



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE FÍSICA
BACHARELADO EM FÍSICA MÉDICA

JOÃO PEDRO MARINS ASSUNÇÃO

**USO DO ESPALHAMENTO MIE DA LUZ PARA CONTAGEM DE
CÉLULAS ESPERMÁTICAS: PROJETO PILOTO EM BOVINOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

UBERLÂNDIA - MG
2023

JOÃO PEDRO MARINS ASSUNÇÃO

**USO DO ESPALHAMENTO MIE DA LUZ PARA CONTAGEM DE
CÉLULAS ESPERMÁTICAS: PROJETO PILOTO EM BOVINOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Bacharelado em Física Médica da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharelado.

Orientador: Prof. Dr. Adamo Ferreira do Monte
Universidade Federal de Uberlândia

UBERLÂNDIA - MG
2023

Dedico este trabalho aos meus pais, irmão e amigos por todo apoio e confiança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força e a capacidade de chegar até aqui. Aos meus pais, Júlio César e Débora, e ao meu irmão, Lucas, por todo amor, carinho e sacrifício.

À República Taverna, aos amigos que fiz ao longo da graduação, que foram a base da minha estadia em Uberlândia, que me abrigaram quando eu não tinha condições financeiras e não me deixaram desistir.

Ao meu orientador Prof. Dr. Adamo Ferreira do Monte, por todas as oportunidades, apoio e confiança depositada em mim para execução do trabalho.

Aos demais professores que me instruíram e me apoiaram em toda a graduação, em especial à Profa. Dra. Mariana Odashima, Prof. Dr. Wellington Akira, Prof. Dr. Ricardo Kagimura e Prof. Dr. Diego Merigue.

À Profa. Dra. Teresinha Inês de Assumpção pelo apoio e fornecimento das amostras utilizadas neste trabalho.

A todas e todos os colegas de laboratório, que me auxiliaram em todas as etapas.

À minha namorada Rafaela pelo amor e carinho nesta jornada.

Ao Instituto de Física e à UFU, pelo espaço físico e materiais necessários para execução deste trabalho.

RESUMO

A caracterização óptica de materiais biológicos é uma área de pesquisa que ganha cada vez mais relevância. Dentre suas diversas aplicações, há a contagem de células e cálculos de concentrações de cromóforos por meio do espalhamento Mie da luz e da absorção óptica. Embasado nos estudos de Prahl (1999), Doornbos et al. (1999), Dunn (2007), Wax e Backman (2010), dentre outros, buscou-se utilizar a teoria Mie para o espalhamento de luz e a técnica *Inverse Adding-Doubling* para modelagem e caracterização óptica de amostras de sêmen bovino e assim realizar uma estimativa de concentração espermática destas. O presente trabalho focou a análise das propriedades ópticas na região de eficiência máxima do espalhamento de luz para estas amostras, que apresentaram pico de espalhamento em $\lambda = 452,1\text{nm}$, permitindo-a estimar a concentração por meio do cálculo da fração de volume dos espermatozoides presentes nas amostras estudadas.

Palavras-chave: Espalhamento Mie. Coeficiente de Espalhamento. Sêmen Bovino. Concentração Espermática.

ABSTRACT

The optical characterization of biological materials is an increasingly relevant area of research. Among its various applications, there is the counting of cells and calculation of chromophore concentrations through Mie scattering of light and optical absorption. Based on the studies done by Prahl (1999), Doornbos et al. (1999), Dunn (2007), Wax e Backman (2010), among others, we sought to utilize Mie theory for light scattering and the Inverse Adding-Doubling technique for modeling and optical characterization of bovine semen samples, in order to estimate their sperm concentration. This study focused on the analysis of optical properties in the region of maximum scattering efficiency for these samples, which exhibited a scattering peak at $\lambda = 452.1\text{nm}$, allowing the estimation of concentration through the calculation of the volume fraction of spermatozoa present in the studied samples.

Keywords: Mie Scattering. Scattering Coefficient. Bovine Semen. Sperm Concentration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração da seção de choque efetiva para o espalhamento e área egométrica real do aente espalhador.	15
Figura 2 – Aparato experimental utilizado para medidas de refletância e transmitância.	19
Figura 3 – Esquema para medidas de transmitância em A e refletância em B.	20
Figura 4 – Gráfico do coeficiente de espalhamento reduzido em função do comprimento de onda entre 400 e 700nm.	21
Figura 5 – Resultado experimental com foco na região de eficiência máxima do espalhamento.	22
Figura 6 – Simulação para fração de volume obtida para amostra S_1 . Em vermelho, as setas indicam os parâmetros de entrada, que foram utilizados em todo o trabalho. A seta na cor preta indica o valor de μ'_s para $\lambda = 452\text{nm}$. A seta em laranja indica o valor da concentração em mm^{-3}	23

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Resultados experimentais de μ'_s e determinações das frações de volume e as concentrações associadas. 22
- Tabela 2 – Tabela comparativa dos valores de μ'_s obtidos experimentalmente com os valores de μ'_s obtidos com o simulador, para cada fração de volume obtido experimentalmente. 23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IAD *Inverse adding-doubling*

LISTA DE SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
ρ	Densidade de volume
μ'_s	Coefficiente de espalhamento reduzido
μ_s	Coefficiente de espalhamento
λ	Comprimento de onda
f_v	Fração de volume
σ_s	Seção de choque efetiva
Q_s	Eficiência de espalhamento
L	Livre caminho médio
a	Albedo
τ	Espessura óptica
d	Espessura da amostra
n_m	Índice de refração do meio
n_c	Índice de refração da cabeça do espermatozóide bovino

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
SUMÁRIO	11
1 – INTRODUÇÃO	12
2 – Objetivos	14
2.1 Objetivos específicos	14
3 – REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Teoria de Mie para o Espalhamento	15
3.2 Sobre o <i>Inverse adding doubling</i>	17
4 – Materiais e Métodos	19
5 – ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	21
6 – CONCLUSÃO	25
Referências	26

1 INTRODUÇÃO

A caracterização óptica de materiais biológicos é uma área de pesquisa em constante evolução. Um dos principais métodos utilizados para estudar esses materiais é o espalhamento de luz. Este método é baseado na interação da luz com as partículas presentes na amostra, permitindo a análise da sua composição e estrutura (OSHINA; SPIGULIS, 2021).

