extrato de malte. É então possível constatar que o *storage modulus* é mais dependente do tipo de aditivo adicionado. Em contrapartida, verifica-se que o *loss modulus* parece mais dependente da concentração de água, visto que o agar tem uma

tendência semelhante à dos aditivos, que entre si apresentam um comportamento extremamente semelhante.

Para além das culturas celulares serem quimicamente e fisicamente estáveis e de fornecerem um suporte nutritivo para o crescimento celular, por vezes os organismos que nelas são implementados têm uma seletividade em relação à cultura, i.e. a cultura de agar deve possuir certas características que permitam o crescimento ou a inibição da mesma. A adição de aditivos pode ser incorporada para atingir esse fim. Por exemplo, para microrganismos como bactérias, os meios de cultura celular devem ser menos viscosos, pois facilita a motilidade das bactérias pela cultura [83]. Desta forma, culturas de agar que utilizem o extrato de levedura ou extrato de malte não seriam tao benéficas como as que usariam a triptona. Por outro lado, se a intenção for estudar vírus este meio não seria tão vantajoso, pois a intenção passa por poder ter o mesmo o mais estanque possível [84]. A elasticidade por sua vez desempenha um papel fundamental na condução dos nutrientes até aos microrganismos [85]. Portanto, se a intenção da cultura celular for o crescimento do microrganismo, o extrato de malte seria o ideal pois gera uma amostra mais elástica. Por outro lado, a adição de triptona ao agar seria o ideal para a inibição do crescimento, uma vez que torna as amostras mais rígidas, dificultando o acesso de nutrientes ao microrganismo em questão.

# Capítulo 6

---

## 6. Conclusão e Trabalho futuro

---

O presente capítulo apresenta as principais conclusões obtidas com a realização da presente dissertação. São também sugeridas algumas perspectivas de trabalho futuro para a otimização dos processos e estruturas a desenvolver.

### 6.1 Conclusão

Atualmente, os biomateriais possuem uma posição de extrema importância em todas as áreas relacionadas com a saúde e a biomédica, desde a investigação até a aplicação em si. O conhecimento das suas propriedades mecânicas e viscoelásticas traz o benefício de otimizar a sua aplicação.

A BS é uma tecnologia ótica não invasiva, *label-free* e não destrutiva capaz de obter as propriedades viscoelásticas de um material com excelente precisão. Esta baseia-se na interação entre a luz e a amostra, levando à difusão dos fótons com uma mudança de frequência proporcional à frequência da onda acústica, utilizando dois pares de espelhos *Tandem Fabry-Pérot* para obter os valores do deslocamento de frequência e largura do pico de Brillouin. Com as mudanças de frequência da luz dispersa, é possível obter as propriedades viscoelásticas da amostra.

O estudo realizado na dissertação explorou a aplicação da BS na avaliação das propriedades viscoelásticas de culturas celulares de agar contendo diferentes aditivos a diferentes concentrações. Foram testadas amostras de géis com diferentes concentrações de agar, triptona, extrato de levedura e extrato de malte. As amostras foram caracterizadas por diversas técnicas: BS, refratometria, e medição da densidade. Todos os dados obtidos dos testes foram necessários para obter os valores finais de  $M'$  e  $M''$ .

O presente estudo mostra que as propriedades mecânicas dos géis de agar podem ser significativamente influenciadas pela inclusão de aditivos. Verificou-se que o índice de refração, a densidade, o espectro de Brillouin e as propriedades viscoelásticas dependem da composição dos géis de agar, o que permite compreender a criação de meios de cultura com propriedades mecânicas ideais para o crescimento celular. Além disso, os resultados da dissertação podem contribuir para o desenvolvimento de tecnologias de monitorização não invasivas e que obtenham dados em tempo real permitindo assim a avaliação da propagação e da multiplicação celular. Embora os resultados da

dissertação tenham sido promissores, seria necessária maior investigação para a compreensão da correlação entre a composição dos géis e o modelo viscoelástico proposto, em particular, no que se refere à obtenção de medições precisas do índice de refração e da densidade, e à sua correlação com as concentrações exatas de cada componente. Seriam, também, necessárias investigações para compreender de que forma a adição de múltiplos aditivos afeta o espectro de Brillouin e outras propriedades relevantes para o estabelecimento de um modelo viscoelástico.

