

CÉLULAS FOTOACÚSTICAS PARA MEDIDAS EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

Rafael Furtado de Paiva¹, Paulo Roxo Barja²

¹⁻²UNIVAP/Laboratório de Fotoacústica Aplicada a Sistemas Biológicos (FASBio), Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento (IP&D), Av. Shishima Hifumi 2911, 12.244-000, São José dos Campos, SP, Brasil, rfurtado@univap.br, barja@univap.br

Resumo- A técnica fotoacústica baseia-se na emissão de ondas acústicas a partir da absorção de luz modulada por uma amostra. Estas ondas podem ser detectadas por um microfone posicionado no interior da célula fotoacústica. A técnica permite avaliar propriedades ópticas e térmicas de diferentes tipos de amostras. É particularmente interessante no estudo de materiais biológicos, pois não requer preparo prévio da amostra e permite analisar líquidos, amostras liofilizadas e amostras altamente espalhadoras. A célula fotoacústica é projetada de acordo com a aplicação desejada, podendo ser fechada (quando a amostra fica no interior da célula) ou aberta (a própria amostra veda a câmara). O presente trabalho mostra diferentes modelos de células fotoacústicas projetados para aplicação nas áreas de meio ambiente e saúde.

Palavras-chave: técnica fotoacústica, célula fotoacústica, célula fotoacústica aberta (OPC)

Área do Conhecimento: Engenharia Biomédica

Introdução

O efeito fotoacústico foi descoberto por Alexander Graham Bell em 1880, ao perceber que a incidência de luz modulada numa superfície sólida em forma de diafragma produzia som. Estudando o efeito, Bell percebeu que a intensidade do sinal acústico era influenciada pelo nível de absorção da luz pela amostra (BARJA, 1996).

A técnica fotoacústica baseia-se na absorção de luz modulada por uma amostra, com a conseqüente modulação da temperatura no interior de uma célula fotoacústica. Este processo gera ondas acústicas que podem ser captadas por um microfone posicionado no interior da célula fotoacústica. Esta técnica experimental permite o estudo de propriedades ópticas (como absorção e transmissão de radiação) e térmicas (difusividade e efusividade térmica) de uma amostra.

O método fotoacústico encontra aplicações promissoras no estudo de sistemas biológicos, pois estes muitas vezes apresentam características que dificultam sua análise através de outras técnicas ópticas. Podemos destacar as aplicações no campo da medicina, onde a técnica permite obter dados ópticos em amostras cujo estudo convencional não se torna possível por causa do excesso de luz espalhada (por exemplo, amostras de material liofilizado). Além disso, diversos materiais biológicos sofrem alterações significativas quando solubilizados, o que dificulta a obtenção de dados ópticos por técnicas convencionais. A técnica fotoacústica possibilita a análise destes tecidos biológicos intactos, constituindo assim uma importante ferramenta de pesquisa e diagnóstico nas áreas de biologia e

medicina, como atestam diversos trabalhos (BALDERAS-LOPEZ et al., 1995; MESQUITA et al., 2006; ROSSI; BARJA, 2006). A técnica permite ainda analisar amostras opacas à radiação incidente. Neste caso, como o comprimento de difusão térmica na amostra varia conforme a frequência de modulação empregada, a técnica permite estudar o perfil de profundidade de uma amostra, o que é importante quando se deseja caracterizar amostras multicamadas como, por exemplo, a pele humana.

A técnica fotoacústica é um método não destrutivo que fornece informações tanto qualitativas como quantitativas sobre o material analisado. As propriedades de absorção das moléculas de um material são tradicionalmente obtidas analisando-se a transmissão ou a reflexão luminosa do mesmo, enquanto a fotoacústica baseia-se na absorção da luz incidente, podendo ser empregada na caracterização de materiais opacos e sistemas biológicos complexos (ROSENCWAIG, 1980).

O modelo mais aceito para explicar o efeito fotoacústico em sólidos é o modelo do pistão acústico ou Modelo de Rosencwaig-Gersho (ROSENCWAIG; GERSHO, 1976), que explica o chamado mecanismo de difusão térmica. Segundo este modelo, a luz modulada absorvida pela matéria é transformada em calor, gerando modulação de temperatura na interface entre a superfície do sólido e o gás adjacente. A modulação de temperatura gera expansão e contração da camada de ar fronteira à amostra; esta camada exerce o efeito de um pistão sobre o restante da coluna de gás na câmara fechada, produzindo ondas acústicas que podem ser detectadas por um transdutor de pressão.