A teoria de Mie permite calcular o espalhamento de luz por partículas esféricas, o que é altamente relevante para a contagem de células, uma vez que muitas células biológicas, como células sanguíneas e células bacterianas, têm uma forma aproximadamente esférica (WAX; BACKMAN, 2010). Ao considerar a teoria de Mie, é possível obter informações precisas sobre as características de espalhamento da luz pelas células, como o padrão angular de espalhamento e a intensidade do sinal espalhado. Esses dados podem ser analisados para identificar e contar as células com alta precisão (WAX; BACKMAN, 2010; PRAHL, 1999).

Além disso, a teoria de Mie oferece vantagens como ser aplicável em uma ampla faixa de tamanhos de partículas, ser não invasiva, e ser realizada em tempo real. A teoria de Mie permite analisar o espalhamento de luz por partículas em diferentes intervalos de tamanho, desde partículas pequenas, como bactérias, até partículas maiores, como células sanguíneas e espermáticas. Isso possibilita uma abordagem flexível para a contagem de células, adaptando-se a diferentes tipos de células e permitindo a análise simultânea de várias populações celulares em uma amostra (MOURANT et al., 1999).

O espalhamento de luz pode ser usado para determinar a concentração e tamanho de partículas em solução, como células sanguíneas e bactérias. Através da medição do coeficiente de espalhamento e do coeficiente de absorção da amostra, é possível obter informações sobre a densidade e tamanho das partículas presentes (PRAHL, 1999). Além disso, o espalhamento de luz também pode ser utilizado para estudar a estrutura e propriedades ópticas de tecidos biológicos. Através de técnicas como a espectroscopia de refletância difusa, é possível obter informações sobre a composição dos tecidos e o conteúdo de cromóforos, como a melanina e a hemoglobina (DOORNBOS et al., 1999).

Para a modelagem do espalhamento de luz em células biológicas, é possível utilizar modelos matemáticos utilizando a teoria de Mie, que considera as células como esferas homogêneas, com índice de refração fixo (DUNN, 2007). Apesar dos avanços na caracterização óptica de materiais biológicos, ainda existem desafios a serem superados. Um dos principais desafios é a correção das medições para os efeitos de espalhamento múltiplo, que podem distorcer as informações obtidas. Além disso, a interpretação dos resultados pode ser complicada devido à complexidade dos materiais biológicos e das interações envolvidas (OSHINA; SPIGULIS, 2021).

No entanto, mesmo com esses desafios, a caracterização óptica de materiais biológicos continua sendo uma área de grande interesse e importância na pesquisa biomédica. O uso

de técnicas de espalhamento de luz, combinado com outras técnicas ópticas, pode fornecer informações valiosas sobre a composição, estrutura e propriedades ópticas dos materiais biológicos, contribuindo para avanços em diagnóstico, terapia e pesquisa (DOORNBOS et al., 1999).

A contagem de células e partículas é uma técnica fundamental em muitas áreas de pesquisa, incluindo biologia, medicina, ecologia e engenharia. A contagem precisa de espermatozoides é fundamental na avaliação da fertilidade masculina e para a realização de procedimentos de reprodução assistida, como a inseminação intrauterina e a fertilização in vitro. Vários métodos de contagem de espermatozoides têm sido desenvolvidos ao longo dos anos, cada um com suas próprias vantagens e desvantagens (BRITO et al., 2016).

Os métodos manuais de contagem de espermatozoides incluem a contagem visual em microscopia óptica usando câmaras de contagem como a câmara de Neubauer (BRITO et al., 2016) e o método Makler (MAYA et al., 2008), que utiliza uma câmara de contagem descartável com uma grade de 10x10 quadrados. Esses métodos manuais são amplamente utilizados, porém podem ser tediosos e consomem tempo, além de estarem sujeitos a variações no julgamento subjetivo do observador e na diluição da amostra.

Além dos métodos manuais, há também os computacionais. Os estudos de Brito et al. (2016) e Prathalingam et al. (2006) trazem um comparativo de diferentes métodos de contagem de células e cálculos de concentrações espermáticas. As técnicas mais avançadas para determinação da concentração incluem análise de imagens, citometria de fluxo e análises com espectrofotômetros.

Observando os métodos de cálculo de concentrações, vemos o uso de algumas técnicas ópticas para tal. Um dos métodos de caracterização óptica é o método *inverse adding doubling* (IAD) (PRAHL, 1999). Ele é uma técnica numérica que tem sido amplamente utilizada para caracterização óptica de partículas e tecidos biológicos, e utiliza a teoria de Mie para determinação dos parâmetros ópticos de interesse. O IAD é baseado na análise da luz que é espalhada ou absorvida pelas amostras biológicas, permitindo a determinação das propriedades ópticas dessas amostras. Essas propriedades, por sua vez, podem ser usadas para calcular a concentração de células ou partículas presentes nas amostras, uma vez que as mesmas estão relacionadas à distribuição e concentração de cromóforos e agentes espalhadores (PRAHL, 1999; CORREIA; HANSELAER; MEURET, 2019). Neste trabalho, objetivou-se utilizar a teoria do espalhamento Mie da luz para realizar a caracterização óptica de amostras de sêmen bovino e, a partir disso, estimar a concentração espermática das mesmas.

2 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral realizar a caracterização óptica de três amostras de sêmen bovino, com concentrações espermáticas desconhecidas. A partir disso, utilizando a teoria de Mie para o espalhamento de partículas esféricas, buscou-se realizar a contagem de células espermáticas.