Assim sendo, é possível comprovar que para o estudo de bactérias e de vírus, devem-se usar aditivos distintos, sendo eles a triptona para o primeiro e o extrato de levedura ou malte para o segundo. Se o objetivo fosse então o crescimento celular das culturas deveria-se usar o extrato de malte. Caso contrário os aditivos ideais seriam a triptona ou o extrato de levedura. Em suma, os resultados obtidos fornecem informações importantes sobre o desenvolvimento de meios de culturas, além de fornecerem informações para o possível progresso tecnológico de ferramentas não invasivas e em tempo real para monitorizar a cultura celular durante o crescimento e propagação das células.

## **6.2 Trabalho futuro**

A presente dissertação conseguiu com sucesso obter os valores do *storage* e *loss modulus* das amostras do gel de agar. No entanto, a precisão do modelo viscoelástico está muito dependente do refratómetro e do modelo bifásico utilizado para obter o índice de refração e densidades das amostras, respetivamente. Como trabalho futuro, a otimização de ambos os processos seria vantajoso para a obtenção de resultados com ainda maior qualidade e precisão.

O trabalho futuro poderá também focar-se na mistura de vários aditivos para constatar qual seria a resposta que a amostra daria. Pequenas alterações no protocolo, como por exemplo, na temperatura ou tempo de aquecimento poderiam suscitar novas questões e abordagens.

A nível da saúde, transportar a BS para a deteção e evolução de tumores, pela comparação entre tecido saudável e cancerígeno, seria no futuro uma grande ajuda no diagnóstico precoce do cancro.

A nível tecnológico, e visto que cada vez mais vivemos num mundo nanotecnológico, a BS poderia oferecer a capacidade de analisar as propriedades viscoelásticas de nanoestruturas ou matérias à nanoescala. A fusão da BS com outras técnicas de análise é também fascinante para trabalho futuro, por aliar a possibilidade da obtenção de diferentes características de um material simultaneamente.

A nível mais global seria extremamente interessante miniaturizar o espectrómetro de Brillouin, tornando-o mais acessível e portátil.

---

## Referências bibliográficas

---

- [1] E. Marin, F. Boschetto, and G. Pezzotti, "Biomaterials and biocompatibility: An historical overview," *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 108, no. 8. John Wiley and Sons Inc., pp. 1617–1633, Aug. 01, 2020. doi: 10.1002/jbm.a.36930.
- [2] L. Ghasemi-Mobarakeh, D. Kollahreez, S. Ramakrishna, and D. Williams, "Key terminology in biomaterials and biocompatibility," *Current Opinion in Biomedical Engineering*, vol. 10. Elsevier B.V., pp. 45–50, Jun. 01, 2019. doi: 10.1016/j.cobme.2019.02.004.
- [3] S. Paul, *Biomedical engineering and its applications in healthcare*. Springer Singapore, 2019. doi: 10.1007/978-981-13-3705-5.
- [4] N. R. Patel and P. P. Gohil, "International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance," 2012. [Online]. Available: [www.ijetae.com](http://www.ijetae.com)
- [5] R. A. Pérez, J. E. Won, J. C. Knowles, and H. W. Kim, "Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 65, no. 4. pp. 471–496, Apr. 2013. doi: 10.1016/j.addr.2012.03.009.
- [6] N. Nan, W. Hu, and J. Wang, "Lignin-Based Porous Biomaterials for Medical and Pharmaceutical Applications," *Biomedicines*, vol. 10, no. 4. MDPI, Apr. 01, 2022. doi: 10.3390/biomedicines10040747.
- [7] C. Poon, J. Chou, M. Cortie, and I. Kabakova, "Brillouin imaging for studies of micromechanics in biology and biomedicine: From current state-of-the-art to future clinical translation," *JPhys Photonics*, vol. 3, no. 1. IOP Publishing Ltd, Jan. 01, 2021. doi: 10.1088/2515-7647/abbf8c.
- [8] N. Sasaki, "Viscoelastic Properties of Biological Materials," in *Viscoelasticity - From Theory to Biological Applications*, InTech, 2012. doi: 10.5772/49979.
- [9] F. Palombo and D. Fioretto, "Brillouin Light Scattering: Applications in Biomedical Sciences," *Chemical Reviews*, vol. 119, no. 13. American Chemical Society, pp. 7833–7847, Jul. 10, 2019. doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00019.
- [10] C. L. Dikeman and G. C. Fahey, "Viscosity as related to dietary fiber: A review," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 46, no. 8. pp. 649–663, Dec. 01, 2006. doi: 10.1080/10408390500511862.