O modelo considera que, na difusão térmica, a modulação da temperatura no material absorvedor e na camada de ar adjacente se comporta como uma onda evanescente espacial, atenuada exponencialmente com a distância em relação ao ponto de absorção da luz. Isto permite que se defina o chamado comprimento de difusão térmica e dois regimes térmicos: se o comprimento de difusão térmica for maior que a espessura do material, diz-se que o regime é termicamente fino; caso contrário, o regime é termicamente grosso. O comprimento de difusão térmica depende da frequência de modulação da luz, de modo que o aumento da frequência de modulação permite passar do regime termicamente fino ao termicamente grosso (BARJA, 1996).

As células fotoacústicas são geralmente projetadas de acordo com as aplicações e o tipo de amostra sob estudo. A célula pode ser de face única ou de duas faces (quando há janelas de vidro ou quartzo dos dois lados da célula). É no interior da célula - na câmara fotoacústica - que ocorre a geração da onda acústica, transmitida por um canal de ar até o microfone, e este gera uma diferença de potencial que é detectada apropriadamente, em geral com o auxílio de um amplificador síncrono. Durante as medições, a célula fotoacústica deve permanecer fechada para manter estável o sinal acústico dentro da câmara.

O presente trabalho teve como objetivo geral projetar, construir e caracterizar modelos de células fotoacústicas para cada um dos diversos tipos de amostras biológicas analisadas no Laboratório de Fotoacústica Aplicada a Sistemas Biológicos (FASBio/UNIVAP). Em particular, buscou-se desenvolver um protótipo de célula fotoacústica especialmente voltado para medidas na pele humana *in vivo*.

Materiais e Métodos

Montagem fotoacústica: No arranjo experimental utilizado para as medidas, a luz emitida por uma lâmpada halógena de Tungstênio (Xelux, 24V-250W) passava por um modulador mecânico (Stanford Research Systems - SRS, modelo SR540) conectado, juntamente com o microfone da célula fotoacústica, a um amplificador síncrono (SRS, modelo SR530), que assim recebia informações sobre a frequência de modulação e o sinal fotoacústico.

O amplificador síncrono utilizado permitiu registrar simultaneamente a amplitude e a fase do sinal fotoacústico, sendo conectado a um microcomputador para aquisição dos dados.

Microfone de eletreto: Todas as células fotoacústicas projetadas utilizam como detetor um microfone de eletreto comercial (Figura 1), composto basicamente por um diafragma de

eletreto metalizado (espessura de 10 μ m, filme metálico de 100nm) e uma placa de metal separada do diafragma por uma camada de ar (45 μ m). A abertura do microfone é um orifício circular com diâmetro aproximado de 3mm, e a câmara interna apresenta diâmetro de 7mm e espessura de 1mm.

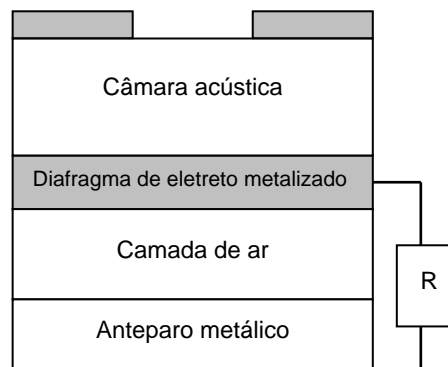


Figura 1- Diagrama do microfone de eletreto.

A membrana do eletreto apresenta uma densidade de carga superficial. A geração do sinal elétrico ocorre da seguinte forma: ao atingir a membrana, a onda sonora incidente provoca oscilações na espessura da camada de ar, mudando o campo elétrico e induzindo cargas nas camadas metálicas, o que gera uma diferença de potencial através do resistor R. Este tipo de microfone apresenta uma sensibilidade da ordem de 10mV/Pa, com a menor variação de pressão detectada correspondendo a uma oscilação de temperatura da ordem de 10⁻⁵K (MARQUEZINI et al., 1991).

