

ESPECIFICAÇÃO DE FONTES DE LUZ PARA APLICAÇÕES EM DISPOSITIVOS MÉDICOS DE DETECÇÃO DE FLUORESCÊNCIA QUANTITATIVA E MULTIPLEXADA

Bruno Corrêa Arvan¹; Lucca Coelho Muniz²; Marcos Vinícius Sousa da Silva³; Randson Davi Mendes Santos⁴; Cleber Vinícius Ribeiro de Almeida⁵; Valmara Silveira Ponte⁶; Vinicius Pinto Costa Rocha⁷; Milena Botelho Pereira Soares⁸; Valeria Loureiro da Silva⁹

¹ Graduando em Engenharia Elétrica; Bolsista INOVA-FIOCRUZ; arvanbruno@gmail.com

² Graduando em Engenharia Elétrica; Bolsista de Iniciação Científica da FAPESB; lucca.coelho@fbter.org.br

³ Graduado em Engenharia Elétrica; Bolsista INOVA-FIOCRUZ; marvin.sou@gmail.com

⁴ Graduado em Física; Bolsista INOVA-FIOCRUZ; randson.santos@fbter.org.br

⁵ Mestre em Engenharia Elétrica; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; cleber.vinicius@fieb.org.br

⁶ Mestre em Mecatrônica; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; valmara.ponte@fieb.org.br

⁷ Doutor em Patologia Humana e Experimental; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; vinicius.rocha@fieb.org.br

⁸ Doutora em Biofísica; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; milenabpsoares@gmail.com

⁹ Doutora em Física; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; valeria.dasilva@fieb.org.br

RESUMO

Este trabalho descreve o processo para a especificação de fontes de luz para aplicações em dispositivos médicos de detecção de fluorescência quantitativa e multiplexada, sendo parte de um projeto maior em andamento, voltado para o desenvolvimento de um teste rápido para diagnóstico multiplex direto do SARS-COV-2 e H1N1 pela PCR isotérmica. Para atingir esse objetivo, realizou-se uma revisão da literatura nas bases de dados IEEEExplore e ScienceDirect e utilizou-se dados referentes ao comportamento de certos fluoróforos e diodos emissores de luz (LEDs), provenientes de relatórios de centros de pesquisa e especificações técnicas, respectivamente, para ilustrar o procedimento descrito.

PALAVRAS-CHAVE: Detecção de Fluorescência, Diagnóstico Multiplex, Fontes de Luz, PCR Isotérmica.

1. INTRODUÇÃO

Diante da pandemia da COVID-19 (*coronavirus disease 2019*), é fundamental que seja realizado o teste do maior número possível de pessoas. Isso se deve à fácil transmissão do SARS-COV-2 (*severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2*) e às manifestações clínicas da doença, com muitos indivíduos assintomáticos que atuam como transmissores do vírus.¹ No Brasil, além da infecção pelo SARS-COV-2, há casos crescentes de outras infecções virais, tais como Dengue, Zika, Chikungunya e Influenza A (H1N1). Como as infecções virais já presentes na população podem representar um fator de confusão no diagnóstico da COVID-19, também é importante o desenvolvimento de diagnósticos que excluam outras viroses. A RT-RPA (*reverse transcriptase - recombinase polymerase amplification*) é uma técnica compatível com a análise de múltiplos alvos ao mesmo tempo.² Além do uso da técnica RT-RPA, se faz necessário o uso de dispositivos de diagnóstico multiplex extremamente sensíveis para leitura e análise da fluorescência emitida em cada canal. Sendo assim, a especificação da fonte de luz responsável por excitar os fluoróforos é uma tarefa imprescindível no projeto e desenvolvimento de um dispositivo capaz de exercer tais funções. Portanto, este trabalho visa descrever o processo para a especificação dessas fontes de luz para aplicações em dispositivos médicos de detecção de fluorescência quantitativa e multiplexada, voltado para o desenvolvimento de um teste rápido para diagnóstico multiplex direto do SARS-COV-2 e H1N1 pela PCR isotérmica.

2. METODOLOGIA

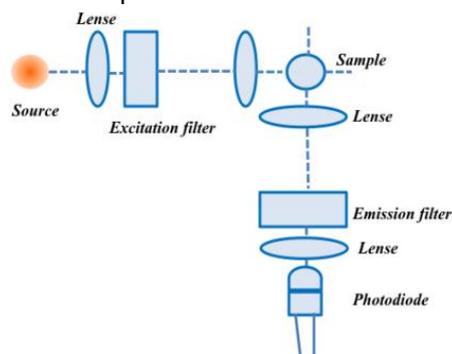
Foi feita uma revisão da literatura no tema, buscando artigos científicos no período de 2000 a 2021 publicados nas bases científicas IEEE Xplore e ScienceDirect, aplicando os seguintes descritores: (*virus OR coronavirus*) AND (*PCR OR "Polymerase Chain Reaction"*) AND *fluorescence* AND (*dye OR fluorophore OR fluorochrome*) AND (*"light source" OR "light emitting diode" OR LED*) AND *multiplex*.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Diferentes abordagens têm sido utilizadas pelos fabricantes de instrumentos de PCR para detectar os sinais de fluorescência associados às sequências genéticas amplificadas, mas a maioria dos instrumentos usa LEDs como fontes de luz para "excitar" os fluoróforos, gerando o sinal de fluorescência.³ Fluorescência é