- [11] S. Corezzi, L. Comez, and M. Zanatta, "A simple analysis of Brillouin spectra from opaque liquids and its application to aqueous suspensions of poly-N-isopropylacrylamide microgel particles," *J Mol Liq*, vol. 266, pp. 460–466, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.molliq.2018.06.072.
- [12] B. Sharma and R. Kumar, "Estimation of bulk viscosity of dilute gases using a nonequilibrium molecular dynamics approach," *Phys Rev E*, vol. 100, no. 1, Jul. 2019, doi: 10.1103/PhysRevE.100.013309.
- [13] R. Prevedel, A. Diz-Muñoz, G. Ruocco, and G. Antonacci, "Brillouin microscopy: an emerging tool for mechanobiology," *Nature Methods*, vol. 16, no. 10. Nature Publishing Group, pp. 969–977, Oct. 01, 2019. doi: 10.1038/s41592-019-0543-3.
- [14] L. Wang, C. Wang, S. Wu, Y. Fan, and X. Li, "Influence of the mechanical properties of biomaterials on degradability, cell behaviors and signaling pathways: Current progress and challenges," *Biomaterials Science*, vol. 8, no. 10. Royal Society of Chemistry, pp. 2714–2733, May 21, 2020. doi: 10.1039/d0bm00269k.
- [15] F. Song, J. Zhou, X. Xu, Y. Xu, and Y. Bai, "Effect of a negative poisson ratio in the tension of ceramics," *Phys Rev Lett*, vol. 100, no. 24, Jun. 2008, doi: 10.1103/PhysRevLett.100.245502.
- [16] W. Zhang, P. Soman, K. Meggs, X. Qu, and S. Chen, "Tuning the poisson's ratio of biomaterials for investigating cellular response," *Adv Funct Mater*, vol. 23, no. 25, pp. 3226–3232, Jul. 2013, doi: 10.1002/adfm.201202666.
- [17] S. M. Mijailovich, M. Kojic, M. Zivkovic, B. Fabry, and J. J. Fredberg, "A finite element model of cell deformation during magnetic bead twisting," *J Appl Physiol*, vol. 93, no. 4, pp. 1429–1436, 2002, doi: 10.1152/japplphysiol.00255.2002.
- [18] S. Ghosh *et al.*, "Deformation Microscopy for Dynamic Intracellular and Intranuclear Mapping of Mechanics with High Spatiotemporal Resolution," *Cell Rep*, vol. 27, no. 5, pp. 1607-1620.e4, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.009.
- [19] A. J. Mendoza *et al.*, "Particle laden fluid interfaces: Dynamics and interfacial rheology," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 206. Elsevier, pp. 303–319, 2014. doi: 10.1016/j.cis.2013.10.010.
- [20] Y. Seo and W. Jhe, "Atomic force microscopy and spectroscopy," *Reports on Progress in Physics*, vol. 71, no. 1, Jan. 2008, doi: 10.1088/0034-4885/71/1/016101.
- [21] K. Elsayad, S. Polakova, and J. Gregan, "Probing Mechanical Properties in Biology Using Brillouin Microscopy," *Trends in Cell Biology*, vol. 29, no. 8. Elsevier Ltd, pp. 608–611, Aug. 01, 2019. doi: 10.1016/j.tcb.2019.04.002.