A maior vantagem do microfone de eletreto é o baixo custo; uma desvantagem é a resposta não-plana em função da frequência de modulação. Deste modo, o microfone de eletreto é mais adequado para medidas em função do tempo (varredura temporal) ou do comprimento de onda (espectroscopia) do que para estudos em função da frequência de modulação. Para que seja utilizado em estudos de varredura em frequência, deve-se levar em conta a curva de resposta do microfone com a frequência.

Células fotoacústicas: As células desenvolvidas foram projetadas para medidas em amostras de pele, resinas odontológicas e folhas vegetais, podendo ser utilizadas também em outros materiais. Foram concebidas a partir de modelos preexistentes, sendo produzidas na Oficina Mecânica da UNIVAP, com material fornecido pela própria instituição. O principal material empregado foi o latão, tendo sido construído também um protótipo em alumínio, que no entanto apresentou baixa relação sinal/ruído. Após a confecção do

corpo, cada célula foi finalizada no Laboratório de Fotoacústica Aplicada a Sistemas Biológicos (FASBio), com instalação de vidro para a janela, microfone de eletreto, fiação e bateria.

A célula 1 (Figura 2) foi projetada a partir de um modelo confeccionado no INPE. Trata-se de uma célula de duas faces, com microfone interno. Uma das faces é fechada com lâmina de vidro (1mm de espessura) e a outra com a própria amostra ou com uma folha de alumínio; ambas as faces são planas. O comprimento da célula é de 35mm, o diâmetro da câmara fotoacústica é de 8mm e o diâmetro do duto interno é de 2mm.



Figura 2- Célula fotoacústica 1

A célula 2 (Figura 3) foi projetada e confeccionada a partir do desenho da célula 1, sendo efetuadas alterações (como o aumento do comprimento) com o intuito de facilitar a realização de medidas em pele humana *in vivo*. O comprimento da célula 2 é de 46mm, o diâmetro da câmara fotoacústica é de 8mm e o diâmetro do duto interno é 2mm. O material utilizado na fabricação do corpo da célula foi o alumínio.

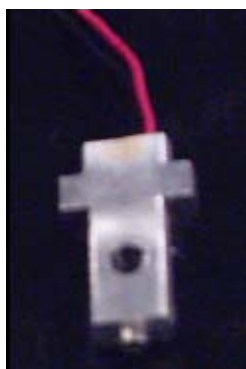


Figura 3- Célula fotoacústica 2

A célula 3 também foi projetada a partir do desenho da célula 1, sendo construída em latão. Novas alterações foram efetuadas para facilitar medidas em pele humana *in vivo*. Deste modo, a

célula 3 apresenta menor espessura em determinadas seções; conseqüentemente, é uma célula de menor massa. Além disso, o diâmetro do duto interno é de 1mm.



Figura 4- Célula fotoacústica 3

Quanto ao volume total de ar na câmara fotoacústica, temos:

Para a célula 1: 502mm^3 (câmara) + 35mm^3 (duto), totalizando 537mm^3 ;

Para a célula 2: 502mm^3 (câmara) + 53mm^3 (duto), totalizando 555mm^3 ;

Para a célula 3: 308mm^3 (câmara) + 9mm^3 (duto), totalizando 317mm^3 .

Foram projetadas posteriormente outras duas células (uma em alumínio e outra em latão), bastante parecidas com a célula 3, porém com um formato mais anatômico para medidas em pele *in vivo*. Essas células, que ainda precisam passar por testes experimentais, terão janelas de safira, material que apresenta alta transmissão de radiação ultravioleta.

Testes experimentais: Para avaliar o desempenho das células, foi efetuada uma medida-teste inicial numa amostra padrão de folha de alumínio, com espessura aproximada de $50\mu\text{m}$ e uma das faces pintada de preto para maximizar a absorção de luz. A freqüência de modulação utilizada foi de 17Hz.

Em seguida, foi medida a amplitude do sinal fotoacústico para amostras de resina odontológica em cada uma das células. A resina (3M Filtek™ Z100, cor A3) foi posicionada sobre uma folha de alumínio, no centro de um anel de PVC de 1mm de espessura (molde). A folha de alumínio foi fixada na face superior da célula com o auxílio de graxa de silicone. Para efeito de comparação do nível de sinal para cada célula, foi feita a média do sinal fotoacústico num intervalo de tempo de 60 segundos.

