

## CARACTERIZAÇÃO DA FAIXA DINÂMICA DE UM LEITOR DE FLUORESCÊNCIA

**Eduardo de Araujo Rocha**<sup>1</sup>; Valmara Silveira Ponte<sup>2</sup>; Valéria Loureiro da Silva<sup>2</sup>;

<sup>1</sup> Bolsista; Iniciação científica – CNPq; rocha.eduardoaraujo@gmail.com

<sup>2</sup> Laboratório de Engenharia Óptica e Fotônica, SENAI CIMATEC, Salvador-BA; valeria.dasilva@fieb.org.br

### RESUMO

Dada a necessidade nos últimos anos do uso de marcadores fluorescentes na produção científica na área de saúde e visto a sua vasta aplicação em análise quantitativa de patógenos, o estudo e desenvolvimento de máquinas e protótipos para testes de diagnóstico requerem cada vez mais uma maior confiabilidade em suas análises e com isso, um maior conhecimento da manipulação e utilização destes compostos. O artigo em questão descreve a caracterização óptica de um sensor de detecção em um fluorímetro, com o intuito de analisar o comportamento de fluorescência do marcador Rodamina 6G ao ser excitado por um diodo emissor de luz (LED). A fonte de luz e o sensor de detecção foram controlados por um sistema óptico-eletrônico. Os resultados das medidas de caracterização, mostram uma limitação na análise de amostras biológicas para concentrações muito baixas do marcador, as quais se encontram na mesma faixa de ruídos luminosos provenientes do sistema.

**PALAVRAS-CHAVE:** Marcadores fluorescentes; caracterização; sensor de fluorescência;

### 1. INTRODUÇÃO

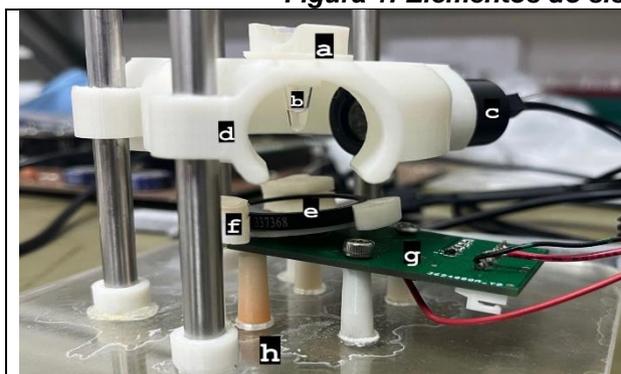
Com o cenário da pandemia do COVID-19 vivido nos últimos anos, somado às infecções virais que nos afetam anualmente, como por exemplo a Influenza A (H1N1), se fez necessário uma maior atenção ao desenvolvimento de projetos que ajudem no combate as infecções e no apoio à saúde pública. O aprimoramento de técnicas de diagnóstico multiplex é peça fundamental na produção científica da área de saúde, como é o caso da técnica RT-RPA, na qual é possível a análise de múltiplos agentes infecciosos ao mesmo tempo, podendo assim analisar tanto o SARS-COV-2 quanto o H1N1 com o auxílio de dispositivos de diagnóstico multiplex<sup>1</sup>. Este último, portanto, utiliza-se dos marcadores fluorescentes 6-FAM, ROX e Cy5 para realizar sua análise quantitativa.

Recentemente, um protótipo de leitor de fluorescência para análise de teste RT-RPA multiplex foi desenvolvido no projeto “Desenvolvimento de um teste rápido para diagnóstico multiplex direto do SARS-COV-2 e H1N1 pela PCR Isotérmica”, financiado pelo edital INOVA FIOCRUZ 2020. Resultados preliminares de funcionamento de um protótipo de bancada desenvolvido no laboratório, mostraram bom desempenho na operação qualitativa para um canal<sup>2</sup>. Neste trabalho, é apresentada a caracterização da faixa dinâmica da resposta do leitor de fluorescência, numa configuração multicanal.

### 2. METODOLOGIA

Para caracterizar o sensor com a Rodamina 6G utilizou-se o protótipo construído no projeto financiado pelo edital INOVA FIOCRUZ 2020, para detecção de fluorescência em testes RT-RPA (Fig.1). O protótipo utiliza um fotodiodo BPX61 associado a um filtro óptico multibanda de emissão<sup>3</sup> (CHROMA CT FAM/HEX/ROX/Cy5m) para detecção do sinal luminoso, emitido pelas amostras, e LED's, associados filtros de excitação e lentes, controlados pelo microcontrolador STM32. Os testes em questão têm o objetivo de analisar os dados de fluorescência obtidos, para identificação do comportamento destes e determinação de uma curva característica para os compostos analisados.