uma luminescência de curto prazo produzida por excitação eletromagnética. As moléculas que exibem fluorescência são chamadas de fluoróforos ou fluorocromos e cada um apresenta espectros de absorção e emissão característicos. Alguns fluoróforos comumente usados como sondas para identificar diferentes patógenos são FAM (*carboxyfluorescein*), HEX (*hexachlorofluorescein*), ROX (*carboxy-X-rhodamine*) e Cy5 (*cyanine-5*).⁴ A leitura da fluorescência é tipicamente feita por um fluorímetro como o de filtro ilustrado na Figura 1.⁵ Neste caso, filtros são utilizados para restringir a faixa espectral da luz de excitação e da luz detectada às regiões espectrais de interesse. No caso de luz emitida por múltiplos fluorocromos diferentes, se faz necessário utilizar um fotodiodo com um filtro óptico multi-banda ou multiplicar o número de sensores/filtros passa-banda, seja num único dispositivo (sensor multi-espectral) ou múltiplos dispositivos. O número e a complexidade dos componentes ópticos e eletro-ópticos contribui para o custo do dispositivo final e o uso de LEDs é uma estratégia comumente utilizada para reduzir esse custo. Benefícios adicionais dos LEDs incluem seu baixo consumo de energia, longa vida útil, operação sem cintilação e uma largura de banda espectral estreita.⁶

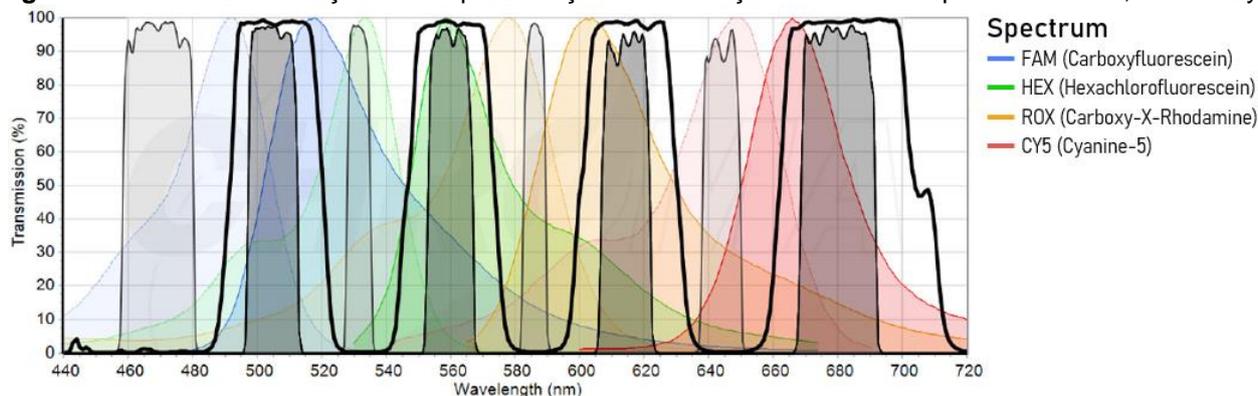
Figura 1 – Esquemático de um fluorímetro típico



Fonte: Mahapatro (2019, p. 7).

Para se obter um nível maior de fluorescência, a fonte de luz deverá ter um comprimento de onda de pico próximo ao pico de absorção do fluoróforo sendo excitado. Entretanto, a separação entre os picos de absorção e emissão é relativamente pequena quando comparada à largura de banda espectral a meia altura dos LEDs (tipicamente entre 15 e 40 nm para LEDs que operam na região do espectro visível), ou seja, parte da luz incidida poderá ser equivocadamente lida pelo sensor como sendo fluorescência.⁶ Para evitar isso, se faz necessário utilizar um filtro óptico de emissão (passa-banda ou passa alta) e outro de excitação (passa-baixa ou passa-banda), aumentando o custo do dispositivo. O filtro de excitação pode ser evitado com a escolha de um LED com características adequadas. Assim, os principais parâmetros dos LEDs que devem ser considerados na especificação dos mesmos para esta aplicação são o comprimento de onda de pico, a largura de banda espectral a meia altura, conhecida como FWHM (*full width at half maximum*), além da intensidade luminosa produzida em uma dada direção e a faixa angular da luz emitida. No desenvolvimento de um dispositivo de detecção de fluorescência quantitativa e multiplexada com mais de um fluoróforo, deve-se levar em conta as características de absorção e emissão dos mesmos, como exemplificado na Figura 2 para o FAM, HEX, ROX e Cy5.