2.1 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral do estudo foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Determinar as propriedades ópticas das amostras através do método *Inverse Adding Doubling* (IAD);
- Estabelecer uma correlação entre as características ópticas obtidas e a concentração espermática real das amostras de sêmen bovino;
- Avaliar a influência do comprimento de onda da luz incidente, na precisão da contagem de células espermáticas utilizando a teoria de Mie;
- Propor melhorias ou otimizações na técnica de contagem de células espermáticas utilizando a teoria de Mie, visando aumentar a precisão e a eficiência do método.

3 REVISÃO DE LITERATURA

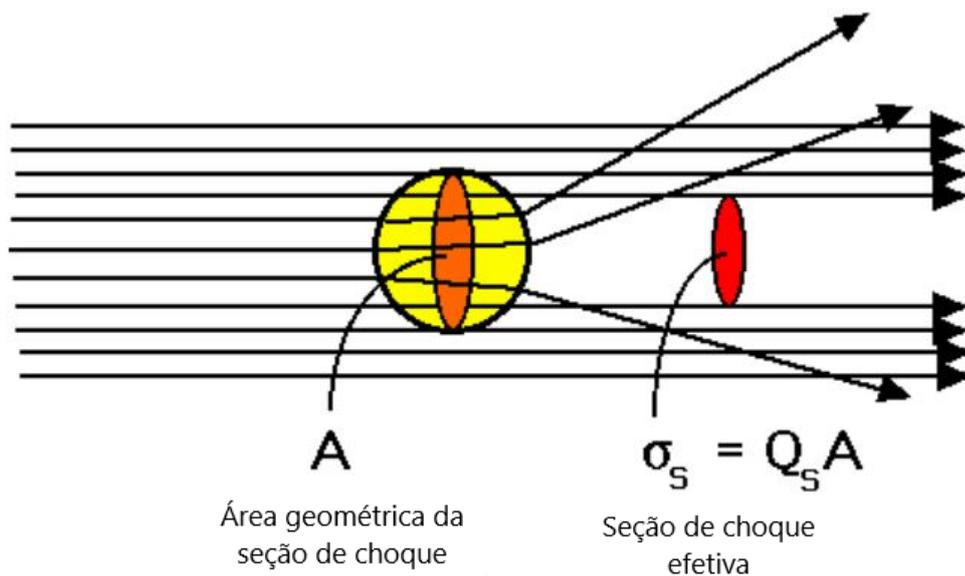
3.1 Teoria de Mie para o Espalhamento

Em 1908, Gustav Mie publicou um estudo em que propôs a solução do espalhamento da luz para partículas esféricas regulares, de qualquer tamanho (REIS, 2019). Neste caso, partículas se referem a um agregado de componentes que constituem uma região com índice de refração n_p , diferente do índice de refração do meio que o cerca, n_m . A solução clássica deste problema, proposta por Mie é descrita por dois parâmetros:

- n_r : a razão entre o índice de refração das partículas n_p e do meio n_m , que determina a magnitude da diferença entre os índices de refração;
- x : um parâmetro de tamanho da partícula com relação ao comprimento de onda da luz incidente, definido como a razão do comprimento da circunferência da esfera (partícula espalhadora, de raio a) e do comprimento de onda de luz no meio λ/n_m (PRAHL, 1999):

$$x = 2\pi a / (\lambda/n_m) \quad (1)$$

Figura 1 – Ilustração da seção de choque efetiva para o espalhamento e área geométrica real do aente espalhador.



Fonte: Adaptado de Prahl e Jacques (1998)

A teoria de Mie com este cálculo fornece algo chamado eficiência de espalhamento (Q_s), que relaciona a área da seção de choque efetiva do espalhamento, definida como σ_s , com a área real geométrica da partícula espalhadora, $A = \pi a^2$ (PRAHL, 1999). A Figura 1 ilustra as grandezas presentes na equação 2

$$\sigma_s = Q_s A \quad (2)$$

Assim, o coeficiente de espalhamento μ_s pode ser obtido pelo produto da densidade de volume das partículas espalhadoras, ρ_s e da seção de choque efetiva de espalhamento, σ_s :

$$\mu_s = \rho_s \cdot \sigma_s \quad (3)$$

Entretanto, é possível definir também a eficiência do espalhamento pelo pico de espalhamento (onde a eficiência é máxima). Neste caso, temos a área real geométrica da partícula espalhadora se aproximando da área de seção de choque efetiva do espalhamento, e podemos definir o coeficiente de espalhamento (no pico de espalhamento) em termos da área geométrica real do espalhador e da densidade de volume das partículas espalhadoras (PRAHL, 1999):

$$\mu_s = A \rho_s \quad (4)$$

Por outro lado, a densidade de volume das partículas espalhadoras pode ser escrita como:

$$\rho_s = \frac{f_v}{V_e} \quad (5)$$

Onde f_v é a fração de volume das partículas na amostra (volume de esferas por mm^3) e V_e é o volume da partícula espalhadora. Como estamos tratando estas partículas como esferas, podemos reescrever a Equação 5 como

$$\rho_s = \frac{f_v}{(4/3)\pi a^3} \quad (6)$$

Onde a é o raio da esfera espalhadora. Observemos que f_v é um parâmetro de concentração destas partículas na amostra, uma vez que retrata o volume das esferas espalhadoras contida em 1 mm^3 da amostra.

Ainda, é possível definir o coeficiente de espalhamento reduzido μ'_s , que incorpora o coeficiente de espalhamento e o fator de anisotropia g do meio que, em breve definição, seria a medida das direções possíveis que um fóton pode percorrer após um único espalhamento. Define-se o coeficiente de espalhamento reduzido (REIS, 2019):

$$\mu'_s = \mu_s(1 - g) \quad (7)$$

Por fim, relacionando as Equações 6, 7 e 4, podemos escrever a fração de volume em termos do coeficiente de espalhamento reduzido da forma:

$$f_v = (4/3)\pi a^3 \frac{\mu'_s}{A(1 - g)} \quad (8)$$

Neste sentido, μ'_s representa a probabilidade de um fóton ser espalhado de forma isotrópica no meio. Ele é particularmente útil quando se está em um meio em que o espalhamento prevalece sobre a absorção.