Os dados foram armazenados no computador e analisados através do programa Origin 7.5 (Microcal Software Inc.).

Resultados

No teste inicial (folha de alumínio), a amplitude do sinal fotoacústico ficou em torno de 2mV para a célula 1, atingindo 25mV para a célula 3.

A célula 2 registrou sinal pouco inferior ao obtido pela célula 1, porém apresentou relação sinal/ruído considerada baixa (nível de ruído superior a 10% do nível de sinal), razão pela qual seu uso foi descartado. A baixa relação sinal/ruído observada para a célula 2 pode ser atribuída ao material utilizado em sua construção e ao maior volume de ar na câmara fotoacústica.

As medidas em amostras de resina odontológica foram efetuadas utilizando-se as células 1 e 3. Para as medidas em resina, os resultados obtidos (valor médio \pm desvio padrão) foram os seguintes:

- Para a célula 1: (0,335 \pm 0,005) mV
- Para a célula 3: (3,03 \pm 0,02) mV

Discussão

Os testes em folha de alumínio e as medidas em amostras de resina odontológica permitiram observar a estabilidade do sinal e a boa relação sinal/ruído para ambas as células avaliadas.

Quanto à comparação entre as células 1 e 3, podemos afirmar que a redução do diâmetro do duto interno contribuiu para o melhor desempenho apresentado pela célula 3, com aumento de uma ordem de grandeza na amplitude do sinal fotoacústico e melhor relação sinal/ruído. A partir dos resultados obtidos, a célula 3 já foi utilizada em medidas fotoacústicas realizadas em pele humana *in vivo*, e dois novos modelos encontram-se atualmente em fase de testes.

Conclusão

As células fotoacústicas construídas em latão permitiram a obtenção de sinal fotoacústico confiável e vêm sendo empregadas em medidas com resinas e medidas em pele humana *in vivo* relacionadas a projetos do FASBio/UNIVAP. O material empregado (latão) pode ser considerado adequado, apresentando baixo custo e relação sinal/ruído superior à apresentada pelo modelo em alumínio.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos funcionários da Oficina Mecânica da UNIVAP, ao PIBIC-Univap e à Fapesp pelo apoio concedido (Projeto Jovem Pesquisador 04/02193-1).

Referências

- BARJA, P. R., "Estudo da Indução Fotossintética Através da Técnica Fotoacústica: Efeitos de Saturação e Fotoinibição", Dissertação de mestrado, IFGW - Unicamp, 1996.

- BALDERAS-LOPEZ, J. A. et al, "Photoacoustic measurements of transparent liquid samples: thermal effusivity", **Meas. Sci. Technol.**, V.6, 1995, pp. 1163-1168.

- MESQUITA, R.C., MANSANARES, A.M., SILVA, E.C., BARJA, P.R., VARGAS, H., MIRANDA, L.C.M., "Open Photoacoustic Cell: applications to plant photosynthesis studies", **Instr. Sci. Tech.**, V.34, 2006, pp.33-58.

- ROSSI, R. C. P.; BARJA, P. R., Estudo Fotoacústico das Propriedades de Penetração de Arnica Montana de Uso Tópico na Pele Humana. / *Environmental and Health World Congress*, Santos/SP, jul/2006, **I EHWC - Proceedings**, p.328-331, 2006.

- ROSENCWAIG, A., **Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy**, New York, John Wiley & Sons, 1980, pp. 219-231.

- ROSENCWAIG, A., GERSHO, A., "Theory of the photoacoustic effect with solids", **J. Appl. Phys.**, V.47, 1976, pp. 64-69.

- MARQUEZINI, M. V., CELLA, N., MANSANARES, A.M., VARGAS, H., MIRANDA, L. C. M., "Open Photoacoustic Cell spectroscopy", **Meas. Sci. Technol.**, V.2, 1991, pp. 396-401.

- PUC CETI, G., LEBLANC, R.M., "A comparative study on chromophore diffusion inside porous filters by pulsed photoacoustic spectroscopy", **J. Membrane Science**, V.119, 1996, pp. 213-228.