- [22] Q. Xia, H. Xiao, Y. Pan, and L. Wang, "Microrheology, advances in methods and insights," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 257. Elsevier B.V., pp. 71–85, Jul. 01, 2018. doi: 10.1016/j.cis.2018.04.008.
- [23] K. Duval *et al.*, "Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture," *Physiology*, vol. 32, no. 4. American Physiological Society, pp. 266–277, Jun. 14, 2017. doi: 10.1152/physiol.00036.2016.
- [24] W. L. Mckeehan, D. Barnes, L. Reid, E. Stanbridge, H. Murakami, and G. H. Sato, "Frontiers in Mammalian Cell Culture," 1990.
- [25] M. Kapałczyńska *et al.*, "2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures," *Archives of Medical Science*, vol. 14, no. 4, pp. 910–919, 2018, doi: 10.5114/aoms.2016.63743.
- [26] A. D. McNaught and A. Wilkinson, "Compendium of Chemical Terminology." doi: 10.1351/goldbook.
- [27] P. Fara, "Newton shows the light: A commentary on Newton (1672) 'A letter . . . containing his new theory about light and colours . . .'," *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 373, no. 2039. Royal Society of London, Apr. 13, 2015. doi: 10.1098/rsta.2014.0213.
- [28] R. Battesti and C. Rizzo, "Magnetic and electric properties of a quantum vacuum," *Reports on Progress in Physics*, vol. 76, no. 1, Jan. 2013, doi: 10.1088/0034-4885/76/1/016401.
- [29] *UNIVERSITY PHYSICS II: THERMODYNAMICS, ELECTRICITY, & MAGNETISM*. LibreTexts Physics, 2022.
- [30] A. Wax and V. Backman, "Biomedical Applications of Light Scattering (Biophotonics Series)."
- [31] A. Wise, "Part 1: Basics Fundamentals of (Optical) Spectroscopy," Oxford Instruments Andor, Ed., 2022.
- [32] R. Jones, T. J. Coomber, J. P. McCormick, A. F. Fell, and B. J. Clark, "Recent Advances in Atomic and Molecular Spectroscopy: Multi-component Luminescence Analysis of Some Nitrogen Heterocycles." doi: 10.1039/ap9882500381.
- [33] E. Rousseau and D. Felbacq, "Concept of a Generalized Law of Refraction: A Phenomenological Model," *ACS Photonics*, vol. 7, no. 7, pp. 1649–1654, Jul. 2020, doi: 10.1021/acsp Photonics.0c00639.

- [34] E. Rousseau and D. Felbacq, "Concept of a Generalized Law of Refraction: A Phenomenological Model," *ACS Photonics*, vol. 7, no. 7, pp. 1649–1654, Jul. 2020, doi: 10.1021/acsp Photonics.0c00639.
- [35] T. A. Nieminen, G. Knöner, N. R. Heckenberg, and H. Rubinsztein-Dunlop, "Physics of Optical Tweezers," *Methods in Cell Biology*, vol. 82, pp. 207–236, 2007. doi: 10.1016/S0091-679X(06)82006-6.
- [36] A. B. Singaraju, D. Bahl, and L. L. Stevens, "Brillouin Light Scattering: Development of a Near Century-Old Technique for Characterizing the Mechanical Properties of Materials," *AAPS PharmSciTech*, vol. 20, no. 3, Springer New York LLC, Apr. 01, 2019. doi: 10.1208/s12249-019-1311-5.
- [37] S. V. Adichtchev, Y. A. Karpegina, K. A. Okotrub, M. A. Surovtseva, V. A. Zykova, and N. V. Surovtsev, "Brillouin spectroscopy of biorelevant fluids in relation to viscosity and solute concentration," *Phys Rev E*, vol. 99, no. 6, Jun. 2019, doi: 10.1103/PhysRevE.99.062410.
- [38] M. Bailey *et al.*, "Viscoelastic properties of biopolymer hydrogels determined by Brillouin spectroscopy: A probe of tissue micromechanics," 2020. [Online]. Available: <http://advances.sciencemag.org/>
- [39] J. S. Lupoi, E. Gjersing, and M. F. Davis, "Evaluating lignocellulosic biomass, its derivatives, and downstream products with Raman spectroscopy," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 3, no. APR, Frontiers Media S.A., 2015. doi: 10.3389/fbioe.2015.00050.
- [40] M. Shirasaki, "Large angular dispersion by a virtually imaged phased array and its application to a wavelength demultiplexer," 1996.
- [41] C. E. Bottani and D. Fioretto, "Brillouin scattering of phonons in complex materials," *Advances in Physics: X*, vol. 3, no. 1, Taylor and Francis Ltd., pp. 607–633, Jan. 01, 2018. doi: 10.1080/23746149.2018.1467281.
- [42] Y. Muanenda, C. J. Oton, and F. Di Pasquale, "Application of Raman and Brillouin Scattering Phenomena in Distributed Optical Fiber Sensing," *Frontiers in Physics*, vol. 7, Frontiers Media S.A., Oct. 29, 2019. doi: 10.3389/fphy.2019.00155.
- [43] F. Scarponi *et al.*, "High-performance versatile setup for simultaneous Brillouin-Raman microspectroscopy," *Phys Rev X*, vol. 7, no. 3, Jul. 2017, doi: 10.1103/PhysRevX.7.031015.
- [44] S. Mattana *et al.*, "Non-contact mechanical and chemical analysis of single living cells by microspectroscopic techniques," *Light Sci Appl*, vol. 7, no. 2, Feb. 2018, doi: 10.1038/lsa.2017.139.