Outra variável óptica que a teoria de Mie permite determinar por estes parâmetros é o livre caminho médio, que representa a distância média percorrida pela luz antes de ser espalhada ou absorvida. O comprimento de transporte de luz (L) (VO-DINH, 2003; PRAHL, 1999) pode ser calculado como:

$$L = \frac{1}{\mu_a + \mu_s} \quad (9)$$

Quanto maior o valor de L , maior será a profundidade em que a luz penetra no meio antes de ser atenuada. Esse parâmetro é fundamental para entender a interação da luz com o meio turbido e pode influenciar diversos fenômenos, como a propagação da luz em tecidos biológicos. Assim, os coeficientes de absorção e espalhamento de um meio turbido fornecem informações cruciais para o cálculo do albedo e da profundidade de penetração da luz. Esses parâmetros são fundamentais para entender a interação da luz com o meio e podem ser aplicados em uma ampla gama de áreas da Física aplicada à Biologia (PRAHL, 1999).

3.2 Sobre o *Inverse adding doubling*

O método IAD é utilizado para resolver a equação de transferência radiativa em um meio turbido, o que permite a determinação das propriedades ópticas do meio (PRAHL, 1999). Ele foi implementado e disponibilizado por Scott Prahl, permitindo calcular os parâmetros de μ_a e μ'_s a partir das medidas de refletância (R) e transmitância (T) de amostras túrbidas. Além destes parâmetros, o IAD proporciona outras variáveis de saída que permitem recuperar os coeficientes μ_a e μ_s de uma fatia da amostra analisada, que são o albedo (a) e espessura óptica (τ).

O albedo representa a razão entre o coeficiente de espalhamento e o coeficiente de transporte (μ_{tr}), que é a soma de μ_a e μ_s (REIS, 2019), e representa o decréscimo de energia por unidade de área da luz incidente, de forma que:

$$a = \frac{\mu_s}{\mu_{tr}} = \frac{\mu_s}{\mu_a + \mu_s} \quad (10)$$

A espessura óptica é dada pelo produto da espessura da amostra investigada (d) e a soma entre os coeficientes de absorção e espalhamento da mesma, de modo que

$$\tau = d \cdot (\mu_a + \mu_s) \quad (11)$$

Assim, podemos relacionar as Equações 10 e 11 (REIS, 2019; WELCH; GEMERT, 2011; PRAHL, 1999) e reescrever os coeficientes de absorção e espalhamento em função do albedo, da espessura óptica e da espessura da amostra da forma:

$$\mu_s = \frac{a \cdot \tau}{d} \quad (12)$$

$$\mu_a = \frac{\tau \cdot (1 - a)}{d} \quad (13)$$

Tais cálculos fornecem informações valiosas e acerca das propriedades ópticas de meios túrbidos, e podem ser ajustados para os casos em que o espalhamento prevalece sobre a absorção ou o contrário. Cada meio terá sua particularidade, e o método IAD permite uma análise detalhada do mesmo, contribuindo para o avanço da pesquisa na área de caracterização óptica de materiais e amostras, sejam eles biológicos ou sintéticos.

A literatura científica oferece uma variedade de estudos e referências que detalham o método IAD e suas aplicações na determinação das propriedades ópticas de meios turbidos. Por exemplo, Prahl (1999) disponibiliza tabulações do coeficiente de extinção molar da hemoglobina em água, um componente relevante em muitas amostras biológicas. Além disso, Reis (2019) aborda a determinação de parâmetros ópticos em meios turbidos por espectroscopia de refletância difusa, apresentando uma aplicação específica para materiais biológicos. Outro estudo de interesse é o de Ferrara et al. (2015), que explora a determinação do índice de refração de meios turbidos usando o método IAD em conjunto com medidas de refletância difusa.

O método é baseado na adição e subtração de soluções analíticas da equação de transferência radiativa, permitindo a determinação dos coeficientes de absorção e espalhamento reduzido da amostra analisada, com base na intensidade da luz que é transmitida, refletida ou absorvida por ela. Para rodar o código, são necessários, como parâmetros de entrada, os dados de refletância e transmitância, a calibração da lâmpada, o fator de anisotropia (g) da amostra, sua espessura, e seu índice de refração (REIS, 2019).

A espessura a ser adotada dependerá da amostra e do tipo de material utilizado. Para amostras líquidas, é recomendada análise em cubetas de 1mm de espessura (PRAHL, 1999). Com relação ao índice de refração do meio, ele pode ser determinado experimentalmente ou obtido através de estudos literários.

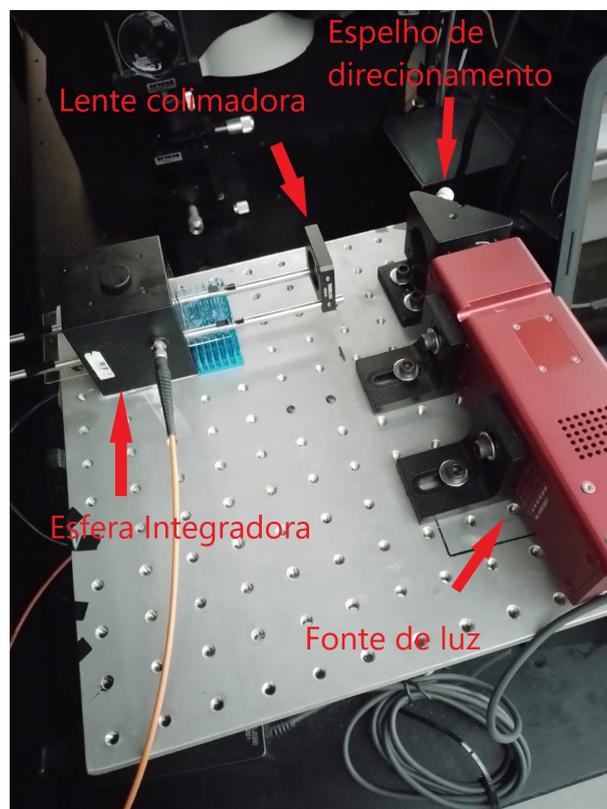
Diferentes autores realizaram a análise morfológica destes espermatozoides. Dentre estas análises, foi determinado o diâmetro médio destas cabeças de aproximadamente $5\mu\text{m}$, com índices de refração da cabeça do espermatozóide e do líquido seminal (meio), respectivamente, $n_c = 1,4$ e $n_m = 1.35$ (JIANG et al., 2019). Com isso, buscou-se relacionar as Equações 4 e 6 para determinar as concentrações espermáticas das amostras analisadas.