Figura 2 – Fontes de excitação e as representações da absorção e emissão espectral do FAM, ROX e Cy5



Fonte: Adaptado de Chroma Technology Corporation (2020).

As curvas apresentadas nesta figura retratam o espectro de absorção e o espectro de emissão para cada fluoróforo de forma normalizada e as respostas de um conjunto de filtros multi-banda, onde os gráficos sombreados em cinza claro representam o espectro do filtro de excitação, os sombreados em cinza escuro retratam o espectro do filtro de emissão e os traços pretos grossos descrevem o espectro do divisor de feixe dicróico.³ Nota-se que o sistema foi otimizado para uso de LEDs com comprimentos de onda de pico que operam nas regiões espectrais entre 465 e 475 nm, 520 e 535 nm, 580 e 595 nm e 635 e 645 nm, uma vez que a seletividade elevada do filtro de excitação atenua qualquer região do espectro de emissão dos LEDs que possa influenciar negativamente na leitura de fluorescência.

Para que seja possível remover os filtros de excitação sem proporcionar erros de leitura, se faz necessário conhecer o valor mínimo de comprimento de onda do espectro de emissão de cada fluoróforo utilizado. Sabendo que esses valores são 480 nm para o FAM, 535 nm para o HEX, 570 nm para o ROX e 670 nm para o Cy5 e que a largura de banda espectral dos LEDs é, aproximadamente, o dobro do valor do FWHM, ou seja, para um valor típico de 20 nm, tem-se que a largura de banda seria 40 nm e que, conseqüentemente, os LEDs de excitação teriam que ter comprimentos de onda de pico de, aproximadamente, 460 nm, 515 nm, 550 nm e 615 nm.^{3,7} Entretanto, verifica-se que os LEDs de excitação, com exceção do que irá excitar o FAM, estão operando na faixa espectral de emissão dos demais fluoróforos, inviabilizando a leitura simultânea de todos os canais. Porém, caso a análise seja feita em dois momentos, onde, no primeiro, excita-se o FAM e o ROX e, em seguida, estimula-se o HEX e o Cy5, a operação se torna factível.

Apesar do procedimento proposto ser, teoricamente, válido e que o mesmo reduzirá o custo do dispositivo de forma significativa, o sistema como um todo deixará de ter o mesmo nível de otimização, devido à redução na eficiência espectral e na densidade óptica. Para amenizar isso, deve-se garantir que a faixa angular de emissão do LED deve ser a menor possível para permitir melhor iluminação da área de interesse na amostra, utilizando lentes convexas para uma melhor colimação e/ou focalização do feixe luminoso de excitação, caso seja necessário.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho evidenciou que os parâmetros mais importantes dos LEDs são o comprimento de onda de pico, a largura a meia altura, a intensidade luminosa produzida em uma dada direção e o ângulo de feixe da luz emitida e que o processo demonstrado para a especificação é válido, teoricamente. Dando continuidade a este trabalho, provas de conceito serão realizados com o intuito de validar o procedimento proposto.

Agradecimentos

Agradecimentos ao SENAI CIMATEC e a FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz) pelo apoio financeiro e tecnológico no desenvolvimento do projeto.

5. REFERÊNCIAS

- HELLEWELL, Joel. **Feasibility of controlling COVID-19 outbreaks by isolation of cases and contacts.** The Lancet Global Health, v. 8, n. 4, p. e488–e496, 1 abr. 2020.
- LOBATO, Ivan e O'SULLIVAN, Ciara. **Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 98, p. 19–35, 1 jan. 2018.
- Chroma Technology Corporation. **Filters for Polymerase Chain Reaction (PCR).** Windham County: Chroma, 2020. Disponível em: <https://www.chroma.com/polymerase-chain-reaction>. Acesso em: 30 mar. 2021.
- BEHLKE, Mark; HUANG, Lingyan; BOGH, Lisa; ROSE, Scott e DEVOR, Eric. **Fluorescence and Fluorescence Applications.** Integrated DNA Technologies, 2005.
- MAHAPATRO, Ajit. **Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy.** Deli: e-PG Pathshala, 2019. Disponível em: http://epgp.inflibnet.ac.in/epgpdata/uploads/epgp_content/S000831ME/P001639/M020317/ET/1496148656Quad-1-Luminescence-L5.pdf. Acesso em: 4 abr. 2021.
- DADESH, K. **Multiplexed Photometry And Fluorimetry Using Multiple Frequency Channels.** Detroit: Wayne State University, p. 21, 2 jan. 2013.
- AAT Bioquest, Inc. **Fluorescence Spectrum Viewer.** Sunnyvale: AAT Bioquest, 2019. Disponível em: <https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer/WPEA3RqG>. Acesso em: 31 mar. 2021.