**Figura 1: Elementos do sistema opto-mecânico.**

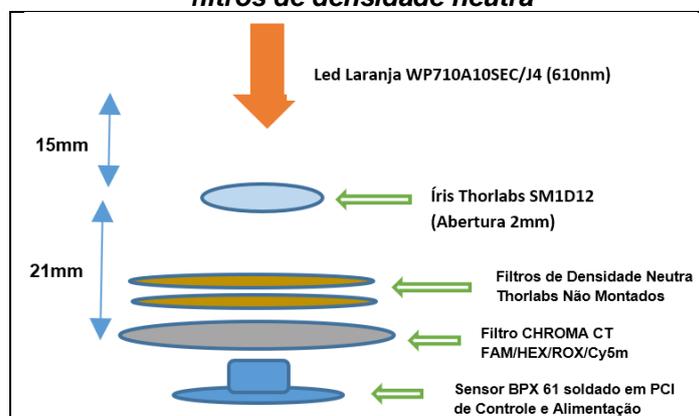


a) Suporte de microtubo, b) Microtubo, c) Tubo de lente para excitação da amostra, d) Suporte para tubos de lente, e) Filtro óptico multibanda de emissão, f) Suporte do filtro de emissão, g) PCI com sensor BPX61 utilizado para detecção do luz, h) Base de suporte do sistema óptico.

Para a caracterização com o marcador Rodamina 6G foi utilizado como base uma solução de 0,01mg/mL, o qual foi submetido a um banho ultrassônico para uma melhor diluição do marcador fluorescente em água deionizada. Para as diluições subsequentes foi necessário a utilização de balão volumétrico e micropipeta monocal. A solução base de 0,01 mg/mL foi diluída em concentrações de  $9,0 \cdot 10^{-3}$ ;  $7,0 \cdot 10^{-3}$ ;  $6,0 \cdot 10^{-3}$ ;  $4,5 \cdot 10^{-3}$ ;  $3,0 \cdot 10^{-3}$ ;  $2,5 \cdot 10^{-3}$ ;  $2,0 \cdot 10^{-3}$ ;  $1,5 \cdot 10^{-3}$ ;  $1,0 \cdot 10^{-3}$ ;  $5,0 \cdot 10^{-4}$  mg/mL, e assim comparadas com amostras padrão de água destilada. Estas amostras foram excitadas LED verde 525nm trabalhando em 48,8% do ciclo de trabalho e analisadas pelo sensor BPX61, acoplado ao filtro óptico multibanda. Os resultados obtidos foram a média de 10 repetições feitas retirando e reposicionando a amostra, com o intuito de analisar a sua repetitividade.

Para uma melhor análise da faixa dinâmica obtida pelo sensor BPX 61 também foi realizado uma caracterização com filtros de densidade neutra combinados e acoplados ao sensor, soldado na PCI de controle do sistema e sendo iluminado por um LED laranja WP710A10SEC/J4 de comprimento de onda 610nm, trabalhando em 13% do ciclo de trabalho e tendo o seu feixe limitado a 2mm por uma íris Thorlabs SM1D12. A montagem completa é ilustrada pelo diagrama da Fig. 2.

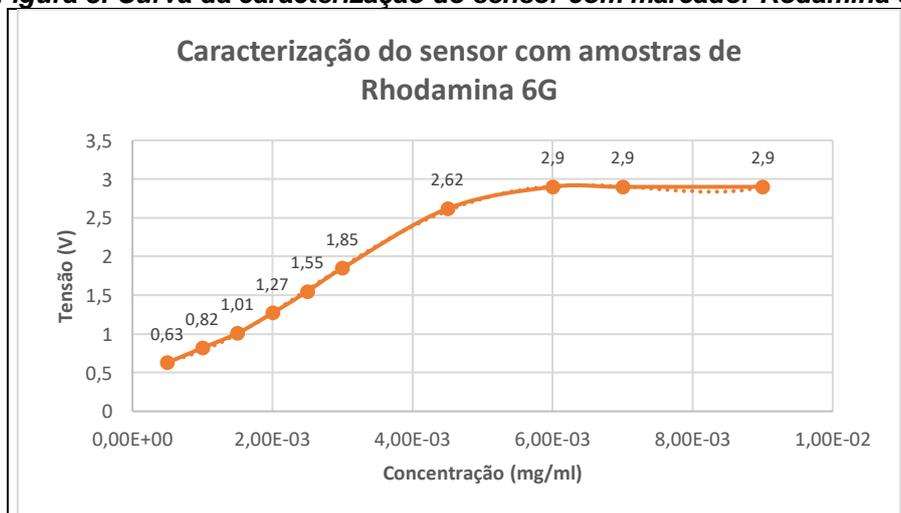
**Figura 2: Diagrama representativo da estrutura desenvolvida para a caracterização do sistema com filtros de densidade neutra**