4 Materiais e Métodos

Neste trabalho, a análise das propriedades ópticas se deu por meio de uma esfera integradora, para medições de transmitância e refletância das amostras de sêmen bovino, e o aparato experimental pode ser visto na Figura 2. As amostras foram cedidas pela Profa.Dra Theresinha Inês de Assumpção, professora da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Para análise pela esfera integradora foram utilizados:

- Esfera integradora, com diâmetro de 2" contendo quatro portas, fabricada pela empresa Thorlabs;
- Cubeta de vidro de 1mm de espessura;
- Três amostras de sêmen bovino, com concentrações desconhecidas;
- Fonte de luz SLS201L/M, com espectro de 360 - 2600 nm, da fabricante ThorLabs;
- *Software* para aquisição dos dados da Esfera integradora, SpectraSuite;
- Espectrômetro *Ocean Optics* HR400 (200-1100nm)
- Seringa de 1mL com agulha.

Figura 2 – Aparato experimental utilizado para medidas de refletância e transmitância.



Fonte: Autoria própria.

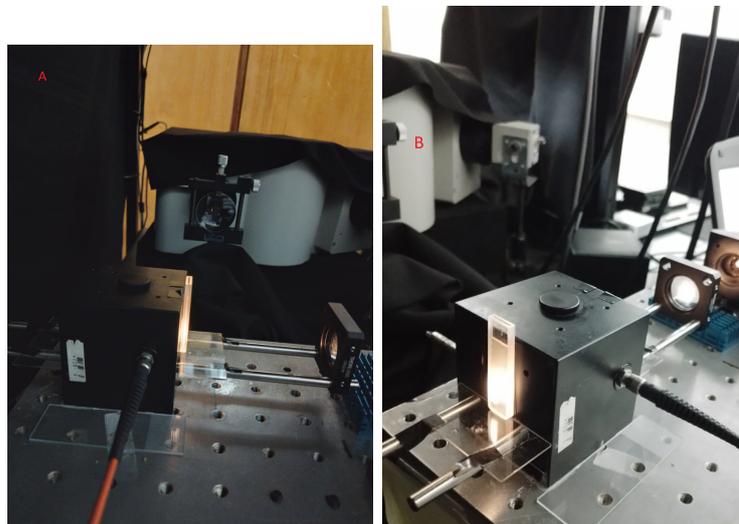
Para a realização do experimento, foram utilizadas duas portas da esfera integradora. Na Figura 3 A, temos o posicionamento da amostra à frente da luz colimada, utilizada para

captar os dados de transmitância da amostra. Na Figura 3 B temos a medida da refletância da amostra, posicionada na porta oposta à primeira. Na Figura 2 é mostrado o posicionamento da lâmpada e da esfera, tendo o espelho para direcionamento do feixe da fonte para a lente colimadora e desta para a esfera integradora. Estas medidas foram realizadas para todas as amostras de sêmen bovino, que foram inseridas na cubeta pela seringa, tendo sido injetado 0,5mL para cada amostra. A esfera foi submetida a um procedimento de obstrução, no qual sua entrada foi coberta por panos escuros, afim de evitar a penetração de qualquer luminação externa, garantindo que a intensidade de luz medida pela esfera fosse proveniente somente da lâmpada utilizada no experimento.

Ainda, para o processamento pelo IAD, foi necessário calibrar a esfera para o espectro de referência da lâmpada, o que foi realizado da seguinte forma: primeiro, tampando a entrada da esfera com panos pretos, impedindo a entrada de qualquer luz externa. No *software* SpectraSuite foi implementada a função "*Dark*", o que exclui qualquer componente de insentidade luminosa que não seja da fonte utilizada no experimento. Após, foi implementada a função "*menos Dark*", e retirado o pano, com a acubeta (vazia) posicionada à frente da porta de entrada, como ilustrado na Figura 3 A, tendo assim somente o espectro da lâmpada medido pelo SpectraSuite.

De posse destes dados, foi rodado o código IAD, através do código em MATLAB, para cada uma das amostras para obtenção dos espectros de μ_a e μ'_s em função dos comprimentos de onda. O índice de refração utilizado foi pego da literatura, descrito no Capítulo 1.

Figura 3 – Esquema para medidas de transmitância em A e refletância em B.



