**OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA MECÂNICO DA ÓPTICA DE UM LEITOR DE FLUORESCÊNCIA MULTICANAL**

**Bruno Gondim Ribeiro de Santana1**; Eduardo de Araújo Rocha2; Valmara Silveira Ponte3; Valéria Loureiro da Silva 4

1 Graduando em Engenharia Mecânica e Bolsista; Iniciação Científica - Cnpq;

 bruno.g.santana@aln.senaicimatec.edu.br

4 Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; valeria.dasilva@fieb.org.br

**RESUMO**

O fluorímetro é um sistema que consiste em uma fonte de luz que excita um marcador em um comprimento de onda específico e um sensor que detecta a fluorescência resultante. O presente trabalho consistiu em otimizar o sistema mecânico do sistema óptico de um leitor de fluorescência multicanal a partir da redução de folgas e integração de peças num suporte monolítico. O protótipo revisado apresentou uma melhora significativa na repetitividade nos valores de fluorescência medidos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sistema óptico; Arquitetura óptica; fluorescência; Otimização

**1. INTRODUÇÃO**

 Os sistemas ópticos, como sistema de iluminação, imagem e sistemas de detecção, são cada vez mais usados ​​em vários campos industriais, de saúde e ambientais.1 Uma das aplicações voltadas para a saúde é o uso de fluorímetros para testes com marcadores fluorescentes, como os usados ​​para detectar a presença de patógenos como SARS-COV2 e H1N1. Nos últimos anos, vivemos uma das maiores crises de saúde da história, com milhões de pessoas afetadas pelo vírus SARS-COV2, causador da COVID 19. A partir daí vários métodos foram desenvolvidos para detecção de vírus em humanos.

Neste caso, um sistema óptico (fluorímetro) é utilizado para detectar a fluorescência do marcador selecionado. Um fluorímetro consiste basicamente de uma fonte de luz que excita um marcador em um comprimento de onda específico e um sensor que detecta a fluorescência resultante de uma amostra contendo o marcador, colocada entre a fonte de luz e o detector. Componentes ópticos auxiliares, como lentes e filtros, são usados ​​para otimizar o sistema de detecção.2

Este trabalho é uma evolução do leitor de fluorescência portátil (fluorímetro) desenvolvido para o projeto “Desenvolvimento de um teste rápido para diagnóstico multiplex direto do SARS-COV-2 e H1N1 pela PCR isotérmica” financiado pela Fiocruz. Este leitor será capaz de detectar a emissão de três fluoróforos: FAM, ROX e CY5 e o suporte mecânico deve acomodar três tubos de lentes com filtro e a fonte de luz em cada um, consistindo de LEDs com comprimento de onda específico, além do suporte para um microtubo contendo a amostra, filtro e sensor para detecção da luz emitida.

O invólucro original do fluorímetro consistia de uma base impressa em 3D, a montagem da placa de circuito impresso para o controle da excitação e a detecção da fluorescência e o suporte do sistema óptico. Porém, ao ser submetido a testes, foi identificado que o protótipo original não apresentava resultados desejados com sensibilidade, repetitividade e reprodutibilidade. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é otimização da estrutura mecânica de acomodação da óptica para melhoria na repetitividade e reprodutibilidade do sistema. A melhoria do sistema de suporte óptico com fabricação por impressão é um desafio significante já que sistemas ópticos normalmente precisam de precisão micrométrica, difíceis de serem obtidos por impressão 3D.

**2. METODOLOGIA**

 Primeiramente, foi realizada a caracterização da última versão do protótipo do fluorímetro desenvolvido anteriormente para identificar pontos de folga e possíveis melhorias. Foi feito um plano de correção do primeiro protótipo, que constituiu na fase de remodelagem, reimpressão de um novo protótipo e testes da nova mecânica adquirida. O projeto incorporou também a remoção facilitada de peças específicas para ajustes e testes, que não ocorriam anteriormente.

O sistema óptico é composto pelo microtubo com amostras para análises, o suporte do microtubo, tubos de lente que acomodam as lentes e os LEDs de excitação da amostra, suporte dos tubos de lente, filtro óptico multibanda de emissão (CHROMA CT FAM/HEX/ROX/Cy5m). O filtro é acomodado num suporte que também acomoda a PCI com sensor. O módulo óptico do protótipo original á apresentado na Fig. 1, bem como a versão otimizada desenvolvida neste trabalho nas Fig. 2 e 3.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Figura 1 - Módulo óptico do Protótipo inicial** | **Figura 2 - Módulo óptico otimizado aberto** | **Figura 3 - Módulo óptico otimizado montado** |
| Uma imagem contendo mesa, balcão, pequeno, em pé  Descrição gerada automaticamente | Jogo de vídeo game  Descrição gerada automaticamente com confiança baixa | Uma imagem contendo no interior, mesa, pia, balcão  Descrição gerada automaticamente |
| a) Suporte microtubo, b) Microtubo, c) Tubo de lente, d) Suporte tubos de lente, e) Filtro óptico multibanda de emissão, f) Suporte Filtro óptico multibanda de emissão, g) PCI com sensor, h) Base inicial. | i) Base nova, j) Suporte da PCI, k) Tronco de cone, l) novo suporte dos tubos de lentes, m) Novo suporte filtro óptico multibanda de emissão, n) apoios para o suporte dos tubos de lentes. |   o) Novo encaixe para o suporte da PCI. |

 Em um primeiro momento, identificou-se a necessidade da construção de uma nova base que pudesse unir toda a infraestrutura requisitada para poder comportar perfeitamente todo o sistema óptico. Com isso, foi feito uma base em formato retangular com 90 mm de comprimento, 40 mm de largura e 22 mm de altura (Fig. 2 i), na qual já se encontra incorporada o suporte do filtro óptico multibanda de emissão (Fig.2 m).