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

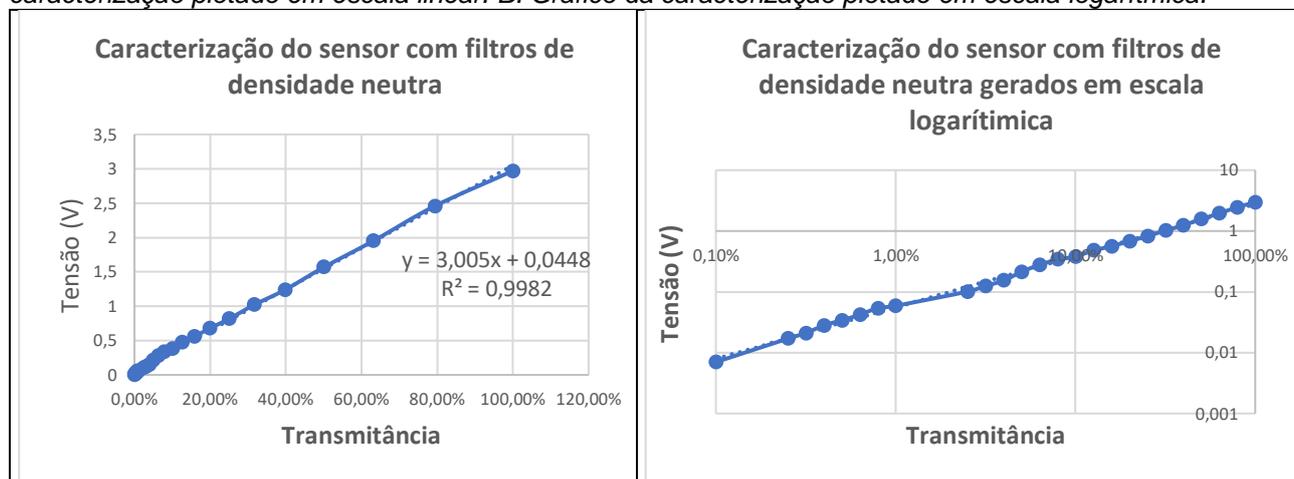
Analisando o gráfico da emissão de fluorescência emitida pelas amostras de Rodamina 6G diluídas, obtidas pelo sensor BPX61 e um sistema de controle implementado no microcontrolador STM32 podemos observar na figura 3 que a curva tem uma tendência linear, porém em concentrações muito baixas a fluorescência obtida pelo sensor é limitada pelo ruído do próprio equipamento, a partir da concentração de  $10^{-3}$  mg/mL. Na porção superior do gráfico percebe-se também uma limitação do valor de tensão compreendido pelo microcontrolador, ao ultrapassar a faixa de luminosidade captada pelo sensor temos uma constante saturação eletrônica.

**Figura 3: Curva da caracterização do sensor com marcador Rodamina 6G**



Para um melhor entendimento dos dados obtidos na primeira caracterização, o sensor então foi submetido a uma segunda caracterização, desta vez sem marcador fluorescente. A partir de combinações de filtros ópticos de densidade neutra foi possível gerar uma curva numa grande faixa luminosa, permitindo assim uma análise mais completa e abrangente da faixa dinâmica do sensor.

**Figura 4: Gráficos de caracterização do sensor com filtros de densidade neutra.** A. Gráfico da caracterização plotado em escala linear. B. Gráfico da caracterização plotado em escala logarítmica.



É possível observar, a partir dos gráficos gerados na figura 4, que o sensor BPX 61 e a eletrônica de detecção apresentam um comportamento linear e uma faixa dinâmica superior a 1000x. Ao contrário da caracterização com Rodamina, a porção inferior do gráfico, mostra que o sistema de detecção é capaz de medir intensidades luminosas 1000x menores que o limite máximo.

A partir das análises feitas, se faz necessário compreender o motivo do alto ruído observado na porção inferior da caracterização com Rodamina. Comprovado o comportamento linear do sensor em baixos níveis de luminosidade, os resultados sugerem que o ruído observado para valores baixos de concentração de Rodamina são de natureza luminosa e que o sistema óptico deve ser melhorado para reduzir o impacto desses ruídos.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes realizados mostraram uma faixa linear do sensor de 4x na caracterização com a Rodamina enquanto a faixa linear na caracterização com filtros de densidade neutra ficou na ordem de mil vezes nos mostrando uma limitação muito grande na faixa de trabalho com amostras de Rodamina. Os resultados sugerem que a limitação na detecção de fluorescências de baixa intensidade é proveniente de ruídos ópticos (luminosos). Tais resultados revelam a necessidade de uma otimização do sistema para uma menor captação de luz espalhada, promovendo melhorias na obtenção de uma maior faixa dinâmica do sensor, evitando assim, conflitos na análise de diagnóstico na medição quantitativa de patógenos proposta pelo protótipo em desenvolvimento.

#### Agradecimentos

Agradecimentos ao CNPq pela bolsa PIBIT e a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo projeto em desenvolvimento.

#### 5. REFERÊNCIAS

<sup>1</sup>HEID, C. A.; Stevens, J.; LIVAK, K. J. & WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. Genome Res.6, p. 986–994, 1996. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>.

<sup>2</sup>COELHO, Lucca Muniz et al. ANÁLISE ESTATÍSTICA ATRAVÉS DE BOXPLOT DE AMOSTRAS DE PCR . In: VI Seminário de Avaliação de Pesquisa Científica e Tecnológica (SAPCT) e V Workshop de Integração e Capacitação em Processamento de Alto Desempenho (ICPAD) - SENAI CIMATEC, 2021. Disponível em: <https://www.doity.com.br/anais/sapcticpad2021/trabalho/185732&gt;>. Acesso em: 04/04/2023 às 18:27

<sup>3</sup>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 2023.