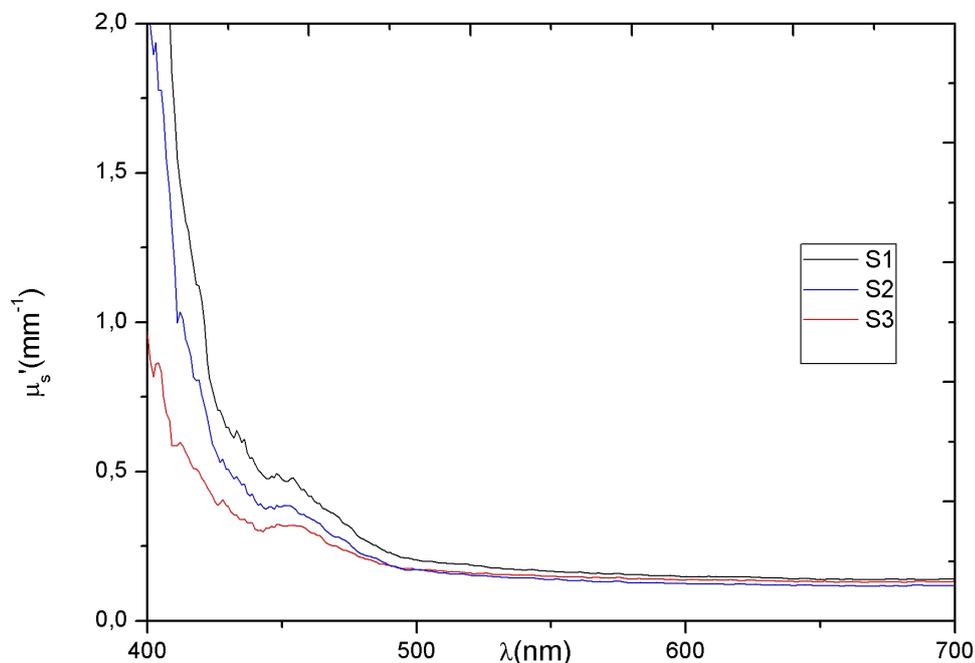
Fonte: Autoria própria.

5 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Após os procedimentos descritos no capítulo 4 foi rodado o código IAD para as três amostras. Como um dos parâmetros de entrada era o índice de refração, foi adotado o índice de refração do meio descrito no Capítulo 2. Vale ressaltar que, no código utilizado, o fator de anisotropia é fixo de 0,9, por se tratar de uma amostra biológica (PRAHL, 1999).

Posteriormente a estes processamentos, foi construído o gráfico presente na Figura 4, utilizando o *software* OriginPro 8. É possível observar neste gráfico que a análise em todo espectro se torna complexa, uma vez que há informações acerca de todo agente espalhador da amostra. No gráfico, estão presentes informações com relação ao espalhamento proveniente pela cabeça e cauda do espermatozóide. A queda do valor do coeficiente de espalhamento indica uma maior dispersão dos tamanhos dos agentes espalhadores, enquanto que no pico ($\lambda = 450\text{nm}$), observa-se a região onde essa dispersão é menor, indicando que as partículas possuem tamanhos mais uniformes, com relação a este comprimento de onda. Neste sentido, esta região indica o espalhamento da luz proveniente pela cabeça do espermatozoide, uma vez que, morfologicamente, é sua estrutura mais uniforme.

Figura 4 – Gráfico do coeficiente de espalhamento reduzido em função do comprimento de onda entre 400 e 700nm.

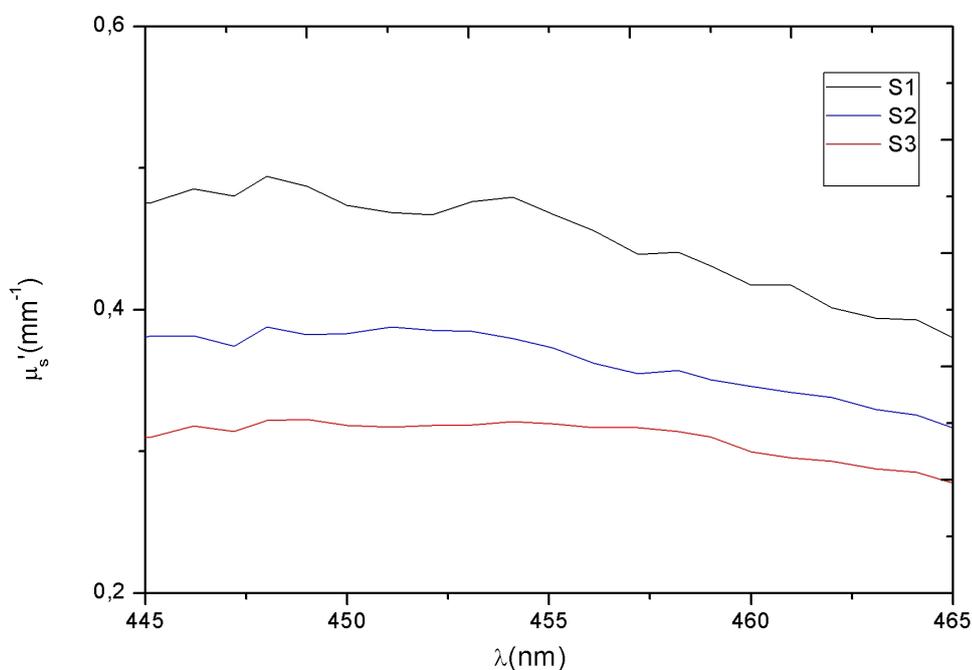


Fonte: Autoria própria.

Sendo assim, a análise se restringiu à região onde a eficiência do espalhamento é máxima: entre 445 e 465nm. Esta região pode ser vista na Figura 5, adotando o comprimento de onda $\lambda = 452,1\text{ nm}$ como comprimento de onda com eficiência máxima por ser a região

mais constante do pico de espalhamento. Com o auxílio do Origin, utilizou-se o leitor de dados para encontrar os valores de comprimento de onda em que ocorreu a eficiência máxima do espalhamento e os respectivos valores de coeficientes de espalhamento reduzido.

Figura 5 – Resultado experimental com foco na região de eficiência máxima do espalhamento.



Fonte: Autoria própria.

Observa-se ainda com este zoom um alargamento no pico. Isso se deve ao fato de haver dispersão nos tamanhos dos agentes espalhadores, podendo indicar também o espalhamento proveniente por caudas que estejam enroladas e próximas às cabeças dos espermatozoides, ou até mesmo uma variação no diâmetro das mesmas.