- [45] M. Pochylski and J. Gapiński, "Simple way to analyze Brillouin spectra from turbid liquids," *Opt Lett*, vol. 40, no. 7, p. 1456, Apr. 2015, doi: 10.1364/ol.40.001456.
- [46] Z. Meng, A. J. Traverso, C. W. Ballmann, M. A. Troyanova-Wood, and V. V. Yakovlev, "Seeing cells in a new light: a renaissance of Brillouin spectroscopy," *Adv Opt Photonics*, vol. 8, no. 2, p. 300, Jun. 2016, doi: 10.1364/aop.8.000300.
- [47] R. J. J. Rioboó, N. Gontán, D. Sanderson, M. Desco, and M. V. Gómez-Gaviro, "Brillouin spectroscopy: From biomedical research to new generation pathology diagnosis," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 15. MDPI AG, Aug. 01, 2021. doi: 10.3390/ijms22158055.
- [48] G. Antonacci, M. R. Foreman, C. Paterson, and P. Török, "Spectral broadening in Brillouin imaging," *Appl Phys Lett*, vol. 103, no. 22, Nov. 2013, doi: 10.1063/1.4836477.
- [49] Z. Coker, M. Troyanova-Wood, A. J. Traverso, T. Yakupov, Z. N. Utegulov, and V. V. Yakovlev, "Assessing performance of modern Brillouin spectrometers," *Opt Express*, vol. 26, no. 3, p. 2400, Feb. 2018, doi: 10.1364/oe.26.002400.
- [50] M. Mattarelli, G. Capponi, A. A. Passeri, D. Fioretto, and S. Caponi, "Disentanglement of Multiple Scattering Contribution in Brillouin Microscopy," *ACS Photonics*, vol. 9, no. 6, pp. 2087–2091, Jun. 2022, doi: 10.1021/acsp Photonics.2c00322.
- [51] L. Comez, D. Fioretto, F. Scarponi, and G. Monaco, "Density fluctuations in the intermediate glass-former glycerol: A Brillouin light scattering study," *Journal of Chemical Physics*, vol. 119, no. 12, pp. 6032–6043, Sep. 2003, doi: 10.1063/1.1601608.
- [52] P. A. Janmey, S. Hvidt, J. Lamb, and T. P. Stossel, "Resemblance of actin-binding protein/actin gels to covalently crosslinked networks," *Nature*, vol. 345, no. 6270, pp. 89–92, May 1990, doi: 10.1038/345089a0.
- [53] M. Tempel, G. Isenberg, and E. Sackmann, "Temperature-induced sol-gel transition and microgel formation in-actinin cross-linked actin networks: A rheological study," 1996.
- [54] Z. Meng, T. Thakur, C. Chitrakar, M. K. Jaiswal, A. K. Gaharwar, and V. V. Yakovlev, "Assessment of Local Heterogeneity in Mechanical Properties of Nanostructured Hydrogel Networks," *ACS Nano*, vol. 11, no. 8, pp. 7690–7696, Aug. 2017, doi: 10.1021/acsnano.6b08526.
- [55] S. Mattana, S. Caponi, F. Tamagnini, D. Fioretto, and F. Palombo, "Viscoelasticity of amyloid plaques in transgenic mouse brain studied by Brillouin microspectroscopy and correlative Raman analysis," *J Innov Opt Health Sci*, vol. 10, no. 6, Nov. 2017, doi: 10.1142/S1793545817420019.