Um dos problemas identificados era a dificuldade da remoção e alocação da PCI com o sensor, visto que a constante remoção para correções e ajustes na peça da PCI prejudicava drasticamente a mecânica do protótipo.

Então, foi feito em modelagem 3D, uma nova peça que serve como suporte da PCI (Fig.2 j), onde a PCI é parafusada fora da base e se aloca com a presença de um novo encaixe feito nas laterais da base (Fig.3 o), com 14 mm de altura e 36 mm de comprimento, em que a peça nova desliza até se estar no lugar requisitado.

Outro problema mecânico identificado foi a folga apresentada no diâmetro do suporte (Fig 1. d) para os tubos de lente (Fig 1. c) e no encaixe do suporte do microtubo (Fig.1 a), prejudicando diretamente na sensibilidade da medida, gerando uma falta de reprodutibilidade e repetitividade do sistema óptico. Numa das evoluções do sistema foi corrigido a folga no microtubo, entretanto comprometeu o alinhamento entre tubo de lente e amostra no microtubo. Isso foi corrigido a partir da simulação do cone de luz que sai do tubo de lente em direção à amostra.

Assim, foi feito por modelagem 3D um novo suporte dos tubos de lentes (Fig. 2 l) e foram inseridos troncos de cones (Fig. 2 k) na base para o encaixe dele. No suporte dos tubos de lentes foi reduzido o diâmetro do encaixe dos tubos de lente de 18 mm para 16 mm, que faz com que os tubos de lente não apresentem folgas, aumentando a reprodutibilidade. Também foi ajustado o encaixe do suporte do microtubo (Fig. 1 a) por meio da redução do diâmetro do seu encaixe. Ambas as mudanças aumentaram a confiabilidade no alinhamento do sistema.

Então, foi identificado o sensor da PCI (Fig. 1 g), após ser submetido a alterações, apresentou desvios na sua posição de origem e gerou num desalinhamento com o microtubo (Fig. 1 b), prejudicando a precisão e o nível de fluorescência captado. Assim, foi feito um reajuste na concentrização do sensor com o microtubo por meio da alocação do suporte da PCI (Fig. 2 j), a partir dos seus braços, 0,5mm para a direita e 1,9 mm para cima no encaixe na base nova (Fig. 2 i), aumentando a sensibilidade do sistema óptico.

Também, foram otimizadas as dimensões de encaixe dos três apoios aos arredores do filtro óptico multibanda de emissão (Fig. 2 n) para que o suporte dos tubos de lente desça até o limite requisitado de forma a que o microtubo se aproxime o máximo possível do filtro, aumentando a precisão e diminuindo a perda de luz de fluorescência. A impressão 3D não foi feita em um aparelho de qualidades ideais, então ocorreram algumas distorções consideráveis nas medidas originais, que posteriormente foram ajustadas e compensadas na modelagem.

Após a conclusão das fases de modelagem e impressão do plano de correção, foi feito os mesmos testes de repetitividade e reprodutibilidade nos dois protótipos de módulo óptico, com a mesma amostra de Rodamina 6G (10E-3 mg/ml), o mesmo sensor, o mesmo ciclo de trabalho e as mesmas condições, para haver a comparação e entendimento se o sistema óptico melhorou com sua nova arquitetura.

Assim, o teste se deu colocando e retirando uma amostra 10 vezes em cada sistema para a captação da tensão no microcontrolador, que corresponde a intensidade da fluorescência da amostra que chega ao sensor.

**3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O resultado de repetitividade das medidas com os dois protótipos, está apresentado na tabela 1.

 Tabela 1: Comparativo protótipo 1 e 2



Com o novo sistema óptico feito com a melhora da arquitetura, as dimensões estão mais precisas e as folgas foram minimizadas consideravelmente, fazendo com que o projeto tenha maior precisão e confiabilidade nos dados.

Como mostrado na tabela, as tensões no novo protótipo seguem um padrão melhor e uma constância maior, nos valores de tensão, que o protótipo inicial, acarretando numa diminuição drástica do desvio padrão de 13,76% e do desvio normalizado de 4,95%, entre os dois protótipos. Assim, gerando uma melhora na sensibilidade e repetitividade do sistema.

**4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

 Foi obtido uma melhora considerável após o plano de correção. Diante disso, melhorias significativas na repetitividade e sensibilidade por meio da otimização do suporte do sistema óptico, com redução das folgas e integração de diversos, foram identificadas através dos testes aplicados sobre o sistema.

**Agradecimentos**

Agradecimentos ao SENAI CIMATEC, ao CNPq pelas bolsas PIBIT.

**5. REFERÊNCIAS**

1 KASUNIC, Keith. **Optical Systems Engineering**. McGraw-Hill Education, 2011.

2 NOVAIS, Pires. **Pesquisa PCR em tempo real Uma Inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).** Pesquisa, 2004.

3 HEID, Livak. **Real time quantitative PCR.** Journal Article, 1996