De posse destes valores, e utilizando a Equação 8 foram obtidos os valores das frações de volume e estimativa de concentrações de espalhadores presentes nas três amostras utilizadas (assumindo o diâmetro de $5\mu\text{m}$ para $\lambda = 450\text{ nm}$), e que podem ser vistos na Tabela 1. Ainda, é importante ressaltar que o processamento pelo IAD nos forneceu o coeficiente de espalhamento reduzido e, por isso, utilizada a relação da Equação 7

Tabela 1 – Resultados experimentais de μ'_s e determinações das frações de volume e as concentrações associadas.

Amostras	$\lambda(\text{nm})$	$\mu'_s(\text{mm}^{-1})$	f_v	Concentração (mm^{-3})
S ₁	452,1	0,4671	0,12456	1.7×10^6
S ₂	452,1	0,3853	0,10275	1.4×10^6
S ₃	452,1	0,3184	0,08491	1.3×10^6

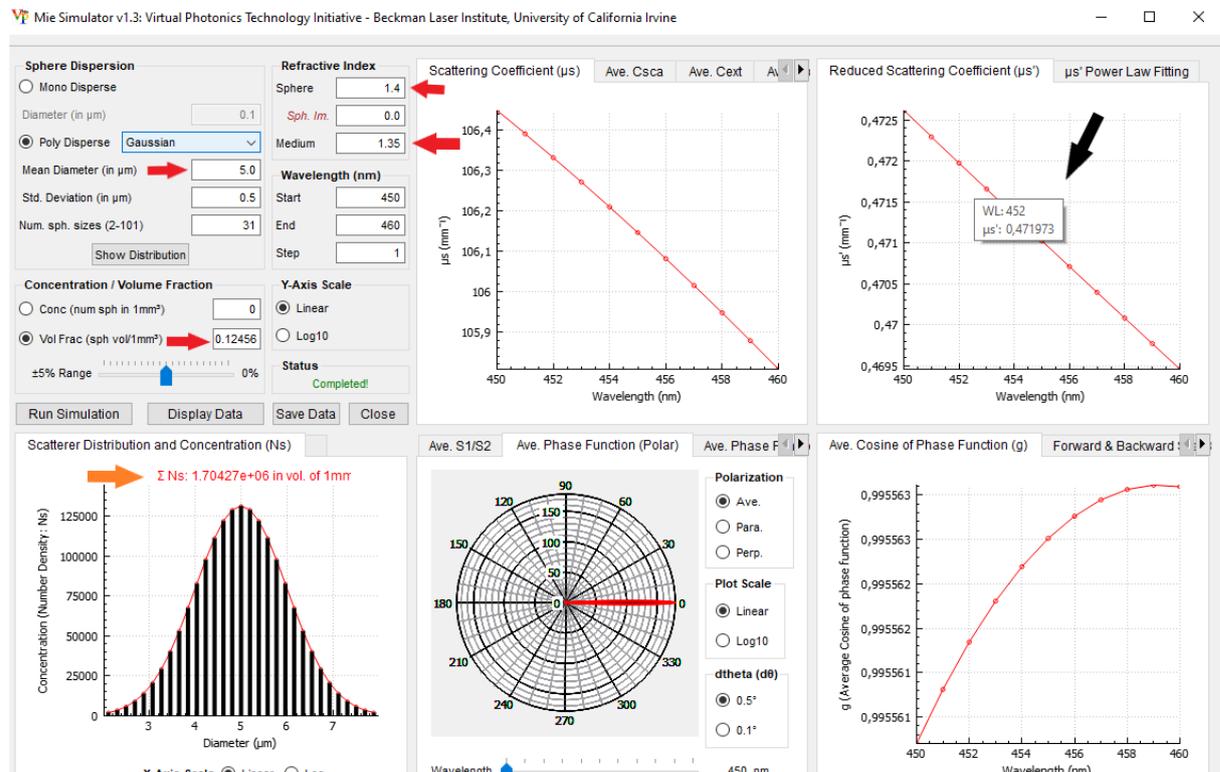
Afim de verificar a confiabilidade destes resultados, foi utilizado um simulador de espalhamento Mie desenvolvido pela *Virtual Photonics Technology - Beckman Laser Institute*.

Este simulador foi adotado em razão dos parâmetros de entrada serem compatíveis com os dados que possuímos para este trabalho, e pela possibilidade de utilizar a concentração dada pela fração de volume (que foi determinada experimentalmente). A Figura 6 é um *print* da simulação rodada para a amostra S_1 , onde as setas vermelhas indicam os parâmetros de entrada, a seta preta indica o valor de μ'_s para $\lambda = 452$ nm e a seta laranja a concentração dada em função da fração de volume inserida. Esta simulação foi realizada pelos valores das frações de volume obtidos experimentalmente para as três amostras e o comparativo entre os valores de μ'_s experimentais e simulados estão presentes na Tabela 2.

Tabela 2 – Tabela comparativa dos valores de μ'_s obtidos experimentalmente com os valores de μ'_s obtidos com o simulador, para cada fração de volume obtido experimentalmente.

Amostras	μ'_s (mm ⁻¹) (Experimental)	f_v	μ'_s (mm ⁻¹) (Simulador)
S_1	0,4671	0,12456	0,4719
S_2	0,3853	0,10275	0,3893
S_3	0,3184	0,08491	0,3347

Figura 6 – Simulação para fração de volume obtida para amostra S_1 . Em vermelho, as setas indicam os parâmetros de entrada, que foram utilizados em todo o trabalho. A seta na cor preta indica o valor de μ'_s para $\lambda = 452$ nm. A seta em laranja indica o valor da concentração em mm^{-3} .



Fonte: Autoria própria.

Observamos que os valores de μ'_s obtidos experimentalmente e através do simulador se encontram próximos, havendo divergências no segundo algarismo significativo para as amostras

S_1 e S_3 , e divergência no terceiro algarismo significativo para a amostra S_2 . O fato de os valores ainda estarem próximos nos permite inferir que a caracterização óptica de sêmen bovino pode ser realizada na região do azul, em $\lambda = 452\text{nm}$. As diferenças observadas podem ser explicadas pela série de aproximações realizadas para realização do experimento, tais como o diâmetro médio das partículas e os índices de refração, que foram adotados através da revisão de estudos bibliográficos.