- [56] K. V. Berghaus, S. H. Yun, and G. Scarcelli, "High speed sub-GHz spectrometer for Brillouin scattering analysis," *Journal of Visualized Experiments*, vol. 2015, no. 106, Dec. 2015, doi: 10.3791/53468.
- [57] J. R. Sandercock, "Trends in Brillouin scattering: Studies of opaque materials, supported films, and central modes," 1982, pp. 173–206. doi: 10.1007/3540115137\_6.
- [58] J. R. Sandercock, "Simple stabilization scheme for maintenance of mirror alignment in a scanning Fabry-Perot interferometer," 1976. doi: 10.1088/0022-3735/9/7/016.
- [59] Y. He and B. J. Orr, "Rapid measurement of cavity ringdown absorption spectra with a swept-frequency laser," *Appl Phys B*, vol. 79, no. 8 SPEC. ISS., pp. 941–945, Dec. 2004, doi: 10.1007/s00340-004-1691-3.
- [60] J. R. Sandercock, "Brillouin scattering study of SbSI using a double-passed, stabilised scanning interferometer," *Opt Commun*, vol. 2, no. 2, pp. 73–76, Jul. 1970, doi: 10.1016/0030-4018(70)90047-7.
- [61] J. R. Sandercock, "Light scattering from surface acoustic phonons in metals and semiconductors," *Solid State Commun*, vol. 26, no. 8, pp. 547–551, May 1978, doi: 10.1016/0038-1098(78)91307-8.
- [62] S. Xiao, A. M. Weiner, and C. Lin, "A dispersion law for virtually imaged phased-array spectral dispersers based on paraxial wave theory," *IEEE J Quantum Electron*, vol. 40, no. 4, pp. 420–426, Apr. 2004, doi: 10.1109/JQE.2004.825210.
- [63] M. Shirasaki, A. N. Akhter, and C. Lin, "Virtually Imaged Phased Array with Graded Reflectivity," 1999.
- [64] G. Scarcelli and S. H. Yun, "Confocal Brillouin microscopy for three-dimensional mechanical imaging," *Nat Photonics*, vol. 2, no. 1, pp. 39–43, Jan. 2008, doi: 10.1038/nphoton.2007.250.
- [65] M. A. Taylor, A. W. Kijas, Z. Wang, J. Lauko, and A. E. Rowan, "Heterodyne Brillouin microscopy for biomechanical imaging," *Biomed Opt Express*, vol. 12, no. 10, p. 6259, Oct. 2021, doi: 10.1364/boe.435869.
- [66] N. John and S. George, "Raman Spectroscopy," in *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*, Elsevier, 2017, pp. 95–127. doi: 10.1016/B978-0-323-46140-5.00005-4.
- [67] R. S. Das and Y. K. Agrawal, "Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications," *Vibrational Spectroscopy*, vol. 57, no. 2, pp. 163–176, Nov. 2011. doi: 10.1016/j.vibspec.2011.08.003.
- [68] E. Smith and G. Dent, "Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach, 2nd Edition," 2019.

- [69] A. J. Traverso, J. V. Thompson, Z. A. Steelman, Z. Meng, M. O. Scully, and V. V. Yakovlev, "Dual Raman-Brillouin Microscope for Chemical and Mechanical Characterization and Imaging," *Anal Chem*, vol. 87, no. 15, pp. 7519–7523, Aug. 2015, doi: 10.1021/acs.analchem.5b02104.
- [70] K. Phelan and K. M. May, "Basic techniques in mammalian cell tissue culture," *Curr Protoc Cell Biol*, vol. 2015, pp. 1.1.1-1.1.22, 2015, doi: 10.1002/0471143030.cb0101s66.
- [71] W. K. Lee, Y. Y. Lim, A. T. C. Leow, P. Namasivayam, J. O. Abdullah, and C. L. Ho, "Factors affecting yield and gelling properties of agar," *Journal of Applied Phycology*, vol. 29, no. 3. Springer Netherlands, pp. 1527–1540, Jun. 01, 2017. doi: 10.1007/s10811-016-1009-y.
- [72] W. J. Chi, Y. K. Chang, and S. K. Hong, "Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 94, no. 4. pp. 917–930, May 2012. doi: 10.1007/s00253-012-4023-2.
- [73] K. B. Guiseley, "Chemical and physical properties of algal polysaccharides used for cell immobilization," *Enzyme Microb Technol*, vol. 11, no. 11, pp. 706–716, Nov. 1989, doi: 10.1016/0141-0229(89)90119-1.
- [74] N. Gupta, V. Jain, M. R. Joseph, and S. Devi, "A Review on Micropropagation Culture Method," *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, vol. 8, no. 1, pp. 86–93, Feb. 2020, doi: 10.22270/ajprd.v8i1.653.
- [75] J. Koblitz *et al.*, "MediaDive: the expert-curated cultivation media database," *Nucleic Acids Res*, vol. 51, no. D1, pp. D1531–D1538, Jan. 2023, doi: 10.1093/nar/gkac803.
- [76] S. Zheng *et al.*, "Implication of Surface Properties, Bacterial Motility, and Hydrodynamic Conditions on Bacterial Surface Sensing and Their Initial Adhesion," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 9. Frontiers Media S.A., Feb. 12, 2021. doi: 10.3389/fbioe.2021.643722.
- [77] C. Handler, G. Scarcelli, and J. Zhang, "Time-lapse mechanical imaging of neural tube closure in live embryo using Brillouin microscopy," *Sci Rep*, vol. 13, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-27456-z.
- [78] G. Antonacci and S. Braakman, "Biomechanics of subcellular structures by non-invasive Brillouin microscopy," *Sci Rep*, vol. 6, Nov. 2016, doi: 10.1038/srep37217.
- [79] N. Correa, S. Harding, M. Bailey, S. Brasselet, and F. Palombo, "Image analysis applied to Brillouin images of tissue-mimicking collagen gellatins," *Biomed Opt Express*, vol. 10, no. 3, p. 1329, Mar. 2019, doi: 10.1364/boe.10.001329.

- [80] G. Scarcelli *et al.*, “Noncontact three-dimensional mapping of intracellular hydromechanical properties by Brillouin microscopy,” *Nat Methods*, vol. 12, no. 12, pp. 1132–1134, Dec. 2015, doi: 10.1038/nmeth.3616.
- [81] S. Nemoto, “Measurement of the refractive index of liquid using laser beam displacement,” *Appl Opt*, vol. 31, no. 31, p. 6690, Nov. 1992, doi: 10.1364/AO.31.006690.
- [82] P. J. Wu *et al.*, “Water content, not stiffness, dominates Brillouin spectroscopy measurements in hydrated materials,” *Nature Methods*, vol. 15, no. 8. Nature Publishing Group, pp. 561–562, Aug. 01, 2018. doi: 10.1038/s41592-018-0076-1.
- [83] Y. Wei *et al.*, “The population dynamics of bacteria in physically structured habitats and the adaptive virtue of random motility,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, no. 10, pp. 4047–4052, Mar. 2011, doi: 10.1073/pnas.1013499108.
- [84] M. Matrosovich, T. Matrosovich, W. Garten, and H. D. Klenk, “New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays,” *Virology*, vol. 3, Aug. 2006, doi: 10.1186/1743-422X-3-63.
- [85] S. Gognies and A. Belarbi, “Use of a new gelling agent (Eladium©) as an alternative to agar-agar and its adaptation to screen biofilm-forming yeasts,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 88, no. 5, pp. 1095–1102, Nov. 2010, doi: 10.1007/s00253-010-2800-3.