Neste sentido, percebe-se a necessidade de realizar novos estudos acerca do espalhamento de luz pelo sêmen bovino, para uma melhor caracterização óptica do mesmo, e refinamento experimental para o uso destas propriedades para a determinação da concentração espermática. Ainda assim, os resultados obtidos se mostram promissores, e pode servir como uma base para futuros estudos nesta área.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo abordou um método de caracterização óptica e contagem de espermatozoides de amostras de sêmen bovino, utilizando a teoria de espalhamento Mie. Os resultados obtidos se mostram satisfatórios quando a análise se restringe a um comprimento de onda específico, onde ocorre a eficiência de espalhamento máxima. Ainda é possível melhorar os resultados experimentais com outros procedimentos, como: determinação experimental do índice de refração das amostras obtidas, e do diâmetro médio das cabeças dos espermatozoides. Ambos os fatores são fundamentais como parâmetros de entrada para o processamento dos dados de transmitância e refletância pelo IAD e alteram significativamente os valores dos coeficientes de espalhamento na amostra. A forma encontrada para minimizar estas diferenças foi restringir a análise na região do pico de espalhamento e se mostrou experimentalmente viável.

Definir o comprimento de onda onde a eficiência do espalhamento é máxima possibilitou uma estimativa para o cálculo da concentração. Esta técnica pode ser útil em futuros estudos acerca de caracterização óptica para sêmens bovinos e, talvez, para humanos, permitindo um novo método de quantificação relativamente rápido.

Em resumo, a técnica de espalhamento Mie de luz para sêmen bovino se apresenta como um método para contagem de células espermáticas em tempo real. Embora possua algumas limitações, ela se mostrou promissora em diferentes tipos de amostras. Com mais estudos e pesquisa nesta área o uso do espalhamento Mie de luz mostra potencial para se tornar uma ferramenta valiosa na contagem de células espermáticas. Futuramente, o uso do espalhamento Mie para esta finalidade pode, talvez, se tornar útil para amostras de sêmen humano.

Referências

- BRITO, L. F. et al. Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. **Theriogenology - Animal Reproduction**, v. 85, n. 9, p. 1–20, 2016. Citado na página 13.
- CORREIA, A.; HANSELAER, P.; MEURET, Y. **Accurate and robust characterization of volume scattering materials using the intensity-based inverse adding-doubling method**. 2019. Citado na página 13.
- DOORNBOS, R. M. P. et al. The determination of in vivo human tissue optical properties and absolute chromophore concentrations using spatially resolved steady-state diffuse reflectance spectroscopy. **Physics in Medicine Biology**, v. 44, n. 4, p. 1–16, 1999. Citado 4 vezes nas páginas 5, 6, 12 e 13.
- DUNN, A. k. Modeling of light scattering of inhomogeneous cells. **Optics of Biological Particles**, v. 238, n. sn, p. 9–10, 2007. Citado 3 vezes nas páginas 5, 6 e 12.
- FERRARA, M. A. et al. Label-free imaging and biochemical characterization of bovine sperm cells. **Biosensors**, v. 5, p. 141–157, 2015. Citado na página 18.
- JIANG, H. et al. Reconstruction of bovine spermatozoa substances distribution and morphological differences between holstein and korean native cattle using threedimensional refractive index tomography. **Nature - Scientific Reports**, v. 9, n. 8774, p. 1–12, 2019. Citado na página 18.
- MAYA, W. C. et al. Comparacion de la concentracion espermatica usando la camara de makler y la camara de neubauer. **Actas Urolgicas Españolas**, v. 32, n. 4, p. 1–3, 2008. Citado na página 13.
- MOURANT, J. R. et al. Non-invasive measurement of chemotherapy drug concentrations in tissue: preliminary demonstrations of in vivo measurements. **Physics in Medicine and Biology**, v. 44, n. 5, p. 1397–1417, 1999. Citado na página 12.
- OSHINA, I.; SPIGULIS, J. Beer–lambert law for optical tissue diagnostics: current state of the art and the main limitations. **Journal of Biomedical Optics**, v. 26, n. 10, p. 1–17, 2021. Citado na página 12.
- PRAHL, S. **Optical Property Measurements using the Inverse Adding-Doubling Program**. Portland, 1999. 53 p. Citado 9 vezes nas páginas 5, 6, 12, 13, 15, 16, 17, 18 e 21.
- PRAHL, S.; JACQUES, S. L. **Definition and Units of Scattering Coefficient**. [S.l.], 1998. Disponível em: <<http://abntex2.googlecode.com/>>. Acesso em: 03 de maio de 2023. Citado na página 15.
- PRATHALINGAM, N. S. et al. The precision and accuracy of six different methods to determine sperm concentration. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 2, p. 257–262, 2006. Citado na página 13.
- REIS, A. F. dos. **Estudo de fantomas e tecidos biologicos por meio de mapas de absorção e espalhamento optico obtidos pela tecnica de image no dominio da frequência espacial**. Julho, 2019. 167 p. Tese (Doutorado em Fisica) — Instituto de Fisica, Universidade Federal Uberlândia, Uberlândia, 2019. Citado 4 vezes nas páginas 15, 16, 17 e 18.

VO-DINH, T. **Biomedical Photonics Handbook**. [S.l.]: Journal of Biomedical Optics, 2003. Citado na página 17.

WAX, A.; BACKMAN, V. **Biomedical Applications of Light Scattering**. New York: McGraw-Hill, 2010. Citado 3 vezes nas páginas 5, 6 e 12.

WELCH, A. J.; GEMERT, M. J. Optical-thermal response of laser-irradiated tissue. **Springer Netherlands**, v. 2 ed, n. sn, 2011. Citado na página 17.